

INSTITUT SENEGALAIS DE RECHERCHES
AGRONOMIQUES (I.S.R.A.)
DIRECTION DE RECHERCHES SUR LES CULTURES
ET SYSTEMES PLUVIAUX (D.R.C.S.P.)

**CARACTERISATION DES VIRUS DU NIEBE
AU SENEGAL – ETUDE PRELIMINAIRE**

Mémoire présenté par
MBAYE NDIAYE
en vue de la titularisation
au poste de chercheur en
phytopathologie
à l'ISRA/CNRA Bamby

Maître de stage : D.F. MBAYE

Décembre 1991

REMERCIEMENTS

Je voudrais exprimer ici mes remerciements à :

Monsieur D.F MBAYE, qui n'a ménagé aucun effort pour m'aider à la réalisation de ce travail.

Monsieur A.A. MBAYE, pour ses conseils et ses suggestions. Les discussions avec lui ont été d'un grand apport.

Ngor DIAGNE et Ousseynou CISS, pour leur disponibilité.

Toute l'équipe du CRSP/Niébé.

L'USAID pour son soutien matériel et moral.

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : Développement comparatif des symptômes chez du niébé inoculé par différents isolats de virus	5
1 - Introduction	5
2 -- Matériel et, méthodes	8
2- 1 -- Prospection et collecte d'échantillons de niébé virosé	8
2-2 - Symptomatologie	9
3 - Résultats et Discussions	11
3-1 - Viroses du niébé	11
3-2 - Comportement du matériel végétal	16
CHAPITRE II - ETUDE EPIDEMIQUE DE QUELQUES ISOLATS DE VIRUS	23
1 - Introduction	23
2 - Matériel et méthodes	23
3 - Résultats et Discussions	24

CHAPITRE III - Identification des virus	30
1 - Introduction	30
2 Matériel et méthodes	31
2.1 Récolte et préparation d'échantillons de plantes virosées	31
2.2 - Identification des particules virales par sérologie	31
2.2.1 Test d'immunodiffusion en milieu solide (Ouchterlony)	32
2.2.2 - Test ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)	33
2.2.2.1 Préparation des extraits viroses	34
2.2.2.2 - Fixation des antigènes, du conjugué et du substrat	36
3 -- Résultats et Discussions	38
3.1 - Test d'immunodiffusion en milieu solide	38
3.2 - Identification des virus par test ELISA	38
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	42
BIBLIOGRAPHIE	43
ANNEXES	

RESUME

Les prospections effectuées en 1990 et 1991, ont montré l'importance et la variabilité des symptômes des viroses du niébé. Pour l'identification et la caractérisation des virus, 12 échantillons en 1990 et 54 échantillons en 1991 ont été analysés par le Test ELISA.

Les résultats partiels obtenus indiquent la présence du southern bean mosaic virus (SRMV), du cowpea aphid-borne virus (CABMV), du cowpea mottle virus (CPMoV), et du cowpea severe mosaic virus (CSMV). Ce dernier virus a été signalé pour la première fois au Sénégal et, en Afrique.

Les variétés IS86 275 et. IS86 283 nouvellement améliorées, sont susceptibles au CSMV.

L'étude de la transmission par semences des virus identifiés et la recherche de variétés différentielles est en cours.

INTRODUCTION

A l'instar d'autres cultures vivrières, le niébé *Vigna unguiculata* (1,) Walp occupe une place importante dans le régime alimentaire de nombreuses régions de l'Afrique.

Ses besoins limités en engrais azotés, sa tolérance à la sécheresse et son aptitude à produire dans un contexte défavorable lui confèrent une place de plus en plus importante en tant qu'aliment d'appoint et, de sécurité que de culture de rente au Sénégal.

Le niébé est une source importante d'énergie (57 % d'hydrate de carbone) et de protéine (23 %) (IITA, 1978). Il est cultivé généralement à cause de ses graines sèches, mais aussi les gousses vertes sont consommées comme du "haricot vert" et les feuilles utilisées en guise de salade et dans des sauces surtout en pays toucaleur.

Le niébé est cultivé largement dans plus de 16 pays africains avec une production totale de 3,42 millions de tonnes en 1987. Les principaux producteurs sont le Nigéria avec 1,05 millions de tonnes, le Niger 256 000 tonnes et le Burkina Fasso 180 000 tonnes (IITA, 1990).

Au Sénégal la production moyenne annuelle de niébé ces dix dernières années est de 30 000 tonnes. Malgré son importance et ses potentialités, les rendements obtenus en milieu paysan sont très bas (280-500 kg/ha) (Hall, 1991) et n'augmentent que peu par opposition à une croissance

démographique très rapide. Afin d'accroître le niveau de la productivité il importe à la fois d'améliorer le matériel végétal, de multiplier les aides et services techniques aux petits paysans, de pratiquer des prix incitatifs à la production et de réduire au maximum les pertes dues aux maladies et déprédateurs.

Plusieurs maladies sont, rencontrées sur niébé au Sénégal. Parmi elles les viroses et le chancre bactérien (*Xanthomonas campestris* pv *vignicola* (Burkholder) Dye) sont d'importance économique et peuvent occasionner plus de 60 % de perte de rendement quand les conditions du milieu sont favorables (GAIKWAD, 1988).

L'incidence économique des maladies à virus est mal connue en Afrique subsaharienne en général et au Sénégal en particulier. Cela s'explique par une situation scientifique (manque de laboratoires équipés et de personnels qualifiés en Phytovirologie) qui exclut toute étude approfondie des viroses sur place. Mais cela tient aussi et surtout au fait que les décideurs et les bailleurs de fonds ne sont pas suffisamment informés des pertes provoquées par les viroses. La lutte contre les virus se faisant par des moyens non commercialisés, (les viricides proprement dits faisant aujourd'hui défaut), la publicité autour de ces agents pathogènes ne se fait pas ou se fait mal.

Les recherches sur le niébé ont débuté vers les années 1950 au Centre National de Recherches Agricoles de Bambey et ont permis la vulgarisation de plusieurs variétés :

58-57 en 1962, Ndiambour et Mougne en 1969 et Bambey 21 en 1975.

Ces dernières années , 1 e Sénégal connait un déficit pluviométrique important. Celui-ci est très significatif dans la région de Louga où la moyenne des relevés pluviométriques à la station de Louga est passée de 447 mm/an de 1938-1968 à 272 mm/an de 1968-1987 (Hall & Pattel, 1987). De telles conditions de sécheresse, souvent associées à une mauvaise distribution temporelle et spatiale des pluies, rendent, toute autre culture que le niébé, aléatoire voire impossible dans cette zone. C'est pourquoi depuis 1983 les autorités du pays en collaboration avec le CRSP/Niébé, le SAFGRAD et le CILSS essayent, de promouvoir la culture de cette légumineuse dans les zones Nord et Centre---Nord du pays. Dans ce cadre, l'accent est mis particulièrement sur l'amélioration variétale avec comme toile de fond l'adaptation à la sécheresse et la résistance de la plante hôte aux viroses, chancre bactérien et bruches.

Des progrès importants ont été accomplis dans ce dernier volet avec la proposition pour la vulgarisation en 1991 de Mouride (IS 86-275) et la pré-vulgarisation de Diongoma (IS 86-283) et de Mélakh (IS 89-504). Ces variétés sont résistantes au chancre bactérien, à plusieurs virus, et Mouride est aussi tolérant aux bruches et au striga (CISSE et, NDTAYE, non publié).

L'objectif principal du programme étant d'introduire la résistance aux maladies dans les variétés sensibles en vulgarisation, nous criblons systématiquement les populations

en ségrégat i o n à partir de l A g é n é r a t i o n F₂ jusqu'à l'obtention de matériel homogène. Cependant. l'évaluation correcte de la résistance au virus nécessite leur identification. C'est pourquoi nous nous attachons dans ce travail à caractériser et, à identifier les principaux virus présents sur niébé au Sénégal. A cet effet, nous adopterons le plan de progression qui peut, se résumer comme suit, : dans une première étape nous comparons , du point de vue symptomatologie, en abri grillagé, la réaction de 5 cultivars de niébé vis-à-vis des virus échantillonnés à travers le Sénégal ; ensuite, en vue d'évaluer l'importance de chaque virus, des tests de pathogénicité différentielle sont, effectués. Enfin nous procédons à l'identification des virus isolés.

