

INFECTION DE *NICOTIANA BENTHAMIANA*  
ET DE *MANIHOT ESCULENTA*  
PAR LE VIRUS DE LA MOSAÏQUE AFRICAINE DU MANIOC:  
ASPECTS ULTRASTRUCTURAUX

B. C. AHOHUENDO et S. SARKAR<sup>1</sup>

Résumé

Le manioc constitue une denrée alimentaire importante en Afrique. Mais il est infesté par beaucoup d'insectes dont le virus de la mosaïque. L'observation au microscope électronique de préparations de tissus de *Nicotiana benthamiana* (Domin) et de *Manihot esculenta* (Crantz) infectés par le virus de la mosaïque africaine du manioc n'a révélé aucune altération cytopathologique des noyaux de cellules infectées. Certaines modifications ultrastructurales comme l'hypertrophie, la désagrégation de composantes nucléaires ont été observées dans les cellules des plantes saines et infectées. Les altérations intracellulaires suivant les infections virales ne peuvent donc être considérées dans le cas présent comme un critère de diagnostic de la maladie.

Mots clés: géminivirus, altération cytopathologique, diagnostic.

INTRODUCTION

Le manioc, *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae), est la plus importante espèce cultivée du genre *Manihot* (FAUQUET & FARGETTE, 1990).

Plusieurs obstacles s'opposent à l'intégration du manioc dans un système moderne d'agriculture, parmi lesquels on relève le problème des cochenilles, des acariens, des bactérioses, des viroses (mosaïque africaine du manioc surtout). A elle seule, la mosaïque africaine provoque d'importantes chutes de rendement,

entre 30 et 95% (ANON, 1979; DENGEL, 1981; SEIF, 1982).

Depuis la première observation et la description de la maladie au Kenya (WARBURG, 1894), elle a fait l'objet de nombreuses études portant sur la connaissance des plantes hôtes, la transmission et la purification du virus (CHANT, 1958; BOCK & GUTHRIE, 1978; BOCK et al., 1978; WALTER, 1980; SEIF, 1981), l'épidémiologie de la maladie (BOCK, 1983; FARGETTE et al., 1985; FARGETTE & FAUQUET, 1986; 1988; FAUQUET et al., 1988). Mais peu de travaux ont été

<sup>1</sup>B. C. AHOHUENDO est professeur assistant à la Faculté des Sciences Agronomiques/Université Nationale du Bénin, et S. SARKAR est professeur à l'Institut de Phytomédecine, Université de Hohenheim, 70593 Stuttgart République Fédérale d'Allemagne.

réalisés sur les aspects ultrastructuraux des cellules infectées par le virus de la mosaïque africaine du manioc (ADEJARE & COUTTS, 1981).

Les modifications cytologiques, en particulier les inclusions cytoplasmiques, sont d'une grande importance dans le diagnostic des maladies virales, même si dans certains cas des inclusions cytoplasmiques similaires peuvent être induites par des virus appartenant à des groupes différents (EDWARDSON & CHRISTIE, 1978). Les géminivirus (virus à particules jumelées) engendrent des modifications principalement au niveau des noyaux des cellules infectées comme la présence de particules virales apparentes, de corps sous forme d'anneau (KIM & MARTIN, 1982; CHRISTIE et al., 1986; KIM et al., 1986), mais également des inclusions cytoplasmiques (CHERIF & RUSSO, 1983; KIM & FULTON, 1984; KIM et al., 1986; ROBERTS, 1989).

Cet article présente les résultats d'une étude ultrastructurale de cellules des plantes de *Nicotiana benthamiana* et de *Manihot esculenta* infectées par le virus de la mosaïque africaine du manioc.

