



UNIVERSITE DE OUAGADOUGOU

Unité de **F**ormation et de **R**echerche

Sciences de la Vie et de la Terre

(UFR-SVT)

Département de *Biochimie-Microbiologie*

(DBM)



THÈSE UNIQUE

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur ès Sciences

Spécialité : Sciences Biologiques Appliquées

Option : Biochimie-Microbiologie (Virologie)

Par

Fidèle TIENDREBEOGO

Maître ès Sciences

Sur le Thème:

**Caractérisation et aspects épidémiologiques des
Begomovirus infectant les plantes maraîchères et
le manioc au Burkina Faso**

Soutenue le Jeudi 18 Février 2010, à l'Université de Ouagadougou devant le Jury:

Président : Pr Alfred S. TRAORE, Professeur Titulaire, Université de Ouagadougou

Membres : Dr Jean-Michel LETT, Chercheur au CIRAD, Saint Pierre, La Réunion

Pr Irénée SOMDA, Maître de Conférences, IDR, Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso

Dr Oumar TRAORE, Maître de Recherches CNRST/INERA Ouagadougou

Pr Nicolas BARRO, Maître de Conférences, UFR-SVT, Université de Ouagadougou

DEDICACE

A ma grand-mère maternelle, Lucie qui m'a élevé,

*A ma mère Noëlie,
qui a été un roc de stabilité pendant toute ma vie,*

*A Aïda,
dont le courage et l'amour me soutiennent chaque jour.*

Sommaire

Préface du Président du RA-BIOTECH	vi
Remerciements.....	vii
Liste des articles et fiches techniques.....	ix
Liste des acronymes viraux.....	xi
Liste des abréviations.....	xii
Introduction générale	1

CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les cultures maraîchères et le manioc.....	5
1. Les espèces légumières.....	5
2. Le manioc (<i>Manihot esculenta</i> Crantz).....	5
3. Les contraintes à la production.....	6
II. Les principaux virus infectant les plantes maraîchères et le manioc.....	7
1. Les <i>Tymovirus</i> : Le virus de la mosaïque du gombo (OMV).....	7
2. Les <i>Potyvirus</i> : Le virus de la panachure du poivron (PVMV) et le virus la mosaïque nécrotique de la pomme de terre (PVY).....	8
3. Les <i>Tobamovirus</i> : Le virus de la mosaïque de la tomate (ToMV).....	8
4. Les <i>Potexvirus</i> : Le virus X de la pomme de terre (PVX).....	9
5. Les viroïdes : le Potato spindle tuber viroid et le viroïde du rabougrissement apical de la tomate (RAT).....	9
6. La famille des <i>Geminiviridae</i>	10
6.1. Le genre <i>Mastrevirus</i>	10
6.2. Le genre <i>Curtovirus</i>	11
6.3. Le genre <i>Topocuvirus</i>	12
6.4. Les <i>Begomovirus</i>	12
6.4.1. Organisation génomique et rôles des différentes protéines...	12
6.4.2. Réplication des <i>Begomovirus</i>	14
6.4.3. Variabilité génétique des <i>Begomovirus</i>	16
6.4.3.1. La mutation.....	16
6.4.3.2. La recombinaison et la pseudorecombinaison.....	17
6.5. L'insecte vecteur, <i>Bemisia tabaci</i> Gennadius.....	18
6.6. Hôtes et symptômes causés par les <i>Begomovirus</i>	19
6.7. Méthodes de diagnostic des <i>Begomovirus</i>	20
6.7.1. Le diagnostic par voie biologique : les plantes tests.....	20
6.7.2. Les tests sérologiques.....	21
6.7.3. Les tests moléculaires.....	21
7. Méthodes de lutte contre les <i>Begomovirus</i>	22
7.1. Pratiques culturales et lutte physique.....	22
7.2. Lutte chimique.....	23
7.3. Lutte génétique.....	23

CHAPITRE 2: MATERIEL ET METHODES

I. Matériel d'étude.....	25
1. La zone d'étude.....	25
2. Le matériel végétal.....	26
2.1. Les espèces cultivées.....	26
2.2. Les plantes adventices.....	26
2.3. Les plantes tests.....	26
II. Méthodologie.....	27
1. Collecte des échantillons et données épidémiologiques.....	27
1.1. Collecte et traitement des échantillons.....	27
1.2. Evaluation de l'incidence des maladies.....	27
1.3. Evaluation des pertes de récoltes : cas du gombo (<i>Abelmoschus</i> <i>esculentus</i>).....	27
2. Détection des virus par le test immunoenzymatique ELISA.....	28
3. Détection des <i>Begomovirus</i> par PCR.....	29
3.1. Extractions d'ADN.....	29
3.1.1. Extraction par le CTAB.....	29
3.1.2. Extraction à l'aide du Kit DNeasy de Qiagen.....	29
3.2. Amplifications par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)...	30
3.2.1. Amorces utilisées.....	30
3.2.2. Composition des mix et programmes PCR.....	30
3.3. Electrophorèse sur gel d'agarose.....	30
4. Séquençage direct des produits PCR.....	32
5. Clonage des génomes complets (ADN-A).....	32
5.1. Amplification par Rolling Circle Amplification (RCA).....	32
5.2. Digestion par des enzymes de restriction et ligation vecteur-insert..	33
5.3. Transformation des bactéries compétentes JM-109.....	34
5.4. Sélection des colonies et extraction plasmidique.....	34
6. Clonage des ADN satellites (ADN Beta et ADN-1).....	35
7. Séquençages des clones viraux.....	35
8. Traitement bioinformatique des séquences.....	36
9. Etude de l'infectivité des <i>Begomovirus</i> des piments/ poivrons.....	36
9.1. Construction du clone agroinfectieux.....	36
9.2. Agroinoculations.....	37

CHAPITRE 3: RESULTATS ET DISCUSSION

Principales viroses des plantes maraîchères au Burkina Faso

1. Identification et écologie des principales viroses.....	38
2. Article 1 : Principales maladies des plantes maraîchères au Burkina Faso :	
Symptômes et quelques aspects écologiques.....	40