CHAPITRE J - DEVELOPPEMENT COMPARATIF DES SYMPTOMES CHEZ D U N 1 EBE 1 NOCULE PAR D 1 FFERENTS I SOLATS DE V I RUS

1 - INTRODUCTION

Le développement des symptômes de virus est fortemeni. influencé par l'agressivité des souches virales, par la sensibilité des cultivars de niébé, l'âge des plants au moment. de l'infection ainsi que les conditions du milieu (VAN LOON, 1983).

On a signalé la présence de plus de 25 virus du niébé de par le monde. Toutefois, ce sont pour la plupart des virus d'une importance mineure ou localisée. Il existe deux principaux virus en Afrique : le cowpea yellow mosaic virus (CYMV) et le cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) (Mal i & TOTTAPPILLY, 1986). Les autres virus, d'une importance moindre, sont, entre autre, le southern bean mosaic virus (SBMV), le cowpea mottle virus (CPMoV), le cucumber mosaic virus (CuMV) et le cowpea golden mosaic virus (CGMV).

La mosaïque jaune du niébé ou cowpea yellow mosaïc virus (CYMV) est transmise principalement par le galleruque Ootheca mutabilis Sahlb. Les thrips Sericothrips occipitalis Hood et Megalurothrips sjostedti Tryb., les coléoptères paraluperodes quaternus Fairmaire et Nematocerus acerbus FSt, les criquets Cantatops spissus Wlke et Zonacerus variegatus F. et le nématode Xiphinema basiri sont indiqués capables de transmettre le virus (Whitney & Gilmer, 1974).

La maladie se transmet aussi par inoculation de sève et dans une moindre mesure, par des semences (1-5 % de transmission) (Gilmer et al., 1974). Toutefois, la présence d'un foyer d'infection provenant d'une semence atteinte au sein d'une culture est, suffisante pour induire une incidence de 100% et ce, grâce à l'activité des vecteurs au moment, de la phase plantule. Des diminutions de rendement de 60-100 % causé par le CYMV ont été rapportés (Shoyinka, 1974 ; Gilmer et, al., 1974). Les symptômes développés varient selon les cultivars de niébé et les souches virales : absence de symptômes, marbrure verte très nette, mosaïque, déformation des limbes, cloquage, mort de la plante (Rliss et Robertson, 1971).

L'aphid-borne mosaic virus du niébé (CABMV) est, le virus du niébé le plus commun. On l'a signalé en Europe, en Afrique et, en Asie. Raheja et Leleji (1974) ont rapporté une perte totale de rendement chez du niébé irrigué infecté par le CABMV. La maladie se manifeste par une gamme très diversifiée de mosaïques et de marbrures, déformation et réduction foliaires, éclaircissement (inter) nervaire... etc... Les plants infectés deviennent rabougris et la floraison est retardée ou inhibée.

Le virus peut être transmis par l'inoculation de sève, par des semences et, par des aphides par le mode non persistant.. Le taux de transmission par graine dépend du cultivar et du variant de virus. Plusieurs espèces de la famille des Léguminosae, Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Cucurbitaceae et Solanaceae peuvent être infectées par le virus.

Le virus de la marbrure du niébé ou CPMoV se transmet très facilement d'une plante infectée à une plante saine par la transmission mécanique : frottement des feuilles l'une contre l'autre, contact, de feuilles avec des débris de culture, contact lors de manipulations culturales...etc... Par ailleurs le virus se transmet par le sol (soil-borne) (Hampton communication personnelle) par des semences (le taux de transmission dépend du cultivar et de l'intervalle de temps qui s'écoule entre l'infection et la floraison (Shoyinka et al., 1978)) et par des vecteurs, particulièrement par le galléruque Ootheca mutabilis (IITA, 1977).

Le CPMoV a une très large gamme d'hôtes. Il provoque une marbrure ou une mosaïque d'un jaune vif sur le niébé. Les feuilles des variétés sensibles se déforment, deviennent plus petites et la plante présente le symptôme type : "balai de sorcière". Une perte de rendement de plus de 75 % peut résulter d'une infection précoce (CMI/AAB description, 1979).

Le southern bean mosaic virus (SBMV) a été décrit au Nigéria (Shoyinka, et al., 1979) et au Ghana (Lamptey et Hamilton, 1974). Le virus se transmet par inoculation de sève et par semences (5-40 %) (Lamptey et Hamilton, 1974). Les symptômes de la maladie se caractérisent par un éclaircissement, des nervures, une mosaïque, une déformation et une réduction foliaires chez les variétés sensibles. Il existe plusieurs variants chez ce virus, qui sont à la base des divers symptômes observés (O'Hair, et al., 1981). Les souches du niébé de SBMV infectent difficilement le haricot. Des sources de résistance à ce virus sont identifiées.

La sévérité des symptômes exprimés, et par conséquent l'ampleur des dégâts provoqués, dépend du type de virus et de sa présence simultanée avec d'autres virus dans une infection mixte. Kuhn & Dawson (1973) ont rapporté une réduction de rendement de 43 % après une infection mixte de California Blackeye par cowpea chlorotic mottle virus (CCMV) et SBMV, alors qu'une infection simple par l'un des virus n'a pas provoqué de perte de rendement appréciable.

Dans ce chapitre nous étudierons l'expression des symptômes chez du niébé inoculé par des isolats de virus collectés dans différentes localités du Sénégal.

2 - MATERIEL ET METHODES

2.1 - Prospection et collectes d'échantillons de niébé virosé

En 1990 lors d'une des prospections de routine des maladies du niébé, nous avons observé des plantes sévèrement atteintes par des viroses (forte réduction et déformation foliaires, nanisme et jaunissement) en station et en champs paysans. Des échantillons de ces plants malades ont été prélevés pour étude en laboratoire en vue d'identifier les agents responsables de ces symptômes.

Du 11 au 15 septembre 1991 une prospection de maladies virale a été effectuée dans les zones de Kolda, Tamba, Mbacké, Kébémér, Louga, Thiès et Rambey avec comme objectif de déterminer la présence de viroses, d'évaluer la variabilité des

symptômes observés, leur extension géographique et l'intensité et la gravité des maladies (l'estimation du niveau des maladies était faite visuellement). En outre des échantillons ont été prélevés en vue d'identifier les agents responsables de ces symptômes.

Des plants de niébé montrant des symptômes typiques de viroses - rabougrissement, déformation et réduction foliaires, mosaïque ou marbrure, verdissement ou jaunissement. internervurial, chlorose, panachure, nanisme... etc...ont été récoltés. Ces échantillons ont été placés dans des sachets en polyéthylène, déposés dans une glacière contenant de la glace et transportés au laboratoire. Un numéro a été attribué à chaque échantillon et une description détaillée des symptômes observés ou une photographie des plantes malades faite (tableau 1)..

2.2 - Symptomatologie

L'estimation de l'agressivité des isolats, et par là les différences pouvant se marquer entre les variétés de niébé est basée sur l'observation des symptômes développés à partir des 7ème et 14ème jours après inoculation.

Les variétés et lignées utilisées sont : 58-57, B 21, TvX 3236 et IS 86-275 en 1990 ou 58-57, B21, IS 86-275, Mougne, Ndiambour et IS 86-283 en 1991. Chaque variété ou lignée est semée dans deux pots à raison de 4 graines par pot. L'inoculation a été effectuée au stade feuilles unifoliées par frottis avec du jus de plants malades contenant une petite

quantité de carborundum. Les plants ainsi inoculés sont lavés à l'eau déminéralisée et incubés en abri grillagé.

Des traitements hebdomadaires aux insecticides Karaté et Décisétaient effectués pour protéger les plants contre l'infestation par les insectes.