#### MATERIEL ET METHODES

L'inoculum initial a été obtenu à partir de la variété BEN 86002, dans la collection de la Station de Recherche sur les Cultures Vivrières de Niaouli au Bénin. Cette variété a montré en effet des symptômes typiques de la mosaïque africaine du manioc décrits par

STOREY et NICHOLS (1938), et par CHANT (1958). Des feuilles atteintes ont été broyées dans du tampon tris-phosphate, 0,1 M, pH 8,4 et les extraits obtenus ont été inoculés à des plantes de *N. benthamiana* âgées de 4 semaines. Les plantes de *N. benthamiana* et celles des différentes variétés de manioc ont été cultivées à 25-30°C dans des serres à l'abri des insectes à l'Institut de Phyto-médecine de l'Université de Hohenheim (République Fédérale d'Allemagne). La maladie de la mosaïque africaine du manioc ne se transmettant pas par les semences botaniques du manioc, les plantes saines des variétés de manioc TMS 30001, TMS 60444 sont obtenues par semis en pots à partir de graines reçues de l'Institut International d'Agriculture Tropicale (IITA-Ibadan, Nigeria).

Les feuilles utilisées ont été choisies parmi les six premières feuilles apicales. Les jeunes feuilles apicales des plantes saines et des plantes inoculées de *N. benthamiana* ainsi que des feuilles des plantes saines et des plantes attaquées par la mosaïque de manioc ont été finement coupées et fixées pendant 90 mn dans une solution de glutaraldéhyde à 5% d'un tampon phosphate, pH 7,2 à la température ambiante. Les échantillons désaérés pendant 15 mn dans un vacuum, ont subi une deuxième fixation pendant 90 mn dans une solution d'osmium à 1%, après avoir été rincés trois fois, pendant 10 mn, dans un tampon cacodylate. Le matériel ainsi fixé a été finalement rincé trois fois, pendant 10 mn, dans de l'eau bi-distillée, déshydraté dans un gradient d'alcool et placé dans le milieu de SPURR (SPURR, 1969)

pendant 8 heures à 70°C. Les coupes ont été réalisées à l'aide d'un ultramicrotome (Omu 2, Firme Reichert, Vienne), montées sur des grilles de microscope électronique, puis colorées par de l'uranyle acétate aqueux (2%) et du citrate de plomb pendant 10 mn.

L'observation des coupes a été effectuée au microscope électronique EM 9 (Zeiss, Oberkochen).

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

Des constituants cellulaires typiques comme la mitochondrie, le noyau, la vacuole ont été observées dans les figures 1A et 2A. La mitochondrie, la vacuole, de même que la membrane nucléaire aussi bien dans les cellules de tissus de feuilles infectées que dans les cellules de tissus de feuilles saines ont été bien préservées et n'ont pas été affectées par l'infection virale (fig. 1A, 2A, 3A, 4A). Une désagrégation des nucléoles a été cependant remarquée au niveau des noyaux de certaines cellules, de même qu'une hypertrophie des noyaux a été visible dans les cellules non infectées chez *N. benthamiana* et *M. esculenta* (fig. 1A, 2A, 3A). La chromatine a été uniformément répartie dans les noyaux chez la plupart des cellules de feuilles saines et infectées.

Deux types de modifications sont couramment observées dans les cellules infectées par les géminivirus. Il s'agit des particules virales apparentes (KIM et al., 1978; FRANCKI et al., 1979) et des corps sous forme d'anneau

(KIM et al., 1978; KIM & FLORES, 1979). L'examen au microscope électronique de préparations de cellules de feuilles de *N. benthamiana* et de *M. esculenta* infectées par le virus de la mosaïque du manioc, un géminivirus, n'a pas révélé de telles structures (fig. 2A et B, 4A et B), mais plutôt des nucléoles désagrégés et des noyaux hypertrophiés qui ont été aussi présents chez des cellules issues de tissus des plantes non infectées. Bien que la présence de nucléoles désagrégés ainsi que de noyaux hypertrophiés ait été décrite chez certaines cellules infectées par des géminivirus (CHERIF & RUSSO, 1983; KIM & FULTON, 1984; KIM et al., 1986; ROBERTS, 1989), leur présence ici n'est pas d'origine virale, puisqu'ils ont été aussi observés chez les cellules des plantes non infectées. Cette présence de nucléoles désagrégés au niveau des cellules de tissus infectés et au niveau des cellules de tissus sains n'est pas dû non plus à la technique de coupes des échantillons. La fixation des tissus de feuilles dans une solution de glutaraldéhyde à 5% et dans une solution d'osmium à 1% est bien appropriée et conserve bien les ultrastructures cellulaires (HAMILTON et al., 1981). En dehors des six premières feuilles apicales, il est peu probant de mettre en évidence la présence du virus de la mosaïque africaine dans les feuilles âgées du manioc par test immuno-enzymatique (méthode ELISA, ou enzyme-linked immunosorbent assay) (FARGETTE et al., 1985), c'est pourquoi les jeunes feuilles apicales ont été utilisées. La non observation de particules virales apparentes dans les noyaux ainsi que des corps