Les *Begomovirus* : une nouvelles menaces pour la production des piments

au Burkina Faso	
1. Aspects généraux.....	53
2. Article 2 : Characterization of <i>Pepper yellow vein mali virus</i> in <i>Capsicum</i> sp. in Burkina Faso.....	55
3. Article 3 : Complete genomique sequences of <i>Tomato yellow leaf crumple virus</i> associated to pepper yellow vein disease in Burkina Faso...	62
Le okra leaf curl disease ou maladie de l'enroulement des feuilles du gombo (<i>Abelmoschus esculentus</i>)	
Caractérisation moléculaire des <i>Begomovirus</i> infectant le gombo	
1. Introduction.....	74
2. Article 4 : Molecular diversity of Cotton leaf curl Gezira virus isolates and their satellite DNAs associated with okra leaf curl disease in Burkina Faso.....	75
Les pertes de récoltes causées par les <i>Begomovirus</i> infectant le gombo (<i>Abelmoschus esculentus</i>)	
1. Introduction.....	102
2. Article 5 : Impact of okra leaf curl disease on morphology and yield of okra	102
Caractérisation des <i>Begomovirus</i> infectant le manioc (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) au Burkina Faso	
1. Introduction.....	108
2. Article 6 : Occurrence of East african cassava mosaic virus-Uganda (EACMV-UG) in Burkina Faso.....	108
Identification de quelques plantes sauvages hôtes de <i>Begomovirus</i> au Burkina Faso	
1. Introduction.....	111
2. Fiches techniques proposées en annexes sur chez chapitre.....	111
CHAPITRE 4 : DISCUSSION GENERALE	
1. Les virus infectant les plantes maraîchères au Burkina Faso : diversité et identité des espèces virales encore largement sous estimés.....	112
2. Les <i>Begomovirus</i> du Burkina Faso et leur organisation génomique.....	113
3. Pertes causées par les <i>Begomovirus</i> infectant le gombo.....	117
Conclusion générale et perspectives.....	118
Références bibliographiques.....	120
ANNEXES.....	140

PREFACE DU PRESIDENT DU RA-BIOTECH.

L'école Doctorale régionale de Ouagadougou offre une formation doctorale de biotechnologie dans ses options : Biotechnologie microbienne et cellulaire, Biotechnologie Animale et Biotechnologie végétale.

Elle regroupe la plupart des Universités de l'Afrique francophone sub-saharienne en un réseau : le Réseau Ouest Africain de Biotechnologie (RA-BIOTECH) fruit de la coopération inter-universitaire et dont le siège est au CRSBAN, à l'Université de Ouagadougou.

Les Universités et structures de formation des pays ci-dessous constituent les membres fondateurs de ce réseau : Bénin, Burkina Faso, Côte d'Ivoire, Guinée-Conakry, Mali, Niger, Togo et d'autres partenaires comme le Centre International de Recherche Développement sur l'Elevage en zone Sub-humide (CIRDES)-Bobo Dioulasso ; EISMV-Sénégal.

Ce réseau sous régional bénéficie de l'appui de plusieurs partenaires de l'enseignement supérieur : Association des Universités Africaines -AUA, UNESCO, Banque Mondiale, CAMES, Agence Universitaire de la Francophonie -AUF, Agence Africaine de Biotechnologie -AAB, etc.

L'école Doctorale que le réseau anime assure une formation de haut niveau à travers une recherche utilitaire sur plusieurs thématiques touchant la vie quotidienne des populations africaines. Cette école a permis au CRSBAN d'être érigé en pôle régional d'excellence en Biotechnologie d'une part par l'AUA et d'autre part par l'AUF. Elle accueille des étudiants de plus de 14 pays d'Afrique centrale et de l'Ouest.

Le réseau bénéficie aussi du soutien de certains spécialistes des biotechnologies des universités du Nord : Université de la méditerranée (France), Université Louis Pasteur de Strasbourg (France), Centre de Génétique Moléculaire de Gif-sur-Yvette-CNRS (Paris France), Université de Liège (Belgique), Faculté Universitaire de Gembloux (Belgique), Université de Rome, Université Agronomique de Wageningen .

L'importance des biotechnologies dans la résolution des problèmes de développement socioéconomiques des pays de l'Afrique sub-saharienne (Alimentation, Santé, Environnement, etc.) Justifie amplement la mise en place de cette formation. Elle est cogérée par un comité pédagogique international africain, constitué par des enseignants, des chercheurs, tous spécialistes dans les divers domaines des biotechnologies.

La mutualisation des expériences par toutes ces compétences est un atout majeur pour la formation des ressources humaines de qualité au profit du continent africain et de l'humanité.

Pr. Alfred S. TRAORE

*Professeur titulaire de Biochimie-Microbiologie
CRSBAN/UFR-SVT/Université de Ouagadougou*

REMERCIEMENTS

Ce travail a pu être réalisé grâce au soutien d'institutions et aux conseils de nombreuses personnes ; Il est également le fruit d'une collaboration internationale entre le Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire du CRSBAN (Burkina Faso), le Laboratoire de virologie et de Biotechnologie Végétale de l'INERA, CNRST (Burkina Faso) et le CIRAD, UMR 53 PVBMT CIRAD-Université de la Réunion, Pôle de Protection des Plantes, Saint Pierre, La Réunion, France.

Qu'il me soit permis de remercier:

Les autorités de l'Université de Ouagadougou en particulier la Direction de l'UFR/SVT. Je leur exprime toute ma reconnaissance.

Le Pr Alfred S. TRAORE, Directeur du Centre de Recherche en Sciences Biologiques Alimentaires et Nutritionnelles (CRSBAN), Responsable Académique des formations Doctorales en Biochimie et Microbiologie/Biotechnologies de l'Université de Ouagadougou, Président du Réseau Ouest Africain de Biotechnologies (RA-Biotech) et Directeur de cette thèse. Toute ma reconnaissance pour m'avoir accepté dans son Centre et de m'avoir confié ce thème qui a un intérêt capital.

Le Pr Nicolas BARRO, Maître de Conférences, Responsable du Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire /CRSBAN, second Directeur de cette thèse qui malgré ses multiples occupations a suivi ce travail depuis le DEA sur le sujet. Merci énormément pour le suivi quotidien et toute l'attention accordée à ce travail.

Le Dr Oumar TRAORE, Maître de Recherches au Laboratoire de Virologie et de Biotechnologie Végétale à l'INERA/CNRST, Co-Directeur de cette thèse pour avoir suivi au quotidien ce travail, son dévouement total à ce travail et pour toute sa disponibilité, même à domicile les week ends.

Le Dr Jean Michel LETI, Entomo-phytovirologue au CIRAD de l'Ile de la Réunion, second Co-Directeur pour son investissement dans la caractérisation moléculaire effectuée dans le laboratoire de Pathologie et de Génétique Moléculaire Microbienne, du Pôle de Protection des Plantes (3P). Jean-Mi grand merci à toi.

Le Pr Gnissa KONATE, Directeur de l'INERA, Responsable du Laboratoire de Virologie et de Biotechnologie Végétale, pour m'avoir accepté au sein de son équipe.

Le Dr Bernard REYNAUD, Chercheur HDR, Directeur UMR 53 PVBMT CIRAD, pour m'avoir accueilli au sein de son unité et aussi pour l'honneur qu'il m'a fait d'être rapporteur de cette thèse.

Le Dr Pierre LEFEUVRE pour la collaboration fructueuse et son implication dans les analyses moléculaires. Merci Pierre!

Mr Michel PARTIOT, représentant Afrique de l'Ouest du CIRAD pour avoir donné son accord pour mes différents séjours à Saint Pierre, Ile de La Réunion.

Je remercie très sincèrement le Dr Denis FARGETTE, Directeur de Recherches à l'IRD (Montpellier) pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse.