Les isolats ont été conservés par transferts réguliers sur 58-57 et, Mougne.

3 - RESULTATS ET DISCUSSIONS

3.1 -- Viroses du niébé

Durant la saison 1990 des plants présentant des symptômes variés de viroses ont été observés dans tous les sites visités. A Ndieng Diaw et à Sagatta le pourcentage de plants atteints était faible (inférieur à 5 %) dans la plupart, des cas. Cependant à Diourbel et à Thilmakha, on a observé de très forts pourcentages d'attaque {supérieur à 25 %} dans cinq champs paysans.

Au cours de notre prospection des maladies virales en 1991, il a été observé une très forte infestation par puceron Aphis craccivora Koch et consécutivement à cette atteinte, un développement important des viroses s'était produit dans presque tous les sites visités (Tableau 1). Sur 63 champs prospectés, seuls trois (à Keur Galo, à Keur Serigne Madina Mbacké et à Ndieyene) ont été apparemment sains. Les plus fortes infestations (75-100 % de plants attaqués) ont été enregistrés dans un champ de 58-57 à Kolda et dans un autre (variété locale) à Louga. La variabilité des symptômes observés d'une région à une autre était très faible. Par contre les types de symptômes et la sévérité de la maladie à l'intérieur, d'un champ étaient très hétérogènes. Les symptômes les plus fréquemment rencontrés sont caractéristiques au CSMV (sévère déformation et réduction foliaires, feuilles gaufrées), au CABMV (verdissement ou jaunissement inter-nervurriel) et au CPMoV (diverses marbrures ou panachures d'un jaune vif et, déformation foliaire). La présence effective

de ces virus dans les sites sondés doit cependant être confirmés par des tests plus fiables. En effet, la reconnaissance des symptômes comme méthode de diagnostic des virus est certes utile (surtout pour les agronomes des pays sous développés), mais insuffisante lorsqu'il faut établir les propriétés intrinsèques des virus.

Il est probable que la différence dans la sévérité et type de symptômes observés à l'intérieur d'un champ soit due à l'infection successive des plants à partir de quelques foyers primaires (semences infectées par divers virus). Cette hypothèse est étayée par la présence de beaucoup de jassides et de coléoptères sur le site de Kolda et de pucerons dans le champ de Louga ; ces insectes sont des vecteurs de virus.

Tableau 1 : Caractérisation des échantillons de niébé virosés récoltés dans différentes localités du Sénégal pendant l'hivernage 1991

Echantil- lons N°	Localité	Variété	Description des symptômes
1	Kolda	58-57	Déformation et réduction foliaire
2	Kolda	58-57	Verdissement nervaire (green vein banding)
3	Kolda	58-57	Marbrure jaune, cloquage et déformation foliaire
4	Kolda	58-57	Éclaircissement des nervures, Feuilles gauffrées
5	fambacounda	Local	Panachure jaune, cloquage des Feuilles
6	fambacounda	Local	Moucheture chlorotique
7	fambacounda	Local	Marbrure jaune et lésions nécrotiques
8	fambacounda	Local	Jaunissement nervaire
9	fambacounda	Local	Panachure jaune, déformation foliaire
10	fambacounda	Local	Marbrure jaune
11	Kounghueul	Local	Nanisme et déformation foliaire
12	Kounghueul	Local	Moucheture jaune, déformation foliaire et cloquage
13	Kounghueul	Local	Marbrure jaune
14	Kounghueul	Youngne	Nanisme, panachure jaune, déformation foliaire
15	Mbacké	Youngne	Mosaïque sévère déformation et réduction foliaires
16	Mbacké	Mougne	Déformation foliaire, cloquage
17	Mbacké	Mougne	Marbrure jaune et lésions nécrotiques
18	Mbacké	Mougne	Nanisme et rabougrissement
19	Mbacké	Mougne	"Green vein banding"
20	Mbacké	Mougne	Mosaïque légère sur les jeunes feuilles
21	Mbacké	Mougne	Nanisme et mosaïque verte
22	Mbacké	Mougne	Mosaïque jaune
23	Same Thiallé	Local	Panachure jaune, déformation et réduction foliaire, lésions nécrotiques

Tableau 1 (suite 1)

Echan illons N°	Localité	Variété	Description des symptômes
24	Same Thiallé	Local	Jaunissement internervaire et cloquage
25	Same Thiallé	Local	Marbrure jaune, feuilles cloquées
26	Missirah	Local	Panachure jaune-vif, feuilles gaufrées
27	Missirah	Local	Jaunissement. des plants
28	Missirah	Local	Réduction et, déformation foliaire
29	Ngayenne Missirah	Local	Mosaïque et déformation foliaire
30	Ngayenne Missirah	Local	Mosaïque, déformation foliaire et cloquage
31	Dimiya	Local	Marbrure jaune
32	Dimiya	Local	Panachure jaune et déformation foliaire
33	Dimiya	Local	Mosaïque légère et déformation foliaire
34	Louga	Local	Eclaircissement des nervures et, déformation foliaires
35	Louga	Local	Jaunissement internervaire et épaississement des feuilles
36	Louga	Local	Taches chlorotiques, sévère déformation foliaire
37	Louga	Local	Déformation foliaire
38	Louga	Local	Chlorose
39	Louga	Local	Moucheture jaune
40	Louga	Local	"Yellow vein banding"
41	Louga	Local	Eclaircissement internervaire et déformation foliaire
42	Keur Boumi	58-57	Marbrure jaune, verdissement nervaire
43	Keur Boumi	Local	Mosaïque légère
44	Ndeugary Ndiaye	Local	Eclaircissement des nervures
45	Kébémér	Local	Panachure chlorotique
46	Kébémér	Local	"Green vein banding" cloquage
47	Kaïré	Local	Panachure jaune-vif et déformation foliaire
48	Djré	Local	Marbrure jaune, déformation foliaire et lésions nécrotiques

Tableau 1 (suite 2)

Echan- tillons N°	Localité	Variété	Description des symptômes
49	Bambey	504	Taches chlorotiques
50	Bambey	504	Sévères déformation et réduction foliaire, taches chlorotiques
51	Bambey	Vita 1	Panachure jaune, déformation foliaire et lésions nécrotiques
52	Bambey	Mougine	Marbrure jaune
53	Bambey	58-57	Panachure chlorotique et déformation foliaire
54	Bambey	275 N	Jaunissement internervaire, déformation, boursouflures

En moyenne les zones de Louga et de Mbacké étaient les plus fortement attaquées, par contre les champs de la zone de Kébémér étaient relativement sains, à cause probablement des conditions particulièrement sèches qui ont prévalu cet hivernage dans ce département.

Les maladies à virus sont présentes dans toutes les zones de culture du niébé. Leur importance prend de l'ampleur à cause de l'utilisation de semences infectées par les paysans et du développement de leurs vecteurs ces dernières années.

La diversité des symptômes rencontrés suggère la présence de différents virus dans les parcelles visitées.

3.2 Comportement du matériel végétal

Les symptômes provoqués par les virus chez les végétaux sont très variés. Ils sont le résultat du développement d'un parasite spécifique et de la réaction physiologique de l'hôte donné, qui sont, deux facteurs, eux-mêmes, influencés par les conditions d'ambiance. Néanmoins, le choix d'une gamme d'hôtes bien appropriés permet d'identifier les variants de virus et leur éventuelle conservation.

Douze lots de niébé virosé prélevés en 1990 dans des champs paysans des régions de Diourbel, Thiès et Louga ont été analysés.

Les origines des différents isolats étudiés et leur pouvoir pathogène sur des variétés de niébé sont donnés au tableau 2.

Exceptés les numéros 3 et 11, tous les isolats ont provoqué des symptômes sur 13-57. Le 5 et le 10 se sont révélés cependant les plus agressifs en infectant trois des quatre cultivars testés. Aucun prélèvement n'a provoqué de symptômes sur Bambey 21. Les isolats 5 et 9 se sont montrés très virulents en provoquant un rapide jaunissement et mort des plantules. L'absence de symptômes chez les cultivars de niébé inoculés par les isolats 3 et 11 pourrait s'expliquer par le fait que ces virus ne soient pas transmis mécaniquement ou/et par l'incompétence de ces isolats à infecter ces cultivars.