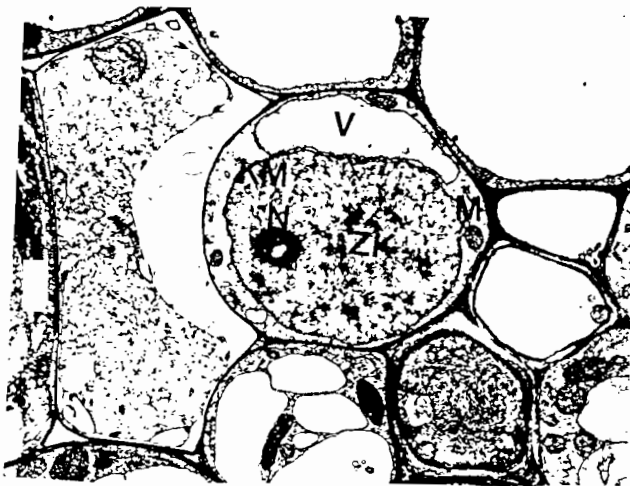


Fig. 1a: Photographie au microscope électronique (x 7.000) montrant des cellules de feuilles de *N. benthamiana* non inoculés.

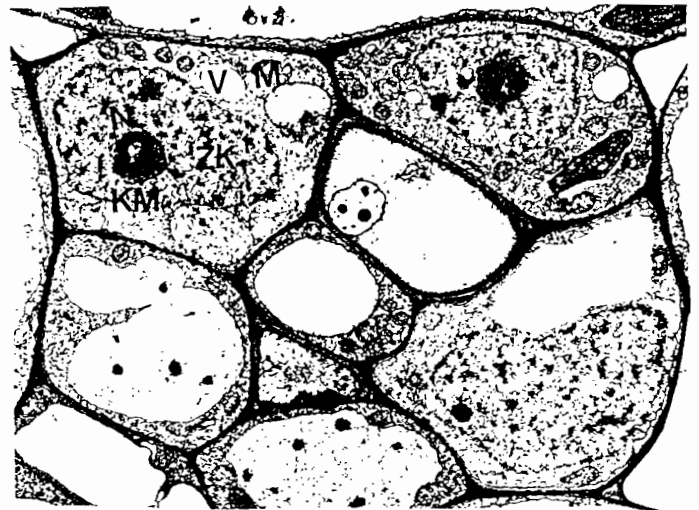


Fig. 2a: Photographie au microscope électronique (x 7.000) montrant des cellules de feuilles de *N. benthamiana* inoculés.

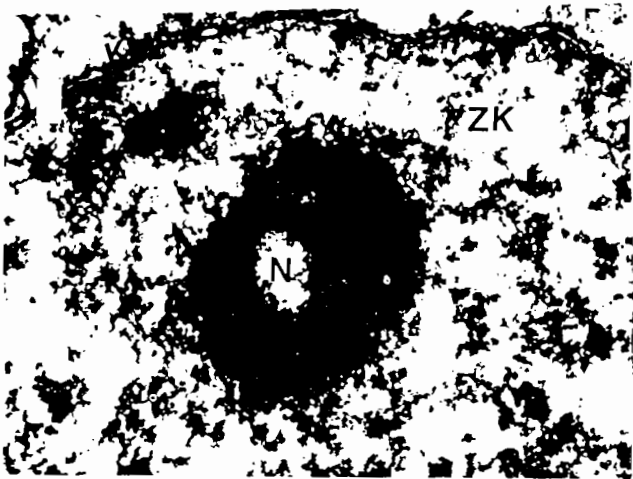


Fig. 1b: Photographie au microscope électronique (x 40.000) montrant des cellules de feuilles de *N. benthamiana* non inoculés