J'adresse mes très sincères remerciements au Pr Irénée SOMDA, Maître de Conférences à l'Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso, pour avoir accepté d'être rapporteur et de siéger au jury de cette thèse.

Je remercie les institutions et les partenaires financiers qui ont contribué à la réalisation de ce travail:

La Fondation Internationale pour la Science (IFS) pour avoir financé une partie de ce travail.

Le CIRAD (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement) pour le financement de mes séjours au 3P,

AIRFS-Sud, un programme du ministère français des Affaires étrangères et européennes dont la gestion a été confiée à l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD-DSF) pour avoir financé une partie des projections et aussi la finalisation de ce travail.

Mes remerciements vont à tous les Enseignant-Chercheurs du CRSBAN de l'Université de Ouagadougou: Pr Aboubakar S. OUATTARA, Pr Yves TRAORE, Dr Philippe A. NIKIEMA, Dr Cheik A. T. OUATTARA, Dr André Jules ILBOUDO, Dr Marcel D. BENGALY, Dr Ahy SAVADOGO, Dr Imaël N. BASSOLE pour l'encadrement pédagogique que j'ai reçu et aussi pour leurs conseils et leurs encouragements.

Tous mes sincères remerciements à Mr V.S. Edgar TRAORE pour sa contribution dans tous les travaux de terrain, à Mr James Bouma NEYA pour ses encouragements, à tous les techiciens du LVBV (INERA) notamment Doumacé ZERBO, Jean ZABRE et à toute l'équipe technique du CRSBAN.

Je remercie Mlle Murielle HOARREAU, technicienne au 3P pour toutes les activités de clonage et pour sa bonne humeur. Ce fut un grand plaisir de travailler avec toi Mumu! Que toute la begomo Dream Team retrouve ici mes très sincères remerciements, pour la bonne ambiance de travail, je pense notamment à Hélène DELATTE, Magali THIERRY, Frédéric PÉREFFARRES, Martial GRONDIN et Julie VILLEMOT. Betty et Mireille ce fut un grand plaisir de vous avoir connu et d'avoir partagé le même bureau avec vous.

Mes remerciements vont à tous les doctorants pour leur soutien: Inoussa MAÏÇA, Isidore O. Juste BONKOUNGOU, Raqjeta COMPAORE, Cheikna ZONGO, Marius SOMDA, Zara NIKIEMA, Léon NITIEMA, Assèta KAGAMBEGA, Oumar TRAORE. Merci et surtout bon courage à vous pour la suite de vos travaux,

Je remercie tous mes amis pour leurs encouragements et leurs multiples soutiens, Mr Moussa SANFO du laboratoire MDC/OMS de Ouagadougou, à Geoffroy OUEDRAOGO, Marc ZABRE, Nouhoun BELKO, Moussa COMPAORE, Ousseni DIALLO, Sébastien BOYER, Herwann THOVARAL, Sylvaine JEGO, Bui Thi Ngoc Lan, Suzy DELCOURT, Mathieu VIGNE, Azali Abdou HAMZA, Rosalie FUCH, Ludovic MAILLET, Aline ESCALON, Elisabeth DOUGARJA-QUESSARY, Paul AMOUROUX, Alexandra TRIAIRE. Merci à tous! Mes remerciements vont à toute ma famille et à ma belle famille pour le soutien au quotidien.

Merci à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Liste des articles et fiches techniques

a) Articles publiés

1. Barro N., **Tiendrébéogo F.**, Traoré A.S. et Konaté G. (2007). Principales viroses des plantes maraichères au Burkina Faso: symptômes et quelques aspects écologiques. *Ann. Bot. Afr. Ouest* **04**: 1-12.

2. **Fidèle Tiendrébéogo**, V.S. Edgar Traoré, Nicolas Barro, Alfred S. Traoré, Gnissa Konaté and Oumar Traoré (2008). Characterization of *Pepper yellow vein Mali virus* in *Capsicum* sp. in Burkina Faso. *Plant Pathology Journal* **7** (2): 155-161.

3. **F. Tiendrébéogo**, P. Lefeuvre, M. Hoareau, V. S. E. Traoré, N. Barro, B. Reynaud, A. S. Traoré, G. Konaté, O. Traoré and J. -M. Lett (2009). Occurrence of *East African cassava mosaic virus-Uganda* (EACMV-UG) in Burkina Faso. *Plant Pathology* **58**: 783.

4. **Fidèle Tiendrébéogo**, V.S. Edgar Traoré, Jean-Michel Lett, Nicolas Barro, Gnissa Konaté, Alfred S. Traoré & Oumar Traoré (2010). Impact of okra leaf curl disease on morphology and yield of okra. (*Crop Protection in press*).

5. **Fidèle Tiendrébéogo**, Pierre Lefeuvre, Murielle Hoareau, Julie Villemot, Gnissa Konaté, Alfred S. Traoré, Nicolas Barro, V.S. Edgar Traoré, Bernard Reynaud, Oumar Traoré & Jean-Michel Lett (2010). Molecular diversity of *Cotton leaf curl Gezira virus* isolates and their satellite DNAs associated with okra leaf curl disease in Burkina Faso. (*Virology journal in press*)

b) Article soumis

Fidèle Tiendrébéogo, Pierre Lefeuvre, Murielle Hoareau, V.S. Edgar Traoré, Nicolas Barro, Bernard Reynaud, Alfred S. Traoré, Gnissa Konaté, Jean-Michel Lett & Oumar Traoré (2010). Complete genomic sequences of *Tomato yellow leaf crumple virus* associated to pepper yellow vein disease in Burkina Faso. (**Soumis à Archives of Virology**).

c) Fiches techniques

1. Traoré E.V.S., **Tiendrébéogo F.**, Barro N., Allarangaye M.D., Traoré O., Konaté G. (2007). Le virus de l'enroulement du gombo en zone soudano-sahélienne. Maladies Virales des plantes cultivées au Sahel. Fiche Technique.
2. **Tiendrébéogo F.**, Barro N., Traoré O., Traoré E.V.S. (2007). Le virus de l'enroulement du poivron : une nouvelle menace pour les cultures de piments au Burkina Faso. Maladies Virales des plantes cultivées au Sahel. Fiche Technique.
3. Barro N., Traoré E.V.S., Traoré O., **Tiendrébéogo F.** (2007). Apparition du Papaya leaf curl virus chez le papayer au Burkina Faso. Maladies Virales des plantes cultivées au Sahel. Fiche Technique.
4. **Tiendrébéogo Fidèle**, Edgar V.S. Traoré, Nicolas Barro, Jean-Michel Lett, Alfred S. Traoré, Oumar Traoré (2009). L'espèce sauvage du manioc (*Manihot glaziovii*) hôte de l'ACMV au Burkina Faso. Fiche technique.
5. **Tiendrébéogo Fidèle**, Edgar V.S. Traoré, Jean-Michel Lett, Alfred S. Traoré, Nicolas Barro, Oumar Traoré (2009). Identification sérologique et moléculaire de *Begomovirus* sur deux herbes sauvages (*Sida acuta* et *Ageratum conyzoides*) et une plante ornementale (*Erythrina indica* var. *picta*) au Burkina Faso. Fiche technique.