Tab 1 eau 2 : Réaction des variétés de niébé envers des isolats de vi rus récoltés dans différentes local ités du Sénégal pendant, l ' hi vernage 1990.

Isolat viral N° d'identi- fication	Lieu de prélèvement	Variétés de niébé				
		58-57	B21	Tvx	3236	IS-275
1	Bambey	S	R		R	R
2	Rambey	S	R		L	S
3	Rambey	R	R		R	R
4	Rambey	S	R		R	R
5	Diourbel	s	R		L	S
6	Sagatta	s	R		R	S
7	Ndieng Diaw	S	R		L	R
8	Khombole	s	R		R	S
9	Thilmakha	S	R		R	R
10	Thilmakha	s	R		L	S
11	Thilmakha	R	R		R	R
12	Thilmakha	S	R		R	S

S = sensible (développement systémique)

R = résistante (sans symptôme)

L = lésion nécrotique locale

Compte tenu de la sensibilité accrue de IS 86-2'75 envers certains isolats (la variété était supposée résistante aux virus) et les conséquences que pourrait avoir l'existence d'un virus ou variante de virus auquel le matériel sélectionné résistant serait sensible, nous avons entrepris en 1991 de tester le comportement du matériel de sélection envers plusieurs prélèvements (isolats) (Tableau 3).

Tableau 3 : Réaction des variétés de niébé envers des isolats de virus récoltés dans différentes localités du Sénégal pendant l'hivernage 1991.

Isolements de virus		Cultivars de niébé					
Id'iden- tifica- tion	Lieu de pré- lèvement	Kouagne	Ndiam- bour	IS86-275 B21	IS86-283	58-57	
1	Kolda	S	R	R	MR	MR	S
2	Kolda	S	S	R	R	R	S
3	Kolda	S	MR	R	R	MS	MS
4	Kolda	S	S	R	R	R	S
5	Tamba	S	S	R	S	MS	S
6	Tamba	S	S	R	R	MS	S
7	Tamba	S	S	R	S	S	S
8	Tamba	S	MS	R	MR	R	S
9	Tamba	S	R	R	R	R	S
10	Tamba	S	MS	R	MR	R	S
11	Koungueul	S	MR	R	MR	R	S
12	Koungueul	S	S	R	R	R	S
13	Koungueul	R	MR	R	MR	R	S
14	Koungueul	R	S	R	R	R	S
15	Mbacké	S	S	R	R	R	S
16	Mbacké	S	S	R	R	R	S
17	Mbacké	S	R	R	MS	MS	S
18	Mbacké	S	MR	R	R	R	S
19	Mbacké	S	MR	R	MR	R	S
20	Mbacké	R	MU	R	R	R	-
21	Mbacké	R	MR	R	MR	R	-
22	Mbacké	S	S	R	R	R	S
23	Same Thiallé	R	MR	R	MR	S	

Tableau 3 : (suite 1)

Isolements de virus		Cultivars de niébé					
d'iden- tifica- tion	Lieu de pré- lèvement	Mougne	Ndiam- bour	IS86-275 B21	IS86-283	58-57	
24	Same Thiallé	R	R	R	R	R	R
25	Same Thiallé	S	R	R	S	S	S
26	Missirah (Touba)	R	R	R	R	R	R
27	Yissirah (Touba)	R	S	R	R	R	S
28	Yissirah (Touba)	MR	MR	R	R	MR	S
29	Missirah (Touba)	S	S	R	MR	R	-
30	Ngayenne (Missirah)	R	S	R	R	R	R
31	Dimiya	M S	M S	R	R	R	S
32	Dimiya	S	R	R	R	MR	S
33	Dimiya	S	R	R	R	R	R
34	Louga	S	M S	R	R	MR	MS
35	Louga	R	MR	R	R	R	S
36	Louga	S	S	R	R	R	
37	Louga	R	R	R	S	R	S
38	Louga	R	R	R	R	MR	R
39	Louga	R	M S	R	R	R	S
40	Louga	R	R	R	M S	R	S
41	Louga	R	MR	R	S	R	S
42	Louga	S	S	R	S	MR	S
43	Keur Boumi	R	R	R	R	R	R
44	Ndeugary Ndiaye	S	S	R	R	R	S
45	Kébémér	S	R	R	R	R	R
46	Kébémér	S	MR	R	R	R	MS

Tableau 3 (suite 2)

Isolements de virus		Yough	Cultivars de niébé				
% d'identification	Lieu de prélèvement,		Ndiambour	IS86-275 B21	IS86-283	58-57	
47	Kaïré	S	S	R	R	MR	S
48	Djiré	S	R	R	R	R	MR
49	Bambey	R	R	R	R	R	S
50	Bambey	MS	R	R	R	R	R
51	Bambey	S	S	R	S	R	S
52	Bambey	S	R	R	R	R	S
53	Bambey	S	S	R	R	R	S
54	Bambey	S	S	R	S	S	S

La réaction des variétés a été appréciée selon l'échelle suivante :

1. Pas de symptômes
2. Pas de réduction et de déformation foliaires, légère mosaïque
3. Pas de réduction, mais légère déformation foliaire 1/4 - 3/4 des folioles mosaïquées
4. Réduction et déformation foliaire, sévère chlorose
5. Sévère déformation et réduction foliaires, nanisme ou mort de la plante

Les notes 1 et 2 indiquent résistant (R), 3 moyennement résistant (MR), 4 moyennement sensible (MS) et 5 sensible

(-) Données non disponibles

Quatre variétés les plus cultivées et, deux autres proposées pour la vulgarisation ont été testées pour leur réaction envers 54 isolats de virus.

Les variétés Mouge et Ndiambouront, ont été sensibles à la quasi totalité des 54 prélèvements. Au total 10 prélèvements ont provoqué des symptômes sévères chez la variété IS 86-275, 9 chez IS 86-283 et 6 chez toutes les deux. IS 58-57 est sensible aux différents isolats, tandis que Mougne et Ndiambour sont sévèrement infectées respectivement par 67 % et 45 % des isolats. Aucun prélèvement n'a réussi à induire des symptômes chez B21.

En dehors de la IS 58-57 et B21, les variétés testées ont une utilité évidente en tant que plante-test. Un essai avec un plus grand nombre de variétés et une identification préalable des isolats auraient été nécessaires cependant pour pouvoir exploiter une éventuelle valeur différentielle de ces variétés.

Bien que parmi les 54 isolats il peut exister des virus qui ont été échantillonnés plusieurs fois (séparément ou en combinaison avec d'autres), il n'en demeure pas moins révélateurs des risques de dépiphytie qui peuvent provenir de l'utilisation des variétés disponibles.

Les isolats 17 et 54 ont provoqué des symptômes très sévères (importante déformation et réduction des dimensions foliaires) sur IS 86-275 et IS 86-283 confirmant la sensibilité déjà observée en champ de ces lignées.

Les isolats 24, 26 et 43 n'ont pas provoqué de symptômes en serre (suite à une inoculation mécanique) chez les variétés testées. Probablement c'est la mosaïque dorée du niébé qui est responsable de ces maladies. Cette hypothèse est corroborée par le jaunissement intense des plants, la déformation et le cloquage de leurs feuilles. Ces symptômes observés en champ sont typiques au "golden mosaic virus" du niébé.

De ces résultats il apparaît clair, que l'élaboration de variétés résistantes ne peut se faire de manière empirique (ce qui a été fait jusqu'à présent) en ignorant l'identité et les caractéristiques des virus contre lesquels on sélectionne. Pour conduire rationnellement une telle opération, il faudrait identifier les virus, inventorier les gènes de virulence présents dans la population pathogène et en suivre l'évolution.