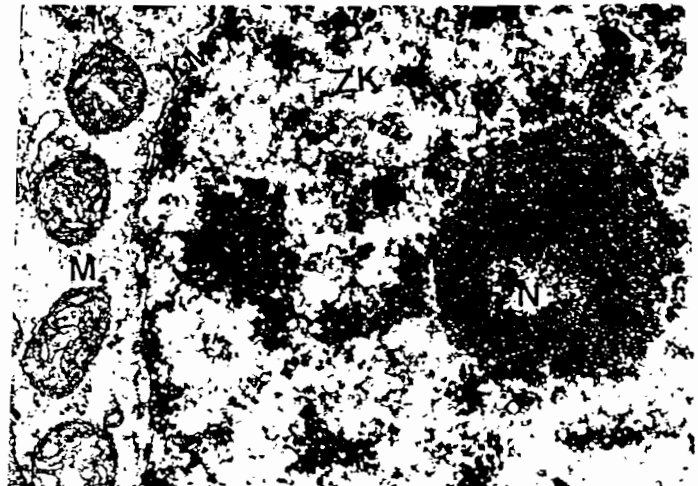


Fig. 2b: Photographie au microscope électronique (x 40.000) montrant des cellules de feuilles de *N. benthamiana* inoculés

ZK = noyau, KM = membrane nucléaire, M = mitochondrie, V = vacuole, N = nucléole

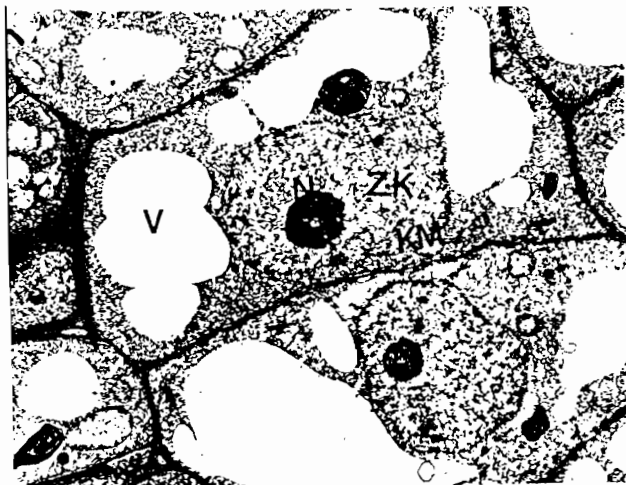


Fig. 3a: Photographie au microscope électronique (x 7.000) montrant des cellules de feuilles de *M. esculenta* sains



Fig. 4a: Photographie au microscope électronique (x 7.000) montrant des cellules de feuilles de *M. esculenta* infectées

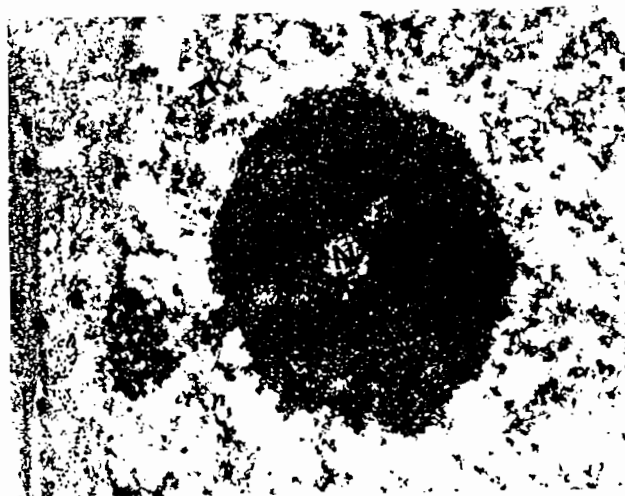


Fig. 3b: Photographie au microscope électronique (x 40.000) montrant des cellules de feuilles de *M. esculenta* sains

