

VIROLOGIE. — Une nouvelle maladie virale du Pois de terre (*Voandzeia subterranea* Thouars) provoquée par un tymovirus, le Voandzeia Necrotic Mosaic Virus.

Note de Annie Monsarrat, Claude Fauquet et Jean-Claude Thouvenel, présentée par Léon Hirth.

Remise le 6 février 1984, acceptée le 2 avril 1984.

Une nouvelle maladie virale du Pois de terre (*Voandzeia subterranea* Thouars) a été caractérisée en Côte-d'Ivoire. Sa gamme d'hôtes, une méthode de purification et quelques-unes de ses propriétés biophysiques sont décrites. Il s'agit d'un virus sphérique de 28 nm de diamètre, appartenant au groupe des tymovirus, virus non encore décrit et que nous proposons de nommer Voandzeia Necrotic Mosaic Virus, en raison des symptômes caractéristiques qu'il provoque sur les feuilles de Pois de terre.

VIROLOGY. — A New Viral Disease of Bambarra Groundnut (*Voandzeia Subterranea* Thouars) Induced by a Tymovirus, the Voandzeia Necrotic Mosaic Virus.

A new viral disease on Bambarra groundnut (*Voandzeia subterranea* Thouars) has been characterized in the Ivory Coast. We describe here its host-range, a method of purification and some of its biophysical properties. It is a spherical virus of 28 nm in diameter, member of the tymovirus group which has never been described before and we propose to name it Voandzeia Necrotic Mosaic Virus, according to the typical symptoms induced on the leaves of Bambarra groundnut.

INTRODUCTION. — Trois maladies virales différentes ont été isolées du Pois de terre (*Voandzeia s.*), en Côte-d'Ivoire : la mosaïque, la mosaïque déformante et la nécrose [1]. Cette dernière maladie est présentée ici, les symptômes en champs sont les suivants : léger rabougrissement général de la plante, déformations des folioles provoquées par des lésions nécrotiques et mosaïque jaune (fig. 1). Il s'agit d'une maladie non encore connue du Pois de terre et le virus qui la provoque n'a pu être assimilé à un virus déjà décrit.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — L'inoculum initial provient du Nord de la Côte-d'Ivoire, dans la région de Ferkéssédougou, où cette plante est largement cultivée.

1. **Transmission.** — (a) Transmission mécanique. Les feuilles de plantes malades sont broyées dans du tampon borate de sodium 0,1 M, pH 8,0 contenant 0,02 M de chlorhydrate de cystéine, 0,5% de bentonite et 0,05 M de bisulfite. Le broyat est inoculé par frottement à des plantules de diverses plantes-hôtes préalablement saupoudrées de carborundum n° 400. Les plantes inoculées sont maintenues à l'abri des Insectes dans des serres conçues à cet effet et soumises aux conditions climatiques naturelles (température moyenne 32°C et humidité moyenne 90%). Systématiquement une inoculation de contrôle est faite sur *Voandzeia s.* 30 jours après que les plantes-hôtes aient été inoculées qu'elles présentent ou non des symptômes.

Des transmissions ont également été réalisées à partir de virus purifié pour éliminer l'hypothèse de la présence d'inhibiteurs, les concentrations de virus alors utilisées varient de 1 à 10 mg/ml de tampon, la technique d'inoculation restant la même.

(b) Transmission par Insecte. Une espèce de chrysomelidae a été utilisée : *Podagrica decolorata* (récolté sur *Abelmoschus esculentus*). Les Coléoptères, après un jeûne de plusieurs heures sont mis en élevage sur *Voandzeia s.* malade et périodiquement installés par groupe de 5 sur *Voandzeia s.* sains. Après 72 h les Insectes sont éliminés par pulvérisation d'insecticide.

2. **Purification.** — Les feuilles de Pois de terre présentant de forts symptômes, sont broyées dans un tampon phosphate de potassium 0,2 M, pH 7, contenant 4% d'acide thioglycolique, à raison de 3 ml/g de feuilles. Après 2 mn de broyage, le mélange est clarifié par du chloroforme, à raison de 1 ml/1 g de feuille. 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, et le virus est purifié sur gradient de saccharose 10-40% pendant 3 h à 90 000 g, à la température de 10°C. Les bandes opalescentes correspondant au virus sont récoltées et diluées avec du tampon phosphate 0,01 M, pH 7 et concentrées par ultracentrifugation de 4 h à 78 000 g.