CHAPITRE II - ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE DE QUELQUES ISOLATS DE VIRUS

1 INTRODUCTION

La performance en champ et le potentiel de rendement des semences de niébé, dépendent de plusieurs facteurs en particulier l'état sanitaire des graines. La plupart des virus du niébé sont transmis par semences. Le taux de transmission varie de moins de 1 % à plus de 50 % et est influencé par le génotype de l'hôte, la variante de virus et les conditions environnementales (Kuhn, 1989). Ces facteurs influencent aussi le développement et la dispersion des virus dans les cultures. Aussi connaissant le mode de transmission des virus, on comprendra facilement que leur propagation épidémique sera pratiquement identique à celle de leur vecteur. C'est pourquoi dans ce chapitre nous nous proposons d'étudier quelques éléments d'épidémiologie des viroses du niébé. Trois aspects sont considérés : la nature de l'inoculum (type d'isolats), le développement des maladies en plein champ et la qualité des semences produites.

2 - MATERIELS ET METHODES

Les cultivars et lignées de niébé 58-57, IS 86-275, IS 86-283, Mougne, Baye Ngagne, Ndiambour et Ife Brown ont été semés en champ par 2 lignes de 10 poquets. La distance entre les poquets était de 50 cm et celle entre les lignes 50 cm. Chaque variété a été inoculée avec 4 isolats de virus séparément au stade premières feuilles unifoliées. Une seconde

inoculation a été effectuée trois jours après la première pour éviter tout échappement, des plants aux virus. Les 4 isolats ont été retenus sur la base de leur pouvoir pathogène sur IS 86-275 et, IS 86-283. Les observations ont été effectuées 15, 30 et 45 jours après la deuxième inoculation et ont porté sur l'incidence et, la sévérité de la maladie. Celle-ci a été évaluée suivant l'échelle : 1, pas de symptômes visibles et 5, sévère déformation et réduction foliaires, nanisme ou mort de la plante, et puis exprimée en pourcentage.

A la maturité, chaque traitement. (couple cultivar de niébé - isolat de virus) était récolté séparément et, Le taux de transmission déterminé sur mille graines par semis en pots en serre et observation des symptômes au 14ème jour après semis. De même Le jus des plants ne présentant pas de symptômes a été extra-it et inoculé à 58-59 ou testé par la méthode ELISA. En outre des graines issues de pieds virosés de IS 86-275, IS 86-283, Ndiambour, Mougne ont été collectés des champs paysans et le taux de transmission des virus par semences, a été évalué.

3 - RESULTATS ET DISCUSSIONS

Des résultats sur la réaction des 7 cultivars de niébé envers les 4 prélèvements de virus retenus ont été résumés dans les tableaux 3, 4 et 5.

Pour les paramètres analysés (incidence et. sévérité) il a été observé une différence dans l'agressivité et la virulence des prélèvements. Dans tous les cas le prélèvement

54, a provoqué les symptômes les plus sévères et attaque toutes les variétés.

Les variétés Mougne et 58-57 se sont montrées très sensibles (85 et 74 % de plants atteints et 55 et 52 % de sévérité, respectivement) dès le 15ème jour après inoculation. Par contre Ife Bronw, IS 86-283 et IS 86-275 se sont révélées moyennement résistantes. Pendant, selon le type de couple considéré, nous avons noté quelques diversités dans les niveaux de maladies. Par exemple : prélèvement 1 n'a pas induit de maladie chez la TS 86-275, mais 37 % des plants de Ife Bronw ont été atteints par cet isolat. Par contre Ife Bronw n'est pas sensible au prélèvement 17 qui a attaqué modérément la IS 86-275.

L'incidence moyenne chez toutes les variétés (considérées séparément) n'a pas beaucoup évolué durant les trois dates sondées. Ce qui prouve l'efficacité du contrôle chimique des insectes dans la parcelle d'essai. La sévérité par contre, a été très forte 45ème jour après inoculation, en particulier chez les variétés Mougne et 58-57 au niveau de tous les isolats ou chez IS86-275 confrontée avec le prélèvement 54.

Mougne réagit, face au prélèvement 54 par un jaunissement, puis mort des plants, tandis que les plants des variétés 1886-275 et 58-57 infectés par le prélèvement 54 deviennent rabougris avec une floraison fortement inhibée.

La supériorité d'un point de vue résistance aux virus des variétés nouvellement améliorées est évidente. Cependant des mesures urgentes s'imposent pour juguler la menace que

constitue le prélèvement 5 qui pourrai t compromettre tous nos efforts de sélection.

La rési stance observée d e T f e Bronw est contradictoi re à sa forte sensibilité (aux virus) indiquée dans la littérature . cette résistance est due probabl ement à une di f férence entre les variants de virus existant au Nigeria et au Sénégal.

Tableau 3 : Influence du type de prélèvements sur l'incidence et la sévérité des viroses du niébé 15 jours après inoculations.

Cultivars de niébé	Type de prélèvements				
	1	2	17	54	xv
Incidence de la maladie en %					
Ndiambour	12	62	50	80	51
Baye Ngagne	40	58	37	54	47
Ifé Brown	37	0	0	42	20
Mougne	63	95	86	95	85
IS 275	0	11	14	71	24
IS 283	8	7	9	52	19
58-57	84	77	67	68	74
Xp*	35,	44	38	66	
Sévérité de la maladie en %					
Ndiambour	6	41	25	50	30
Baye Ngagne	20	28	20	36	23
Ifé Brown	9	0	0	23	8
Mougne	36	57	51	75	55
IS 275	0	7	7	47	15
IS 283	6	4	4	27	10
58-57	60	46	45	58	52
Xp*	20	26	22	45	

Xp - Incidence ou sévérité moyenne des prélèvements au niveau de toutes les variétés.

xv - Sensibilité moyenne des variétés ; toutes les souches confondues.

Tab 1 eau 4 : Influence du type de prélèvements sur l'incidence et la sévérité des viroses du niébé 30 jours après inoculations.

Cultivars de niébé	Type de prélèvements				
	1	2	17	54	Xv
	Incidence de la maladie en %				
Ndiambour	33	75	67	89	66
Baye Ngagne	47	42	37	58	46
Ife Brown	37	0	0	42	17
Mougne	91	95	92	97	94
IS 275	5	17	24	88	33
IS 283	9	15	11	77	33
58-57	100	55	88	70	78
Xp*	46	43	45	7 4	
	Sévérité de la maladie en %				
Ndiambour	12	47	29	50	34
Baye Ngagne	20	15	22	36	23
Ife Brown	9	0	0	21	8
Mougne	42	36	48	75	50
IS 275	1	7	9	48	16
IS 283	6	5	4	24	10
58-57	72	30	56	56	53
Xp*	23	20	24	44	

Xp - Agressivité moyenne des prélèvements au niveau de toutes les variétés.

Xv - Sensibilité moyenne des variétés ; toutes les souches confondues

Tableau 5 : Influence du type de prélèvements sur l'incidence et, la sévérité des viroses du niébé 45 jours après inoculations.

Cultivars de niébé	1	Type de prélèvements			
		2	17	54	Xv
	I	Incidence de la maladie en %			
Ndiambour	55	90	67	89	75
Baye Ngagne	100	100	81	86	92
Ife Brown	37	10	10	50	27
Mougne	97	100	97	97	98
IS 275	61	47	50	88	61
IS 283	8	18	22	82	32
58-57	100	55	93	89	90
Xp*	65	63	60	83	
		Sévérité de la maladie en %			
Ndiambour	30	65	47	52	48
Baye Ngagne	45	48	44	42	45
Ife Brown	25	2	5	23	14
Mougne	50	95	73	75	73
IS 275	39	19	21	43	30
IS 283	6	6	5	32	12
58-57	72	30	42	69	64
Xp*	37	41	37	41	

Xp - Agressivité moyenne des variétés. prélèvements au niveau de toutes

Xv - Sensibilité moyenne des variétés ; toutes les souches confondues

CHAPITRE III - IDENTIFICATION DES VIRUS

1 - INTRODUCTION

L'identification des virus utilise des techniques totalement différentes de ce que l'on connaît pour les autres organismes. Généralement, l'identification directe, sur le terrain, de l'agent infectieux est difficilement réalisable ; elle nécessite le service d'un spécialiste ainsi que des aménagements adéquats (serologie, microscope électronique, CDNA (DNA complémentaire)... etc...). Les techniques d'identification des virus sont basées sur la reconnaissance des symptômes (utilisation d'hôtes différentiels), la microscopie électronique appliquée aux tissus ou aux extraits des plantes malades, la chimie principalement appliquée à l'identification des protéines et de la sérologie.