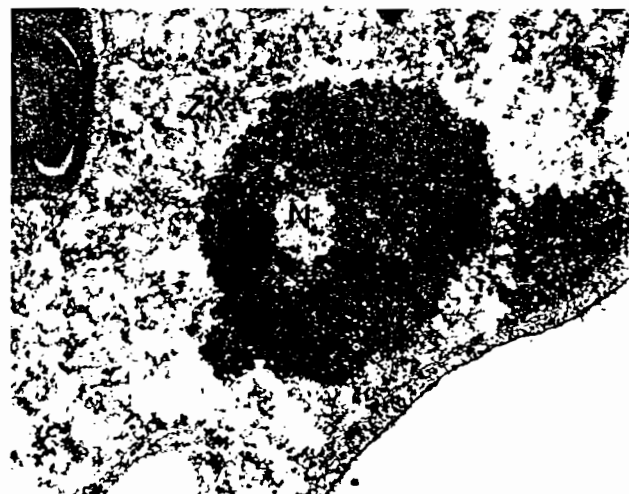


Fig. 3b: Photographie au microscope électronique (x 40.000) montrant des cellules de feuilles de *M. esculenta* infectées

ZK = noyau, KM = membrane nucléaire, M = mitochondrie, V = vacuole, N = nucléole

annelés a été probablement due à une distribution non homogène des particules virales au sein du matériel végétal infecté. BLAICH (communication personnelle) en étudiant les cellules de feuilles de vigne n'a pas pu mettre en évidence la présence d'inclusions cytoplasmiques dans les cellules de feuilles de vigne infectée par le virus de l'enroulement (GLRav) et a conclu à une distribution non homogène des particules virales au sein du matériel inspecté. Un tel phénomène pourrait bien se produire dans le cas présent.

Ainsi, malgré une infection virale effective chez *N. benthamiana* et *M. esculenta*, aucune des structures observées dans les cellules infectées par les géminivirus n'a pu être mise en évidence. Vu le temps excessivement long mais nécessaire à la fixation des échantillons, à leurs coupes et des résultats obtenus, on peut conclure que dans le cadre d'un diagnostic routinier, cette méthode n'est pas bien indiquée dans le cas du virus de la mosaïque africaine du manioc.

#### REMERCIEMENTS

Cette recherche a pu être réalisée grâce à une bourse d'étude octroyée par le Service Allemand des Echanges Universitaires (DAAD). Les boutures de manioc BEN 86002 ont été mises à notre disposition par la Station de Recherche sur les Cultures Vivrières de Niaouli (INRAB, République du Bénin) et les graines de manioc TMS 30001 et TMS 60444 par l'Institut International d'Agriculture Tropicale (IITA-Ibadan, Nigéria).

Nous remercions Mme G. MOLL pour la photographie, Mmes H. BRANDL et M. HARFOLD pour leur assistance technique au microscope électronique.

#### REFERENCES

1. ADEJARE, G.O. & R.H.A. COUTTS, 1981. Ultrastructural studies on *Nicotiana benthamiana* tissue following infection with a virus transmitted from mosaic-diseased nigerian cassava. *Phytopathologische Zeitschrift* 103: 87-92.
2. ANONYMOUS, 1979. Annual report of the International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigéria: 58.
3. BOCK, K.R., 1983. Epidemiology of cassava mosaic disease in Kenya. In: PLUMB, R.T. & J.M. THRESH (eds.); plant virus epidemiology. Blackwell Scientific Publications, Oxford: 337-347.
4. BOCK, K.R. & E.J. GUTHRIE, 1978. Transmission of African cassava mosaic by mechanical inoculation. *Plant Disease Reporter* 62 (2): 580-581.
5. BOCK, K.R., E.J. GUTHRIE & G. MEREDITH, 1978. Distribution, host range, properties and purification of cassava latent virus, a geminivirus. *Annals of Applied Biology* 90: 361-367.
6. CHANT, S.R., 1958. Studies on the transmission of cassava mosaic virus by *Bemisia Spp.*