Liste des acronymes viraux selon le comité international de taxonomie des virus

Acronyme	Dénomination du virus
ACMV	<i>African cassava mosaic virus</i>
APLV	<i>Andean potato latent virus</i>
BCTV	<i>Beet curly top virus</i>
BCTV	<i>Beet curly top virus</i>
BeYDV	<i>Bean yellow dwarf virus</i>
CLCuGV	<i>Cotton leaf curl Gezira virus</i>
EACMV-UG2	<i>East african cassava mosaic virus-Uganda 2</i>
EMV	<i>Eggplant mosaic virus</i>
HoLCrV	<i>Hollyhock leaf crumple virus</i>
MRMV	<i>Melon rugose mosaic virus</i>
MSV	<i>Maize streak virus</i>
OLCV	<i>Okra leaf curl virus</i>
OMV	<i>Okra mosaic virus</i>
PaLCV	<i>Papaya leaf curl virus</i>
PepLCV	<i>Pepper leaf curl virus</i>
PepYVMV	<i>Pepper yellow vein Mali virus</i>
PSTV	<i>Potato spindle tuber viroid</i>
PVMV	<i>Pepper veinal mottle virus</i>
PVX	<i>Potato virus X</i>
PVY	<i>Potato virus Y</i>
RAT	Viroïde du rabougrissement apical de la tomate
TEV	<i>Tobacco etch virus</i>
TGMV	<i>Tobacco golden mosaic virus</i>
TomLCV	<i>Tomato leaf curl virus</i>
ToMoV	<i>Tomato mottle virus</i>
ToMV	<i>Tomato mosaic virus</i>
ToYLCrV	<i>Tomato yellow leaf crumple virus</i>
TPCTV	<i>Tomato pseudo curly top virus</i>
TWNV	<i>Tomato white necrosis virus</i>
TYDV	<i>Tobacco yellow dwarf virus</i>
TYLCV	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>
TYLCV-Mld [RE]	<i>Tomato yellow leaf curl virus-Mild [Reunion]</i>
TYMV	<i>Turnip yellow mosaic virus</i>
VMG	<i>Virus de la mosaïque du gombo</i>
VMTom	<i>Virus de la mosaïque de la tomate</i>

Liste des abréviations

a) Organismes et institutions

AVRDC	The world vegetable center
CIRAD	Centre de coopération international en recherche agronomique pour le développement
CNRST	Centre National de la Recherche Scientifique et Technologique
CRSBAN	Centre de Recherche en Sciences biologiques Alimentaires et Nutritionnelles
DDBJ	DNA Data Bank of Japan
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
FAO	Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
GenBank	Banque de données génomiques des Etats-Unis d'Amérique
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses (Comité international de taxonomie des virus)
IFS	International Foundation for Science
INERA	Institut de l'environnement et de recherches agricoles
IRD	Institut de Recherche pour le Développement
NCBI	National Center of Biotechnology Information
RA-BIOTECH	Réseau ouest Africain de Biotechnologie
SCSAO	Secrétariat du Club du Sahel et de l'Afrique de l'Ouest
UFR/SVT	Unité de Formation et de Recherche/Sciences de la Vie et de la Terre

b) Autres abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADN-A	Composant A du génome des bégomovirus
ADN-B	Composant B du génome des bégomovirus
ADNsb	Acide désoxyribonucléique simple brin
ADNβ	Acide désoxyribonucléique β associé à certains bégomovirus
ARN	Acide Ribonucléique

bp	Paire de bases
CP	Protéine de Capside
dNTP	désoxynucléotide triphosphate
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (Test immunoenzymatique)
GAM-PAL	Anticorps de chèvre anti souris couplé à la phosphatase alcaline
Genn.	Gennadius
ID	Immuno-Diffusion
IgG	Immunoglobuline G
IR	Région intergénique
Kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
LB	Luria Broth
Mabs	Anticorps monoclonaux
mM	Millimolaire
NaCl	Chlorure de sodium
nm	Nanomètre
ORF	Open Reading Frames (Cadre ouverte de lecture)
PBS-T	Tampon phosphate salin-Tween
PCR	Polymerase Chain Reaction (Réaction de polymérisation en chaîne)
RCR	Réplication en Cercle Roulant
RDR	Réplication dépendante de la Recombinaison
Ren	Protéine activatrice de la réplication
Rep	Protéine de Réplication
RFLP	Polymorphisme de la longueur des fragments de restriction
RGK	Rifampicine Gentamicine Kanamycine
rpm	Rotation par minute
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
SCRI	Scottish Crops Research Institute
SDS	Dodécyl sulfate de sodium
Strep-PAL	Streptavidine-Phosphatase alcaline
TAE	Tris-Acétate-EDTA
TAS-ELISA	Triple Anticorps Sandwich-ELISA
TBE	Tris-Borate-EDTA
TE	Tris-EDTA
TrAp	Protéine activatrice de la transcription
UV	Ultra Violet
µl	Microlitre

Caractérisation et aspects épidémiologiques des *Begomovirus* infectant les plantes maraîchères et le manioc au Burkina Faso

Au cours de l'inventaire des maladies virales des plantes maraîchères au Burkina Faso, plusieurs symptômes ont été observés. L'utilisation du test ELISA (Enzyme Linked Immusorbant Assay) et des tests biologiques ont indiqué que ces symptômes sont causés par des virus appartenant à cinq groupes: *Tymovirus*, *Potyvirus*, *Tobamovirus*, *Potexvirus* et *Begomovirus*. Parmi ces groupes, celui des *Begomovirus* est le plus répandu sur les parcelles de production avec des incidences très élevées.

En effet, les *Begomovirus* appartiennent à la famille des *Geminiviridae* et sont transmis par une espèce d'aleurode: *Bemisia tabaci* [*Homoptera: Aleyrodidae*]. Ce groupe de virus sévit sur des cultures d'intérêt économique comme la tomate (*Lycopersicon esculentum*), le gombo (*Abelmoshus esculentus*), le manioc (*Manihot esculenta* Crantz), le piment (*Capsicum frutescens*), le poivron (*Capsicum annum*) etc.... Le test immunoenzymatique ELISA et les méthodes moléculaires de caractérisation ont permis d'établir la taxonomie définitive de quatre espèces de *Begomovirus*. Ce sont: le *Tomato yellow leaf crumple virus* (ToYLCrV) sur les piments/poivrons, le *Cotton leaf curl Guezira virus* (CLCuGV) sur le gombo, le *African cassava mosaic virus* (ACMV) et le *East African cassava mosaic virus-Uganda* (EACMV-UG) sur le manioc.