Plusieurs virus sont soupçonnés d'être présents sur niébé au Sénégal. Mais seul, le southern bean mosaic virus (SBMV) a été identifié sur des échantillons de niébé provenant de Nioro, Séfa et Djibélor (Gaïkwad & Tottappilly, 1988). Son extension géographique et son importance économique n'ont pas été étudiées.

L'utilisation d'hôtes résistantes s'avère être le moyen le plus efficace pour contrôler les maladies virales. Cependant le succès d'un programme de sélection pour la résistance aux virus dépend de la connaissance de la diversité des gènes de virulence dans la population virale de la zone de cultures pour laquelle on sélectionne. Aussi nous nous

proposons d'identifier les 7 virus du niébé au Sénégal, préalable pour la réussite de toute stratégie de lutte élaborée contre ces pathogènes. Mais les résultats complets de l'étude sur l'identification des virus ne seront pas disponibles dans ce travail, compte tenu des contraintes liées au temps et aux moyens disponibles.

2 - MATERIEL ET METHODES

2.1 - Récolte et préparation d'échantillons de plantes virosées

Des échantillons ont été prélevés sur des tissus jeunes et âgés de plusieurs variétés de niébé dans différentes localités du pays (voire chapitre 1 Tableau 1). Tout l'éventail des symptômes observés a été décrit en détail.

En vue de l'expédition au laboratoire phytovirologique de Dr. R. Hampton à l'Etat d'Oregon aux Etats Unis, nous avons lacéré très finement Les feuilles de chaque prélèvement et ensuite, les avons disposé uniformément dans une boîte de Pétri, sur une gaze de nylon recouvrant des cristaux anhydres de chlorure de calcium (CaCl_2). La boîte scellée de bande adhésive (parafilm) a été placée à 5°C dans un réfrigérateur pendant 10 jours. Le matériel végétal devenu cassant, a été ensuite introduit dans un sachet de papier filtre bien fermé, lui même placé dans un tube contenant du CaCl_2 anhydre.

2.2 Identification des particules virales par sérologie

La méthode sérologique est basée sur la propriété qu'ont les protéines virales, de provoquer l'apparition de nouvelles substances protéiques, une fois injectées dans le sang d'un animal. Ces substances sont appelées anticorps ou antiserum et les protéines virales sont appelées antigènes. Les techniques classiques font appel à la précipitation de complexe antigène-anticorps. L'immunoglobuline avec ses deux sites anticorps peut jouer le rôle d'agent de pontage entre deux particules protéiques. Comme chaque particule peut se lier à plusieurs molécules d'anticorps, un réseau se forme. Quand la taille de cet agrégat dépasse un certain seuil, il devient spontanément insoluble. La formation de ce réseau requiert la mise en présence de concentrations moléculaires équivalentes de virus et d'anticorps.

2.2.1 - Test d'immunodiffusion en milieu solide (Ouchterlony)

La technique de la double diffusion en gelose consiste à faire diffuser l'antigène et les anticorps l'un vers l'autre dans un milieu gélifié. Elle a l'avantage de permettre des comparaisons entre souches ayant une partie antigénique commune et une partie distincte. Elle est malheureusement peu sensible (1-5 ng/ml de protéine) et ne peut s'appliquer aux grosses molécules (types potyvirus) qu'après dénaturation protéique (Spire, 1988).

500 ml d'eau distillée contenant 4 g d'agar-agar et 4,5 g de NaCl ont été portés à ébullition. Après refroidissement

jusqu'à 50°C, 1 g de sodium azide a été ajouté dans ce milieu, maintenu dans un bain Marie. A l'aide d'une seringue automatique, 15 ml de milieu sont déposés dans une boîte de Pétri. Après solidification, des puits (de diamètre 3 mm) ont été découpés dans le milieu. Ces puits sont disposés en groupe de 7, un au milieu et les 6 autres disposés tout au tour à égale distance entre eux (13 mm) et avec le puits central. Ainsi dans chaque boîte de Pétri 6 groupes de puits ont été matérialisés.

Des extraits de plants virosés ont été placés dans les puits périphériques (2 puits par isolat) et l'antisérum contre lequel le virus est testé, au puits central. Ainsi 54 échantillons ont été analysés contre le CYMV, le CPMoV et le SBMV (les antisérums de ces virus ont été mis à notre disposition par Dr. Rossel et ont été conservés à 5°C au réfrigérateur). Les observations pour la présence d'un reticulum entre les puits périphériques et le puits central ont été faites toutes les 24 heures durant une semaine. Les boîtes ont été incubées à la température ambiante.

2.2.2 - Test ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

A la différence du test, de diffusion sur gélose, la technique d'ELISA est aussi bien applicable chez les virus allongés que chez les virus sphériques. Par ailleurs, elle est, très sensible (10 pg/ml), soit 100 fois mieux que celle des techniques d'immunoprécipitation. Ceci permet de détecter un virus très faiblement concentré dans la plante ou un virus en

concentration plus élevée dans des organes aussi petits que les embryons de graines.

Des échantillons de plants virosés collectés dans différentes zones du pays ont été testés par rapport aux virus suivants : cucumber mosaic virus (CuMV), cowpea mottle virus (CPMoV), cowpea mild mottle virus (CPMMV), cowpea mosaic virus (CPMV), cowpea severe mosaic virus (CSMV), southern bean mosaic virus (SRMV) et cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV).

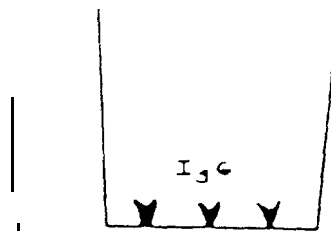
Les différentes opérations composant la technique de l'ELISA sont représentées à la figure 1.

2.2.2.1 - Préparation des ex-traits virosés

Un échantillon de tissus virosés de 0,3 g a été préparé par prélèvement de petits morceaux de tissus sur différentes feuilles de chaque plante. L'échantillon est placé dans un mortier propre contenant 3 ml de solution d'extraction (annexe 1) et bien broyé au pilon. Utilisant le pilon pour retenir le résidu végétal, le jus de plante est déposé dans un tube de 5 ml. Les 54 tubes ainsi préparés ont été numérotés, placés sur un portoir et incubés à 4°C dans un réfrigérateur pendant 18 heures.

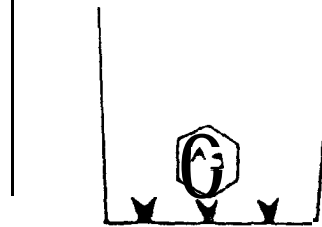
Cupule d'une plaque de
microtitration en polystyrène
(96 cupules)

1 - Adsorption spécifique
des globulines

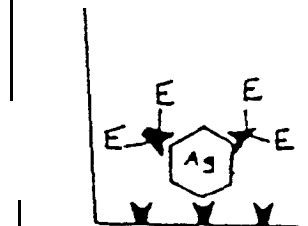


pH > 9

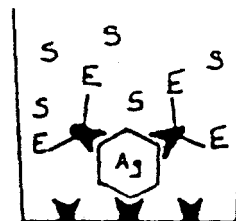
2 - Apport de l'extrait
virosé



3 - Apport des globulines
couplées à l'enzyme



4 - Apport du substrat
de l'enzyme



pH 29

Diagnostic visuel
ou mesure au
~~de~~ spectrophotomètre
à 405 nm

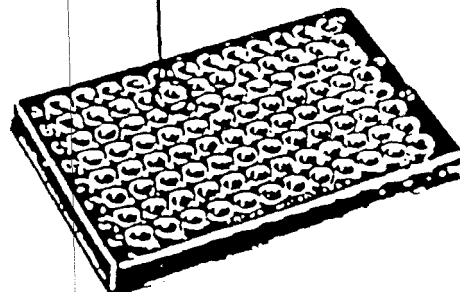


Figure 1 :

PRINCIPE DE L'ANALYSE
IMMUNO-ENZYMATIQUE TYPE E.L.I.S.A.