3. **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 carbonnée. Les particules sont ensuite colorées négativement avec de l'acétate d'uranyle à 1%, et observées à l'aide d'un microscope « Siemens Elmiskop 102 ».

0249-6313/84/02990053 \$2.00 © Académie des Sciences

C. R., 1984, 2° Semestre (T. 299)

Fonds Documentaire ORSTOM



010007780

Série III — 6

Fonds Documentaire ORSTOM

Cote: B*7780 Ex: 1

4. *Sérologie.* — Un antisérum a été préparé en injectant du virus purifié à un lapin, à raison de 1 mg/semaine, pendant 3 semaines. Les tests sérologiques ont été effectués par double diffusion en agar 1% dans du NaCl 0,9% additionné d'azide de sodium 0,1%, suivant la méthode d'Ouchterlony [2].

RÉSULTATS. — 1. *Transmission.* — (a) *Transmission mécanique.* La maladie est transmise par inoculation mécanique de broyat de feuilles virosées à de jeunes plantules de *Voandzeia s.* en reproduisant exactement les symptômes observés en champs, à savoir : nécroses sur les feuilles, déformations foliaires et mosaïque jaune sur l'ensemble des folioles (fig. 2), les premières feuilles apparaissant après inoculation présentent en général une mosaïque verte et jaune très prononcée.

Ce virus provoque également des lésions nécrotiques sur *Chenopodium amaranticolor*, celles-ci s'entourent par la suite d'anneaux rouges et la feuille inoculée se décolore totalement.

Nous avons éprouvé 87 espèces de plantes parmi les Amaranthaceae, les Chenopodiaceae, les Cruciferae, les Cucurbitaceae, les Leguminosae, les Malvaceae, les Passifloraceae, les Scrophulariaceae et les Solanaceae. Seulement, trois espèces de Légumineuses sont hôtes pour ce virus, il s'agit de *Dolichos lablab*, de *Vigna unguiculata* et *Vigna sinensis*.

Les solutions de virus purifié éprouvées sont infectieuses à condition qu'elles soient inoculées immédiatement après leur purification. Nous avons pu ainsi infecter les hôtes déjà trouvés par inoculation de jus brut, mais nous n'avons pu infecter de nouveaux hôtes comme *Arachis hypogaea*, *Phaseolus vulgaris*, *Abelmoschus esculentus*, *Nicotiana glutinosa* ou *Nicotiana benthamiana*.

(b) *Transmission par Insecte.* La maladie n'a pu être transmise de *Voandzeia s.* à *Voandzeia s.* par *Podagrica decolorata*, espèce vectrice de l'Okra Mosaic Virus [14] et ceci quel que soit le temps qu'acquisition.

2. *Purification.* — Selon la méthode de purification, le rendement en virus varie, mais se situe toujours aux alentours de 200 mg/kg de feuilles. Sur gradient de saccharose on peut constater la présence de deux bandes opalescentes, celle du bas (B) correspond aux particules qui se colorent négativement à l'acétate d'uranyle et est toujours infectieuse après concentration, celle du haut (T) correspond aux particules vides (microscopie électronique) et elle n'est jamais infectieuse sur *Voandzeia s.* ni sur *Chenopodium a.* Les deux composants sont sérologiquement identiques.

Les coefficients de sédimentation, extrapolés à concentration nulle, et à 29°C, sont respectivement de : 51 S(T) et 113 S(B).

EXPLICATION DE LA PLANCHE

Fig. 1. — Symptômes systémiques provoqués par le Voandzeia Necrotic Mosaic Virus sur *Voandzeia subterranea* Thouars. A gauche, plante malade; à droite, plante saine.