Le ToYLCrV et le CLCuGV sont des *Begomovirus* monopartites. Le ToYLCrV est associé à la maladie de jaunissement des nervures observée sur les piments/poivrons. Son rôle dans l'induction des symptômes observés n'est pas encore clairement défini. Quant au CLCuGV, il cause des symptômes de repliements foliaires sur le gombo et est généralement associé à des ADN satellites (ADN beta et ADN-1). L'ACMV et l'EACMV-UG causent des symptômes de mosaïque jaune plus ou moins sévères sur les feuilles de manioc. Les maladies ont été observées au Centre, Centre-Sud et Sud-Ouest du Burkina Faso.

L'impact du CLCuGV a été évalué sur une variété locale de gombo (*Man Yanga*) et sur quatre variétés commerciales (Clemson spineless, Indiana, F1 Lima et Volta). Les pertes moyennes sont significativement plus élevées chez le cultivar local (26-55%) que chez les cultivars commerciaux (4,4-9,6%). En conséquence, Les pertes économiques moyennes à l'hectare ont été estimées à plus de 5 millions de francs CFA chez le cultivar local et environ 1 million de francs CFA chez les cultivars commerciales.

Sur les plantes sauvages, l'ACMV a été caractérisé sur *Manihot glaziovii*. L'utilisation du test ELISA et de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a permis de détecter des *Begomovirus* sur *Sida acuta*, *Ageratum conyzoides* et sur une plante ornementale (*Erythrina indica* var. *picta*).

Mots clés: *Begomovirus*, ToYLCrV, CLCuGV, ACMV, EACMV-UG, caractérisation, taxonomie définitive, phylogénie, épidémiologie, pertes de récolte, plantes maraîchères, plantes sauvages, plante ornementale

Characterization and epidemiological aspects of Begomoviruses infecting vegetable crops and cassava in Burkina Faso

During the inventory of the viral diseases of the Vegetable crops in Burkina Faso, several symptoms have been observed. The use of the ELISA test (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) and some biological tests indicated that these symptoms are caused by viruses belonging to five groups: *Tymovirus*, *Potyvirus*, *Tobamovirus*, *Potexvirus* and *Begomovirus*. Among these groups, the one of the *Begomovirus* is the most widespread on the parcels of production with very high incidence.

Indeed, begomoviruses belong to the family *Geminiviridae* and are transmitted by the whitefly: *Bemisia tabaci* [Homoptera: Aleyrodidae]. This viral group rages on cultures of economic interest as tomato (*Lycopersicon esculentum*), okra (*Abelmoshus esculentus*), cassava (*Manihot esculenta* Crantz), hot pepper (*Capsicum frutescens*), sweet pepper (*Capsicum annuum*) etc.... Immunoenzymatic test ELISA and molecular methods of characterization permitted to establish the definitive taxonomy of four species of *Begomovirus*. These are: *Tomato yellow leaf crumple virus* (ToYLCrV) in hot pepper/sweet pepper, *Cotton leaf curl Gueziira virus* (CLCuGV) in okra, *African cassava mosaic virus* (ACMV) and *East African cassava mosaic virus-Uganda* (EACMV-UG) in cassava.

ToYLCrV and CLCuGV are monopartite begomoviruses. ToYLCrV is associated to the yellow vein disease observed on hot pepper/sweet pepper. Its role in the induction of the symptoms observed is not again clearly definite. As for the CLCuGV, it causes leaf curl symptoms on okra and is generally associated to DNA satellites (DNA-Beta and DNA-1). ACMV and EACMV-UG cause more or less yellow mosaic symptoms on cassava leaves. The diseases were observed in the Centre, Centre-Southern and Southern-Western in Burkina Faso.

The impact of CLCuGV was evaluated on local cultivar of okra (*Man Yanga*) and on four commercial cultivars (Clemson spineless, Indiana, F1 Lima and Volta). The overall yield losses were significantly higher in the local cultivar (26-55%) than in the commercial cultivars (4,4-9,6%). Consequently, the average economic yield losses for one hectare were estimated to more of 5 millions francs CFA in the local cultivar and about 1 million franc CFA in commercial cultivars.

In the wild plants, ACMV was characterized in *Manihot glaziovii*. The use of ELISA and polymerase chain reaction (PCR) was permitted to detect *Begomovirus* in *Sida acuta*, *Ageratum conyzoides* and in the ornamental plant (*Erythrina indica* var. *picta*).

Keywords: *Begomovirus*, ToYLCrV, CLCuGV, ACMV, EACMV-UG, Characterization, taxonomy definitively, phylogeny, epidemiology, Yield losses, Vegetable crops, wild plants, ornamental plant

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

Les virus phytopathogènes sont responsables de plusieurs infections plus ou moins graves sur les plantes (Smith, 1973). Les virus rencontrés fréquemment sur les végétaux appartiennent aux groupes suivants: *Tobamovirus*, *Potyvirus*, *Cucumovirus*, *Caulimovirus*, *Luteovirus*, *Tymovirus*, *Comovirus*, *Sobemovirus*, *Geminivirus*, *Rhabdovirus* et *Potexvirus* (Messiaen *et al.*, 1991). L'impact de l'infection par ces virus est considérable sur les rendements agricoles, la qualité des produits et leur valeur marchande. Les pertes causées par les maladies virales varient en fonction de l'espèce végétale, du virus responsable, de l'environnement ou d'un agencement de ces facteurs et sont souvent très élevées. Parmi ces virus, ceux de la famille des *Geminiviridae* ont émergé ces dernières années dans les régions tropicales du monde (Jones, 2003).

La famille des *Geminiviridae* est composée de virus phytopathogènes présentant de petites particules jumelles avec une ou deux molécules d'ADN simple brin comme génome (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000). Les membres de cette famille sont regroupés en quatre genres (*Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* et *Begomovirus*) qui diffèrent par l'organisation du génome, la gamme d'hôtes et les insectes vecteurs (Fauquet *et al.*, 2000). Les *Mastrevirus* et les *Curtovirus* sont transmis respectivement aux plantes monocotylédones et dicotylédones par des insectes de la famille des *Cicadellidae*. Le genre *Topocuvirus* est transmis par un insecte, *Micrutalis malleifera*. Le grand groupe de la famille des *Geminiviridae* est constitué par les *Begomovirus*. Le terme *Begomovirus* vient de "**Bean Golden Mosaic Virus**" et désigne les géminivirus transmis par les mouches blanches qui étaient précédemment les géminivirus du sous groupe III (Faria *et al.*, 1994). Les *Begomovirus* sont présents dans toutes les régions tropicales et subtropicales à travers le monde où ils causent des pertes de rendement sur un grand nombre de cultures (Moriones et Navas-Castillo, 2000; Morales et Anderson, 2001). Ces virus infectent fréquemment les plantes appartenant aux familles des *Cucurbitaceae*, des *Fabaceae*, des *Malvaceae*, des *Euphorbiaceae* et des *Solanaceae* en provoquant des symptômes de jaunissement, de mosaïque jaune, d'arrêt de croissance, de nanisme, de taches chlorotiques et des enroulements foliaires (Paximadis *et al.*, 1999). Les mauvaises herbes qui se développent à proximité des cultures hôtes manifestent parfois des symptômes similaires. Cependant, le rôle

de ces mauvaises herbes dans le maintien et la propagation des *Begomovirus* reste encore peu connu (McGovern *et al.*, 1994).