(CLARK M.F., ADAMS A.N., 1977)

A l'aide d'une micropipette, 0,1 ml de l'extrait, décanté a été prélevé et déposé dans un autre tube (pour éviter les contaminations, un embout stérilisé est utilisé pour chaque isolat). On dilue de 50 fois en ajoutant 4,9 ml de la solution de broyage à chaque tube. Le liquide a été ensuite bien mélangé par aspiration et expiration avec la micropipette.

2.2.2.2 Fixation des antigènes, du conjugué et du substrat

200 µl de cette dilution finale ont été apportés sur les cupules d'une plaque de microtitration (préalablement revêtues par des anticorps) suivant le schéma de la figure 2. Après que les 54 échantillons ont été déposés dans les groupes de 2 plaques de microtitration, elles ont été enfermées séparément dans un sac en polyéthylène et incubées 24 heures à 4°C dans un réfrigérateur.

A la fin de la période d'incubation, les plaques ont été retirées du réfrigérateur et l'extrait de plant versé dans l'évier. Les cupules ont été ensuite remplies par la solution de lavage (annexe 2) à l'aide d'une picette. Après trois minutes, les plaques ont été vidées dans l'évier et les puits remplis de nouveau avec la solution de lavage. A la fin du 3ème lavage, les plaques ont été séchées en les tapant légèrement contre un coussinet constitué d'une couche de 7 papiers absorbants.

Les plaques ainsi préparées ont été scellées séparément dans des sachets plastiques, enfermées dans une boîte en papier et expédiées au laboratoire du Dr R. Hampton pour

addition de conjugué (γ -globuline marqué) et, de substrat, et, lecture des résultats au spectrophotomètre à 405 nm.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\
B	\	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	\
C	\	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	\
D	\	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	\
E	\	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	\
F	\	21	22	23	24	25	26	27	\	\	\	\
G	\	21	22	23	24	25	26	27	\	\	\	\
H	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\
B	\	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	\
C	\	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	\
D	\	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	\
E	\	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	\
F	\	48	49	50	51	52	53	54	\	\	\	\
G	\	48	49	50	51	52	53	54	\	\	\	\
H	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\	\

Figure 2 : Dispositif de fixation des antigènes sur les plaques de microtitration. Chaque paire de plaques est utilisé pour tester un virus.

3 - RESULTATS ET DISCUSSIONS

3.1 - Test d'immunodiffusion en milieu solide

Tous les échantillons testés ont montré une réaction négative indiquant que le C_yMV, le SBMV et le CPMoV soit ne sont pas prédominants dans les zones sondées, soit les antisérums de ces virus ont subi une dénaturation intervenue durant leur transport ou leur conservation.

3.2 - Identification de virus par Test ELISA

Les virus rencontrés lors des prospections des maladies virales du niébé en 1990 sont rapportés au tableau 6.

Parmi les 12 échantillons testés 7 ont montré une réaction positive. Les virus CABMV, CSMV, CPMoV et le SBMV ont été identifiés formellement ; par contre, l'existence suspectée de CPMMV sur un échantillon de Bambey (B24) reste à confirmer. Le CSMV et le CABMV sont les plus couramment rencontrés (4 et 3 fois respectivement sur les 12 échantillons). Deux types d'infection mixtes - CSMV + CPMoV à Diourbel et CABMV + SBMV à Thilmakha ont été observés. Les symptômes produits par ces infections étaient très sévères. Un phénomène de synergisme entre les virus pourrait être à l'origine de la gravité des maladies observées. L'extension géographique du SBMV semble importante puisqu'il a déjà été signalé dans le Sud et le Centre Sud (Gaïkwad et Tottappilly, 1987). La présence déjà soupçonnée de CABMV au Sénégal (Pattel, 1984) est confirmée dans des échantillons provenant de Bambey et de Thilmakha. Pour la première fois le

CSMV et le CPMoV sont décrits au Sénégal. C'est, aussi pour la première fois que le CSMV est signalé en Afrique.

Le risque d'épidémie du SBMV est réel en Casamance, compte tenu de la présence massive de son vecteur principal *Ootheca mutabilis* dans cette zone.

Tableau 6 : Virus identifiés (par le test ELISA) dans certaines zones de culture du niébé au Sénégal.

Virus	Bb1*	Bb2	Dz	Bb3	Bb4	Sg	ND	Kh	Th1	Th2	Th3	Th4
CABMV	t								+			
CSMV		+	+		+			+				
SBMV									+			
CMMV												
CPMoV			+									

* Abréviations : Bb1 = échantillon prélevé sur 58-57 à Bambey

Bb2 = échantillon prélevé sur 58-57 à Bambeg

Dz = échantillon prélevé sur une variété locale à Diourbel

Bb3 = échantillon prélevé sur B89-479 à Bambey

Bb4 = échantillon prélevé sur B89-479 à Bambeg

Sg = échantillon prélevé sur une variété locale à Sagatta

ND = échantillon prélevé sur une variété locale à Ndieng Diaw

Kh = échantillon sur variété locale prélevée à Khombole

Th1 = échantillon prélevé sur une variété locale à Thilmakha

Th2 = échantillon prélevé sur une variété locale à Thilmakha

Th3 = échantillon prélevé sur une variété locale à Thilmakha

Th4 = échantillon prélevé sur une variété locale à Thilmakha

Un des moyens de lutte contre les virus transmis par vecteurs est l'éradication des sources d'inoculum primaire. Les lignées de niébé K-39, L-868, L-1552 et P-1476 sont signalées sensibles au CABMV en Inde, mais ne le transmettent pas par les semences (Mali et al., 1983). L'utilisation de telles variétés contribuerait à diminuer l'inoculum virulifère en réduisant le nombre de foyers primaires. (

La mosaïque sévère du niébé ou CSMV (De Jager, 1979) a été signalée dans plusieurs pays de l'Amérique tropicale et subtropicale. La présence de ce virus au Sénégal constitue un réel danger pour la production du niébé (De Jaer, 1979).

En effet, les particules virales sont très stables. Elles résistent à de hautes températures. L'activité infectieuse n'est détruite que par un chauffage des extraits à 70°C pendant 10 minutes. Elles persistent très longtemps dans les extraits (jus de plants) et dans les débris végétaux (CMI/AAB Description, 1979). Le virus est transmis mécaniquement par des semences et par des vecteurs (*Ceratomyza ruficornis* et *C. trifurcata*).

Le CSMV cause de graves dégâts sur niébé. Au Costa Rica des pertes de rendement de 84,8 ; 82,1 et 55,6 % ont été observées respectivement sur du niébé infecté avant, au moment et après la floraison (Calverde et al., 1982b).

Le virus provoque divers types de mosaïque et de marbrure, cloquage, déformation et réduction foliaires sévères. Les jeunes plantules inoculées développent une nécrose apicale et meurent rapidement.

Etant donné l'importance des dégâts causés par ce virus, une rapide identification des gènes de résistance et leur incorporation dans le matériel de sélection constituent une priorité pour le programme d'amélioration variétale du niébé. A ce propos, les génotypes TVU 612, TVU 1460-2, TVU 1948 et TVU 2480 développés à l'IIITA se sont avérés hautement, résistants à trois variants du virus (Arkansas ; Costa Rica et, Vénézuéla) (Fultonde Allen 1982). De même B21 semble être immune à l'isolat rencontré au Sénégal.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Cette étude préliminaire sur l'identification des viroses du niébé au Sénégal indique la présence du SBMV à Thiès, du CABMV à Thiès et Diourbel, du CPMoV à Diourbel et du CSMV à Thiès et à Diourbel. Ce dernier virus est signalé pour la première fois en Afrique et au Sénégal.