- (Aleyrodidae). *Annals of Applied Biology* 46 (2): 210-215.
7. CHERIF, C. & M. RUSSO, 1983. Cytological evidence of the association of a geminivirus with the tomato yellow leaf curl disease in Tunisia. *Phytopathologische Zeitschrift* 108: 221-225.
8. CHRISTIE, R.G., N.-J. KO, B.W. FALK, E. HIEBERT, R. LASTRA, J. BIRD & K.S. KIM, 1986. Light microscopy of geminivirus-induced nuclear inclusion bodies. *Phytopathology* 76: 124-126.
9. DENGEL, H. J., 1981. Untersuchungen über das Auftreten des Imagines von *Bemisia tabaci* (Genn.) auf verschiedenen Manioksorten. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 88(6): 355-366.
10. EDWARDSON, J.R. & R.G. CHRISTIE, 1978. Use of virus-induced inclusions in classification and diagnosis. *Annual Review of Phytopathology* 16: 31-35.
11. FARGETTE, D., C. FAUQUET & J.-C. THOUVENEL, 1985. Field studies on the spread of african cassava mosaic. *Annals of Applied Biology* 106: 285-294.
12. FARGETTE, D., C. FAUQUET & J.-C. THOUVENEL, 1986. The virus, the vector, the plant and the reservoirs. In: proceeding of the workshop on the epidemiology of plant virus disease, Orlando Florida, 6-8 August 1986: VII7-VII9.
13. FARGETTE, D. & C. FAUQUET, 1988. A preliminary study on the influence of intercropping maize and cassava on the spread of african cassava mosaic virus by whiteflies. *Aspect of Applied Biology* 17: 195-202.
14. FAUQUET, C., D. FARGETTE & J.C. THOUVENEL, 1988. Some aspects of the epidemiology of african cassava mosaic virus in Ivory Coast. *Tropical Pest Management* 34 (1): 92-96.
15. FAUQUET, C. & D. FARGETTE, 1990. African cassava mosaic virus: etiology, epidemiology and control. *Plant Disease* 74 (2): 404-411.
16. FRANCKI, R.I.B., T. HATTA, N.E. GRYLLS & C.J. GRIRELL, 1979. The particle morphology and some other properties of chloris striate mosaic virus. *Annals of Applied Biology* 91: 51-59.
17. HAMILTON, R. I., J. R. EDWARDSON, R. I. B. FRANCKI, H. T. HSU, R. HULL, R. KOENIG & R. G. MILNE, 1981. Guidelines for the identification and characterization of plants viruses. *Journal of General Virology* 54: 223-241.
18. KIM, K.S., T.L. SHOCK & R.M. GOODMAN, 1978. Infection of *Phaseolus vulgaris* by bean golden mosaic virus: ultrastructural aspects. *Virology* 89: 22-23.
19. KIM, K.S. & E.M. FLORES, 1979. Nuclear changes associated with euphorbia mosaic virus transmitted by the whitefly. *Phytopathology* 69: 980-986.

- 
20. KIM, K.S. & E.M. MARTIN, 1982. Nuclear and extranucleolar perichromatin granules induced by euphorbia mosaic virus. *Phytopathology (Abstr.)* 72: 938.
21. KIM, K.S. & R.W. FULTON, 1984. Ultrastructure of *Datura stramonium* infected with an euphorbia virus suggestive of a whitefly-transmitted geminivirus. *Phytopathology* 74: 236-241.
22. KIM, K.S., J. BIRD, R.L. RODRIGUEZ, E.M. MARTIN & J. ESCUDERO, 1986. Ultrastructural studies of *Jatropha gossypifolia* infected with jatropha mosaic, whitefly-transmitted geminivirus. *Phytopathology* 76: 80-86.
23. ROBERTS, I.M., 1989. Indian cassava mosaic virus: ultrastructure of infected cells. *Journal of General Virology* 70: 2729-2739.
24. SEIF, A.A., 1981. Transmission of cassava mosaic virus by *Bemisia tabaci*. *Plant Disease* 65(7): 606-607.
25. SEIF, A.A., 1982. Effect of cassava mosaic virus on yield of cassava. *Plant Disease* 66(8): 661-662.
26. SPURR, A.R., 1969. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research* 26: 31-41.
27. STOREY, H.H. & R.F.W. NICHOLS, 1938. Studies of the mosaic diseases of cassava. *Annals of Applied Biology* 25: 790-806.
28. WALTER, B., 1980. Isolation and purification of a virus transmitted from mosaic-diseased cassava in the Ivory Coast. *Plant Disease* 64(11): 1040-1042.
29. WARBURG, O., 1894. Die Kulturpflanzen Usambaras. In: *Mitteilungen von Forschungsreisen-den und Gelehrten aus den Deutschen Schutzgebieten*: 131-199.
-