Au Burkina Faso, les travaux de pionniers réalisés par Chatenet (1989), Barro (1994) et Konaté *et al.* (1995) avaient rapportés quatre espèces virales de ce groupe sur des espèces végétales cultivées (tomate, gombo, manioc, tabac). De nos jours, la situation a changé et plusieurs maladies virales ont été recensées et sont associées au développement de la maraîcheculture (Barro *et al.*, 2007). En effet, dans le cadre de la sécurité alimentaire et la lutte contre la pauvreté, le Burkina Faso et plusieurs autres pays sahéliens ont engagé des politiques agricoles permettant un deuxième cycle de production agricole pendant la saison sèche (CSLP, 2004). Des programmes de petites irrigations villageoises ont été mis en place afin de rendre disponible l'eau nécessaire à ce type de production. Les récoltes de la saison sèche ont pour but de suppléer de façon substantielle celles de la saison pluvieuse et d'augmenter ainsi la production agricole globale du pays. Les principales plantes cultivées au cours de la saison sèche sont les céréales (*Zea mays* L. et *Oryza sativa* L. essentiellement) mais surtout les plantes maraîchères (*Lycopersicon esculentum*, *Capsicum frutescens*, *Capsicum annuum*, *Abelmoschus esculentus*, *Allium cepa* L., *Solanum melongena*, *Cucumis sativus* etc.) et les plantes à tubercules (principalement *Manihot esculenta* et *Ipomoea batatas*). Avec les conditions propices (variétés de plantes cultivées, climat, pratiques culturales) à la production maraîchère, on a assisté à une recrudescence de ces espèces bégomovirales dans plusieurs pays sahéliens dont le Burkina Faso. Cette recrudescence a été en partie attribuée à la pullulation de l'insecte vecteur (*Bemisia tabaci* Genn.) survenue dans toute la région Ouest africaine au cours des années 1997-1998 (Otoïdobi, 2003). Des symptômes plus sévères sont apparus sur plusieurs espèces de plantes maraîchères et fruitières avec des incidences de plus de 60% sur le gombo (*Abelmoschus esculentus*) et la tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Tiendrébégo, 2006). L'impact sur la production s'est aussitôt fait ressentir dans toute la région. Il faut cependant noter que les causes réelles sont en fait peu connues. Les effets des pratiques culturales comme la double culture et l'abondance de petits périmètres irrigués n'ont pas été évalués. De même, les espèces virales impliquées

dans les pertes de récoltes ne sont que partiellement connues (Barro, 1994; Konaté *et al.*, 1995).

Bien que les effets des maladies soient constatés par les producteurs et les agents d'encadrement agricoles, ces acteurs sont très peu informés des causes entraînant ces dégâts sur les cultures. Cela conduit parfois à l'utilisation à l'aveuglette de techniques de lutte comme l'application intense de pesticides adaptés ou non, avec des conséquences non maîtrisées sur l'environnement et la santé des populations.

Par ailleurs, la sérologie (ELISA) n'est pas appropriée pour la caractérisation des *Begomovirus* à cause de la difficulté d'obtenir de bonne concentration d'antisera et aussi du manque de spécificité des anticorps. En conséquence, les approches de diagnostic basées sur l'ADN, incluant l'amplification par PCR et le séquençage de l'ADN ont surplanté la sérologie dans la détection et l'identification des *Begomovirus* (Brown *et al.*, 2001). A cette difficulté de caractérisation s'ajoute une complexité moléculaire à prendre en compte. Cette complexité moléculaire est liée d'une part à la présence dans le groupe de *Begomovirus* bipartite (ADN-A et ADN-B), de monopartite (ADN-A), de monopartite avec des ADN satellites (ADN Beta et ADN-1) et d'autre part à la variabilité génétique de ces entités moléculaires (Mubin *et al.*, 2009). La variabilité est liée aux taux anormalement élevés des phénomènes de mutation et de recombinaison rencontrés au sein du groupe (Isnard *et al.*, 1998; Ge *et al.*, 2007; Duffy et Holmes, 2008).

Au regard de la complexité au sein du groupe, on se pose des questions sur la situation réelle des maladies à *Begomovirus* au Burkina Faso:

- Quelle est l'identité réelle (biologique, sérologique, moléculaire) des *Begomovirus* qui infectent les cultures et les plantes sauvages au Burkina Faso?
- Quels liens existent entre les caractéristiques biologiques, sérologiques et moléculaires des *Begomovirus* du Burkina Faso et ceux d'Afrique et d'ailleurs dans le monde?
- La recrudescence des maladies bégomovirales sur les plantes (tomate, piment/poivron, papayer, manioc, gombo) est-elle due à des souches et pathotypes virulents, variants génétiques?

- Quel est le rôle de *Bemisia tabaci* dans la propagation des *Begomovirus* au Burkina Faso?

Pour le contrôle des maladies bégomovirales rencontrées sur les cultures maraîchères, des travaux de caractérisation sont nécessaires. Nous apportons notre contribution à ces travaux de caractérisation par le présent travail intitulé : Caractérisation et aspects épidémiologiques des *Begomovirus* infectant les plantes maraîchères et le manioc au Burkina Faso.

Notre étude vise les objectifs suivants:

1. Objectif général

L'objectif général de ce travail est de contribuer à sécuriser durablement les productions agricoles en générant des informations scientifiques sur les *Begomovirus* au Burkina Faso.

2. Objectifs spécifiques

Plus spécifiquement, cette étude va consister à:

- Inventorier les principaux *Begomovirus* infectant les cultures (piment, poivron, gombo et manioc) au Burkina Faso;
- Déterminer l'identité moléculaire des principaux *Begomovirus* au Burkina Faso;
- Etablir la taxonomie définitive de ces *Begomovirus* du Burkina Faso;
- Elucider les aspects épidémiologiques (modes de maintien et de propagation) des maladies bégomovirales en relation avec les populations de *Bemisia tabaci*;
- Evaluer les pertes de récoltes causées par les *Begomovirus* essentiellement sur le gombo.