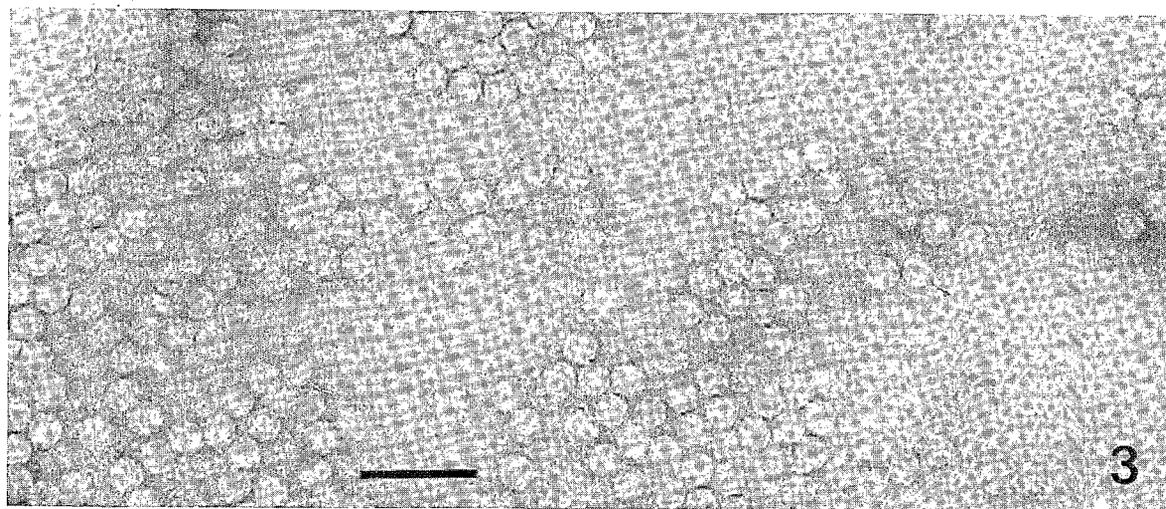
Fig. 1. — Systemic symptoms induced by Voandzeia Necrotic Mosaic Virus on *Voandzeia subterranea* Thouars. Diseased plant on the left and healthy plant on the right.

Fig. 2. — Symptômes systémiques sur feuilles de *Voandzeia subterranea* Thouars, induits par le Voandzeia Necrotic Mosaic Virus. Feuille saine à droite.

Fig. 2. — Systemic symptoms induced by Voandzeia Necrotic Mosaic Virus on *Voandzeia subterranea* Thouars leaves. Healthy leaf on the right.

Fig. 3. — Aspect en microscopie électronique d'une préparation purifiée de Voandzeia Necrotic Mosaic Virus, après coloration négative à l'acétate d'uranyle ($G \times 180\ 000$). La barre représente 100 m.

Fig. 3. — Electron microscope aspect of a purified suspension of Voandzeia Necrotic Mosaic Virus after negative staining with uranyl acetate ($M \times 180\ 000$). Bar represents 100 nm.



Les spectres d'absorption des deux bandes présentent un maximum, à 280 nm pour (T) et à 260 nm pour (B) et un minimum, à 250 nm pour (T) et à 242 nm pour (B).

Les rapports d'absorption, corrigés pour la diffusion de la lumière, selon Noordam [3] sont pour A 260/A 280 de 0,64 (T) et de 1,75 (B), et pour A_{\max}/A_{\min} de 1,91 (T) et de 1,35 (B).

Ces rapports indiquent selon la méthode graphique de Paul [4] un pourcentage d'ARN respectivement de 0% (T) et 35% (B) et selon la méthode graphique de Gibbs et Harrison [5] un coefficient d'extinction de 1,8 (T) et de 8,3 (B).

3. *Microscopie électronique.* — L'observation en microscopie électronique du virus purifié a montré l'existence de particules sphériques de 28 nm de diamètre (*fig. 3*). L'acétate d'uranyle pénètre les particules vides (T) et entoure les particules pleines (B).

4. *Sérologie.* — Ce virus très immunogénique a permis l'obtention d'antisérums de titres variant de 1/512 à 1/4096 en gel de diffusion.