Des travaux d'isolement et de conservation de ces virus sont en cours, ainsi que la recherche de variétés indicatrices et différentielles.

Le matériel de sélection proposé à la vulgarisation semble être très sensible à la mosaïque sévère du niébé ou CSMV.

L'identification et la caractérisation des viroses du niébé seront poursuivies, de même que le suivi de la distribution et, du changement dans les populations virales.

Des sources de résistance au CSMV seront identifiées et les gènes de résistance incorporés dans la IS86 275 et la rS86 283.

L'étude de la transmission par semences des virus identifiés sera complétée pour une définition plus précise d'une stratégie de production de semences saines et une stabilisation des rendements des variétés sensibles.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - ALLEN, D.J., F.O. ANNO-NYAKO, J2.S. OCHIENG and M. RATINUM, 1981. Beetle transmission of cowpea mottle and southern bean mosaic virus in West Africa - Agric. (Trinidad) 58, 171-175.
- 2 - BLISS, F.A., and D.G. ROBERTSON, 1971. Genetic of host reaction in cowpea to cowpea yellow mosaic virus and cowpea mottle virus. Crop Sci., 11, 258-262.
- 3 - CALVERDE, R.A., R. MORENO, and R. GOMES, 1982b. Yield reduction in cowpea (*Vigna unguiculata* (L) Walp) infected with cowpea severe mosaic virus in Costa Rica. Turrialba 28, 90-91.
- 4 - CLARK, M.F. and A.N. ADAMS, 1977. Characteristics of the microplate method of Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay for the detection of plant viruses. J. Gen. virology 34, 475-483.
- 5 - CMI/AAB Description of plant viruses, 1979. Cowpea mottle virus- CAB/AAB July 1979 N° 212.
- 6 -- De JAGER, C.P., 1979. Cowpea severe mosaic virus. CMI/AAB - Description of plant viruses July 1979 N° 209.
- 7 FULTON, J.P., and D.J. ALLEN, 1982. Identification of resistance to cowpea severe mosaic virus. Tropical Agric. 59, 66-68.
- 8 - GAIKWAD, D.G., 1988. Annual report on cowpea pathology CNRA/Bambey, 34 P
- 9 - GAIKWAD, D.G., and G. TOTTAPPILLY, 1987. OCCURENCE OP southern bean mosaic virus on cowpea in Senegal. Phytopathology 120, a1-84.
- 10 GILMER, P.M., W.K. WHITNEY and P.I. WILLIAMS, 1974. Epidemiology and control of cowpea mosaic in western Nigeria. In : Proceeding of the first IITA Grain Legume Improvement Workshop, IITA, Tbadan, Nigeria, 1974, 325 P .

- 11 HALL, A.E., and P.N. PATEL, 1987. Cowpea improvement for semi arid regions of sub-saherian Africa, 279-290 pp. In : Proc. Tnt. Drought Symp. on food grain production in semi arid regions of sub-saharian Africa SAFGRAD, Nairobi, May, 1986.
- 12 HALL, A.E., 1991. Cowpea/CRSP project annual report. Senegal/University of California, Riverside, 23p
- 13 IITA, Ibadan, 1978, Training programme lecture on cowpea production.
- 14 IITA, Ibadan, 1990. Cowpea/Soybean Research and Technology Transfer Courses. Lecture on processing and utilisation of cowpea by C. Egun Williams.
- 15 IITA, Ibadan, 1990. Cowpea/Soybean Research and Technology Transfer Courses. Lecture on importance of cowpea in Africa by Ken Dashiell
- 16 IITA, 1977. Grain legume pathology. In 1976 report, International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan Nigeria, 1976.
- 17 - KUHN, C. W., 1989. Cowpea virus diseases in the United States - A status report 7-23 pp. In : proceeding of the second southernbean (cowpea) workshop, Nashville TN February 6, 1989.
- 18 - KUHN, C.W., and W.O. DAWSON, 1973. Multiplication and Pathogenesis of cowpea chlorotic mottle virus and southernbean mosaic virus in simple and double infections in cowpea - phytopathology 63 : 1380, 1385.
- 19 - LAMTEY, P.N.L and B.L. HAMILTON, 1974. A new cowpea strain of southern bean mosaic virus from Ghana. Phytopathology 64, 1100-1104.
- 20 - MALI, V.R., P.V. KHALIKAR and D.H. GANSHAL, 1983. Seed transmission of poty-and cucumo-virus in cowpea in India - Indian phytopathology 34, 521-522.
- 21 - MALI, V.R. and G. TOTTAPPILLY, 1986 Virus on cowpea in the tropics. Rev. Tropical plant pathology 3, 361-403.
- 22 - O'HAIR, S.K., J.C., MILLER, Jr, and R.W. TOLLER, 1981. Reaction of cowpea introduction to infection with the cowpea strain of southern bean mosaic virus. Plant Disease 65, 251-252.
- 23 - PATEL, P.N., 1984. Trip report on cowpea pathology. CNRA/Bambey, 9/3/- 20/3/1984 9p
- 24 - RACHIE, K.O. Introduction XXI PP. In : Cowpea Research, Production and utilisation - 1985. J. WILLEY and Sons Ltd. Chichester, Great Britain.

- 25 RAHEJA, A. K. and O. I. JELEJI, 1974. An aphid-borne mosaic: disease of irrigated cowpea in northern Nigeria. Plant disease 58, 1080-1084
- 26 SHOYINKA, S.A., 1974. Status of virus diseases of cowpea in Nigeria - In : Proceedings of the fifth IITA Grain Legume Improvement Workshop, International Institute of Tropical Agriculture Ibadan, Nigeria, 1974 - 325 p
- 27 SHOYINKA, S.A., R.F. BOZART, J. REES and M.W. ROSSEL, 1978. Cowpea mottle virus : a seed borne virus with distinctive properties infecting cowpea in Nigeria - Phytopathology 68, 693-699
- 28 SHOYINKA, S.A., R.F. BOZART, J. REES and B.O. OKUSANYA, 1979. Field occurrence and identification of southern bean mosaic virus (Cowpea strain) in Nigeria - Turrialba 29, 111-116.
- 29 - SPIRE, D. 1988. Présentation générale des techniques modernes de diagnostic. In : Le repérage précoce des maladies des plantes. Impact et conditions de développement des nouvelles techniques de diagnostic - Annales du colloque AP'PRIA. Paris 20-21 Janvier 1988 - EDI. APRIA pp. 176.
- 30 THOTTAPPILLY, G. and H.W. ROSSEL, 1985. Worldwide occurrence and distribution of virus diseases, 155-171 pp In : Cowpea Research, Production and Utilisation ed. by S.R. Sing and K.O. Rachie (London), John Wiley & Sons Chichester Great Britain
- 31 TSUCHIZAKI, T., K. YORA and M. ASSWAMA, 1970. Southern bean mosaic virus. CMI/AAB Descriptions of Plant viruses, July 1983 - N° 274.
- 32 VAN LOON, L.C., 1983. Mechanisms of resistance in virus infected plants, 123-190 pp. In : The dynamics of host defence. Academic press., Australia.
- 33 - WHITNEY, W.K. and R.M. GILMER, 1974. Insect vectors of cowpea mosaic in Nigeria. Ann. Rev. Appl. biology 77, 17-21.

A N N E X E S

Annexe 1 :

Composition de la solution d'extraction

PBS - 0.05 % Tween 20 - 2 % polyvinylpyrrolidon (PVP)

PBS (Tempon phosphate salin!) (pH 7.4)

8,0 g NaCl

0,2 g KH_2PO_4

2,9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

0,2 g KCl

0,2 NaN_3

Dissolution dans un litre d'eau distillée

Annexe 2 :

Composition de la solution de lavage

PBS + 0,05 % Tween 20