CHAPITRE 1:

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les cultures maraîchères et le manioc

1. Les espèces légumières

Les plantes maraîchères sont cultivées dans plusieurs parties du monde pour leurs importances socio-économiques et nutritionnelles. Plusieurs espèces maraîchères fournissent une diversité de légumes, de fruits et d'herbes pour l'alimentation humaine. En Afrique, la maraîcheculture s'intéresse surtout aux légumes suivants: la tomate (*Lycopersicon esculentum*), le piment (*Capsicum frutescens*), le poivron (*Capsicum annuum*), la courgette (*Cucurbita pepo*), l'oignon (*Allium cepa*), l'aubergine (*Solanum melongena*), le gombo (*Abelmoschus esculentus*), la carotte (*Daucus carota*), le chou (*Brassica oleracea*), le concombre (*Cucumis sativus*), la fraise (*Fragaria vesca*), le persil (*Petroselinum crispum*), le céleri (*Apium graveolens*), l'amaranthe (*Amaranthus* sp.), le corchorus (*Corchorus olitorius*), *Gynandropsis gynandra*, l'épinard (*Spinacia oleracea*), le navet (*Brassica rapa* L. subsp. *rapa*) etc. Ces plantes sont de très bonnes sources de vitamines, de protéines et de minéraux (AVRDC, 2004). Les conditions environnementales favorables et le climat propice, favorisent l'obtention de bon rendement avec ces cultures (Rice *et al.*, 1987).

Au Burkina Faso, les productions de gombo, d'oignon, de tomate et de piment sont évaluées respectivement à 27000, 18000, 11000 et 7700 tonnes (FAO, 2009). L'agriculture maraîchère est pratiquée dans les zones péri-urbaines et s'intensifie avec les politiques nationales récentes mises en œuvre dans le cadre de la sécurité alimentaire et de la lutte contre la pauvreté (CSLP, 2004). Ces politiques ont permis la construction de plusieurs micro-barrages et l'aménagement de parcelles agricoles à travers tout le pays afin de favoriser la pratique d'une agriculture en saison sèche. Autour donc de ces barrages, l'agriculture maraîchère occupe les producteurs durant les mois d'octobre à mai et constitue une source importante de revenus financiers.

2. Le manioc (*Manihot esculenta* Crantz)

Le manioc (*Manihot esculenta*) est l'une des plantes dont les tubercules sont très utilisés sous diverses formes dans l'alimentation humaine. Depuis son introduction au 16^{ème} siècle en Afrique de l'Ouest, puis indépendamment en Afrique de l'Est et à Madagascar au 18^{ème} siècle, la culture du manioc a gagné

rapidement tout le contient autour du 19^{ème} siècle (Fargette, 1987). Les surfaces cultivées augmentent chaque année et la production mondiale de manioc était estimée à plus de 232 millions de tonnes en 2008 dont plus de 118 millions de tonnes en Afrique (FAO, 2009).

Au Burkina Faso, le manioc a longtemps été cultivé sur des périmètres maraîchers pour l'autoconsommation. Au cours de ces dernières années, la culture à grande échelle de ce tubercule s'organise avec pour but de lutter contre la faim et la malnutrition. C'est ainsi que des projets et initiatives visant sa vulgarisation dans le Sud-Ouest du pays ont vu le jour. La production du manioc est estimée en 2008 à 4500 tonnes contre 2100 tonnes en 2007 (FAO, 2009).

3. Les contraintes à la production

Les faibles rendements agricoles des cultures en général et des cultures maraîchères en particulier sont dus à plusieurs facteurs biotiques et abiotiques. Ces derniers sont entre autres la faible performance des variétés cultivées, les insectes ravageurs et les différentes maladies parasitaires. En Afrique de l'Ouest, l'action des insectes, les maladies cryptogamiques, bactériennes et virales, sont nombreuses et diverses. Elles constituent une contrainte majeure à la production maraîchère (Barro, 1994). Plusieurs maladies causées par les champignons et les bactéries ont été rapportées sur les cultures maraîchères (Agrios, 1988; Messiaen *et al.*, 1991). Une des plus importantes bactérioses des plantes maraîchères est le flétrissement bactérien causé par *Ralstonia solanacearum* qui s'attaque à la tomate, à l'aubergine, à la pomme de terre et au poivron et cause la mort de la plante.

Par ailleurs, les nématodes dont les *Meloïdogyne*, les *Heterodera* et les *Ditylenchus* sont responsables de plusieurs infections sur les plantes maraîchères. Ces infections sont essentiellement des infections localisées aux racines. Elles se traduisent par des galles, des renflements, des lésions et des pourritures. Ces nématodes s'attaquent à plus de 2000 espèces de plantes et sont de véritables contraintes pour les cultures maraîchères dans les régions tropicales.

Enfin, certains insectes piqueurs suceurs comme les aleurodes (*Bemisia tabaci*, *Trialetrodes vaporariorum*) et les pucerons (*Aphis cracivora*) rencontrés

sur les plantes maraîchères sont des vecteurs capables de transmettre de graves viroses. Ces maladies virales sont la plupart du temps méconnues, mais elles causent d'énormes pertes de production (Varela, 1995).

Au Burkina Faso, un inventaire des virus infectant les plantes maraîchères et le manioc a permis d'identifier un viroïde et sept virus (Barro, 1994). Il s'agit : du viroïde du rabougrissement apical de la tomate (RAT), des virus de l'enroulement et du jaunissement des feuilles de la tomate (TYLCV), de la mosaïque de la tomate (ToMV ou VMTom), de la panachure du poivron (PVMV) (Konaté et Traoré, 1999), de l'enroulement des feuilles du gombo (OLCV) (Konaté *et al.*, 1995), de la mosaïque du gombo (OMV ou VMG) (Barro et Konaté, 1994), de la mosaïque africaine du manioc (ACMV) et du virus X de la pomme de terre (PVX) (Barro et Konaté, 1998). Ces virus constituent une grande menace pour l'obtention de bon rendement et rendent la pratique de l'agriculture maraîchère économiquement peu viable. Une meilleure connaissance des agents et leur contrôle seraient au profit de l'amélioration qualitative, quantitative des productions maraîchères.

II. Les principaux virus infectant les plantes maraîchères et le manioc

Dans les régions tropicales, les maladies virales des plantes cultivées sont très peu connues et étudiées. Cependant de nombreuses viroses sont signalées sur les cultures maraîchères à travers le monde.

1. Les *Tymovirus*: Le virus de la mosaïque du gombo (OMV)

Les *Tymovirus* avec les genres *Marafafivirus* et *Maculavirus* appartiennent à la famille des *Tymoviridae*. Le nom *Tymovirus* vient de "**Turnip yellow mosaic virus**", virus de la mosaïque jaune du navet qui est l'espèce type. La particule virale de symétrie icosaédrique de 30 nm est formée de 180 sous unités identiques de 20 kDa. Cette capsidie renferme une molécule d'ARN (6,3 kb) simple brin de polarité positive.

Le genre *Tymovirus* compte plus de 21 espèces virales dont certaines ont été identifiées sur des plantes maraîchères (Hirth et Givord, 1988; Martelli *et al.*, 2002). Il s'agit des virus: *Eggplant mosaic virus* (EMV), *Tomato white necrosis*

virus (TWNV), *Andean potato latent virus* (APLV), *Melon rugose mosaic virus* (MRMV), *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV) et *Okra mosaic virus* (OMV). Cette dernière a été identifiée au Burkina Faso (Barro, 1994; Barro et Konaté, 1994). Les *Tymovirus* causent des symptômes de mosaïque parfois jaune vif, de rabougrissement et de déformations des feuilles (Astier *et al.*, 2001).