Le virus purifié a été éprouvé contre de nombreux antisérums de tymovirus. Un précipité spécifique est observé avec les virus suivants [le titre, l'origine et l'indice différentiel sérologique (SDI) calculé selon Van Regenmortel [6] sont indiqués entre parenthèses] : Kennedy Yellow Mosaic Virus (SDI=1) (Dr Gibbs, titre 1/1024), Turnip Yellow Mosaic Virus (SDI=6) (Dr Matthews, titre 1/2048), Desmodium Yellow Mottle Virus (SDI=6) (Dr Scott, titre 1/512) et Okra Mosaic Virus (SDI=5) (Dr Fauquet, titre 1/4096). Il est à noter qu'aucune réaction positive n'a été obtenue avec les autres virus de la structure en anneau de R. Koenig [7], c'est-à-dire le Clitoria Yellow Vein Virus (Dr Bock, titre 1/512) et le Cacao Yellow Mosaic Virus (Dr Brunt, titre 1/2048).

CONCLUSION. — Un virus de 28 nm de diamètre responsable d'importants symptômes a été isolé sur le Pois de terre (*Voandzeia s. Thouars*). Ce virus se transmet mécaniquement de *Voandzeia s.* à *Voandzeia s.* et a une gamme d'hôtes extrêmement réduite (3 légumineuses et une chenopodiaceae).

Il n'a pas été possible de transmettre ce virus par un Coléoptère vecteur de l'Okra Mosaic Virus; la transmission par la graine n'a pas été réalisée.

Les propriétés biophysiques et les relations sérologiques nous prouvent qu'il s'agit d'un tymovirus, relié sérologiquement à certains membres du groupe.

Ce virus est le premier tymovirus isolé de *Voandzeia s.* naturellement infecté ([8] à [11]).

Parmi les quatre tymovirus reliés sérologiquement au VNVM, le Turnip Yellow Mosaic Virus [12] infecte seulement les Cruciferae, le Desmodium Yellow Mottle Virus [13], l'Okra Mosaic Virus [14] et le Kennedy Yellow Mosaic Virus [15] infectent les Légumineuses mais ils ont des gammes d'hôtes très étendues par rapport au VNVM. Enfin, le VNVM peut être différencié du Kennedy Yellow Mosaic Virus, bien qu'il semble en être très proche (SDI=1) par sa gamme d'hôte extrêmement réduite et par le fait que le VNVM infecte le *Chenopodium amaranticolor*. Nous considérons donc qu'il s'agit d'un nouveau virus.

Toutes ces raisons laissent penser qu'un nouveau tymovirus a été isolé du Pois de terre, nous proposons de le dénommer Voandzeia Necrotic Mosaic Virus (VNVM).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] C. FAUQUET et J. C. THOUVENEL, *Initiations. Documentations Techniques*, 46, 1980, ORSTOM, Paris, 128 p.
- [2] O. OUCHTERLONY, *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 25, 1948, p. 115.

- [3] D. NOORDAM, *Identification of Plant Viruses*, Pudoc, Wageningen, 1973, 207 p.
- [4] M. C. PAUL, *Z. Natur. Forsch.*, 14b, 1959, p. 427-432.
- [5] A. GIBBS et B. D. HARRISON, *Plant Virology. The Principles*, E. Arnold, 1976, London, 292 p.
- [6] M. H. V. VAN REGENMORTEL et M. B. VON WECHMAR, *Virology*, 41, 1970, p. 330-338.
- [7] R. KOENIG, *Virology*, 72, 1976, p. 1-5.
- [8] K. R. BOCK, E. J. GUTHRIE et G. C. MEREDITH, *Annual Report E.A.A.F.R.O.*, 1977.
- [9] R. J. KLESSER, *Bothalia*, 7, (3), 1961, p. 497-519.
- [10] D. G. ROBERTSON, *Report on the Plant Pathology Division*, 1971, p. 16-18.
- [11] S. A. SHOYINKA, R. F. BOZARTH, J. REESE et H. W. ROSSEL, *Phytopathology*, 68, 1978, p. 693-699.
- [12] R. E. F. MATTHEWS, *C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses*, 230, 1980, 6 p.
- [13] H. A. SCOTT, *C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses*, 168, 1976, 3 p.
- [14] L. GIVORD et R. KOENIG, *C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses*, 128, 1974, 4 p.
- [15] A. J. GIBBS, *C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses*, 193, 1978, 4 p.

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