2. Les *Potyvirus*: le virus de la panachure du poivron (PVMV) et le virus de la mosaïque nécrotique de la pomme de terre (PVY)

Les *Potyvirus* sont des virus phytopathogènes appartenant à la famille des *Potyviridae*. Cette famille comprend 6 genres dont le regroupement est fonction des similarités de structure et de séquence, et différents par leurs modes de transmission (Van Regenmortel *et al.*, 2000):

- par des pucerons selon le mode non persistant : genres *Potyvirus* et *Maculavirus* ;
- par des acariens : genres *Rymovirus* et *Tritimovirus*;
- par le champignon *Polymyxa graminis* : genre *Bymovirus*;
- par l'aleurode *Bemisia tabaci* : genre *Ipomovirus*.

Les *Potyvirus* se présentent sous forme de particules filamenteuses de symétrie hélicoïdale de 11 à 15 nm de diamètre. Les ARNs portent une protéine VPg de 24 kDa environ liée de façon covalente à l'extrémité 5' et un poly-A de longueur variable à l'extrémité 3'. Le groupe des *Potyvirus* comprend plus de 172 espèces virales et représente plus de 30% des virus de plantes connus. Les espèces PVMV et PVY ont été identifiées sur les piments et la pomme de terre au Burkina Faso (Konaté et Traoré, 1999; Traoré, 2002).

Les *Potyvirus* causent des maladies graves chez de nombreuses espèces végétales avec des symptômes très variés en raison de l'existence de très nombreuses souches (Astier *et al.*, 2001). Les pertes causées par ce groupe de virus sont importantes (Ward et Shukla, 1991).

3. Les *Tobamovirus*: Le virus de la mosaïque de la tomate (ToMV)

Le genre *Tobamovirus* compte plus de 22 espèces dont la plus connue et la plus étudiée est l'espèce type *Tobacco mosaic virus* (TMV) (Harrison et Wilson, 1999; Lewandowski, 2001). Le nom *Tobamovirus* dérive d'ailleurs de "**Tobacco**

mosaic virus", virus de la mosaïque du tabac. La particule virale est de symétrie hélicoïdale en forme de bâtonnet rigide de 300 nm environ sur 18 nm (Gibbs, 1977). Le matériel génétique est une molécule d'ARN de 6,4 kb, simple brin de polarité positive.

Les virus membres de ce groupe les plus fréquents sur les plantes maraîchères sont : le *Tobacco mosaic virus* (TMV), le *Tomato mosaic virus* (ToMV) qui a été signalé au Burkina Faso (Barro, 1994), le *Cucumber green mosaic virus* (CGMV) et le *Pepper mild mottle virus* (PMMV). Ils provoquent des symptômes de mosaïque parfois nécrotique (Astier *et al.*, 2001).

4. Les Potexvirus: Le virus X de la pomme de terre (PVX)

Le virus X de la pomme de terre ou "Potato virus X" (PVX) est le membre type du groupe des *Potexvirus* (Harrison *et al.*, 1971; Francki *et al.*, 1985). Ce virus a été signalé dans les tubercules et plantes de pomme de terre dans plusieurs régions du Burkina Faso (Barro, 1994; Barro et Konaté, 1998; Traoré, 2002). Les *Potexvirus* appartiennent à la famille des *Flexiviridae* (Adams *et al.*, 2004) et s'attaquent généralement aux plantes de la famille des *Solanaceae* dont la pomme de terre, le tabac, l'aubergine et la tomate. La particule virale est flexueuse de 13 x 470-530 nm et de symétrie hélicoïdale. Le génome viral est un ARN simple brin positif (6,4 kb) protégé par une coque protéique (Lesemann et Koenig, 1977; Koenig et Lesemann, 1978; Astier *et al.*, 2001).

Le PVX seul cause des symptômes légers; cependant, il est souvent en co-infection avec des *Potyvirus* comme le Potato virus Y (PVY) (Rochow et Ross, 1955; Vance, 1991), *Tobacco vein mottling virus* (TVMV) ou *Tobacco etch virus* (TEV) (Vance *et al.*, 1995). Les symptômes sont alors plus sévères avec des pertes énormes de récoltes sur les plantes infectées.

5. Les viroïdes: Le "Potato spindle tuber viroid" et le Viroïde du rabougrissement apical de la tomate (RAT)

Les viroïdes sont les plus petits acides nucléiques infectieux pathogènes connus actuellement. La structure des viroïdes est en apparence très simple: un ARN simple brin, circulaire, de petite taille, soit de 246 à 399 nucléotides (Astier *et al.*, 2001).

Le PSTV et le RAT appartiennent au genre *Pospiviroids* de la famille des *Pospiviroidae* (Flores *et al.*, 1998). Ce groupe est composé de plusieurs autres membres avec seulement une petite molécule d'ARN nue (Diener, 1971; Diener et Smith, 1973). Les symptômes provoqués par les viroïdes ressemblent beaucoup à ceux induits par les virus, avec souvent un rabougrissement très marqué. Des symptômes similaires avec les mêmes caractéristiques biologiques de transmission ont été observés sur la tomate au Burkina Faso (Barro, 1994; Barro *et al.*, 2007).

6. La famille des *Geminiviridae*

Les *Geminiviridae* sont des virus phytopathogènes qui infectent une large gamme de plantes à travers le monde en causant des pertes de rendement important (Mansoor *et al.*, 2003a). Ce sont des virus à ADN simple brin circulaire avec une particule icosaédrale d'approximativement 20 x 30 nm (Lazarowitz, 1992; Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000). Cette famille comprend quatre (4) genres (*Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* et *Begomovirus*) qui se distinguent par la structure du génome, le vecteur et la gamme d'hôtes (Fauquet *et al.*, 2003; Stanley *et al.*, 2005) (**Figure 1**).

6.1. Le genre *Mastrevirus*

Ce genre avec pour espèce type le *Maize streak virus* (MSV) possède un génome monopartite de 2,6 à 2,8 kb comportant quatre gènes (V1, V2 et C1, C2). Les ORFs V1 et V2 sont lus sur le transcrit dans le sens viral tandis que les ORFs C1 et C2 le sont dans le sens complémentaire (**Figure 1**). Les *Mastrevirus* sont surtout transmis aux plantes monocotylédones, en occurrence le maïs, par *Cicadulina spp.* mais on en connaît d'autres (au moins 2) qui infectent des dicotylédones (*Tobacco yellow dwarf virus*, TYDV ; *Bean yellow dwarf virus*, BeYDV) (Astier *et al.*, 2001). En Afrique subsaharienne, les mauvaises herbes sont hôtes du MSV rendant le virus endémique avec des pertes avoisinant 100% sur le maïs (Thottappilly, 1992). Le MSV est très répandu dans les régions productrices de maïs du Burkina Faso (Traoré, 1993).

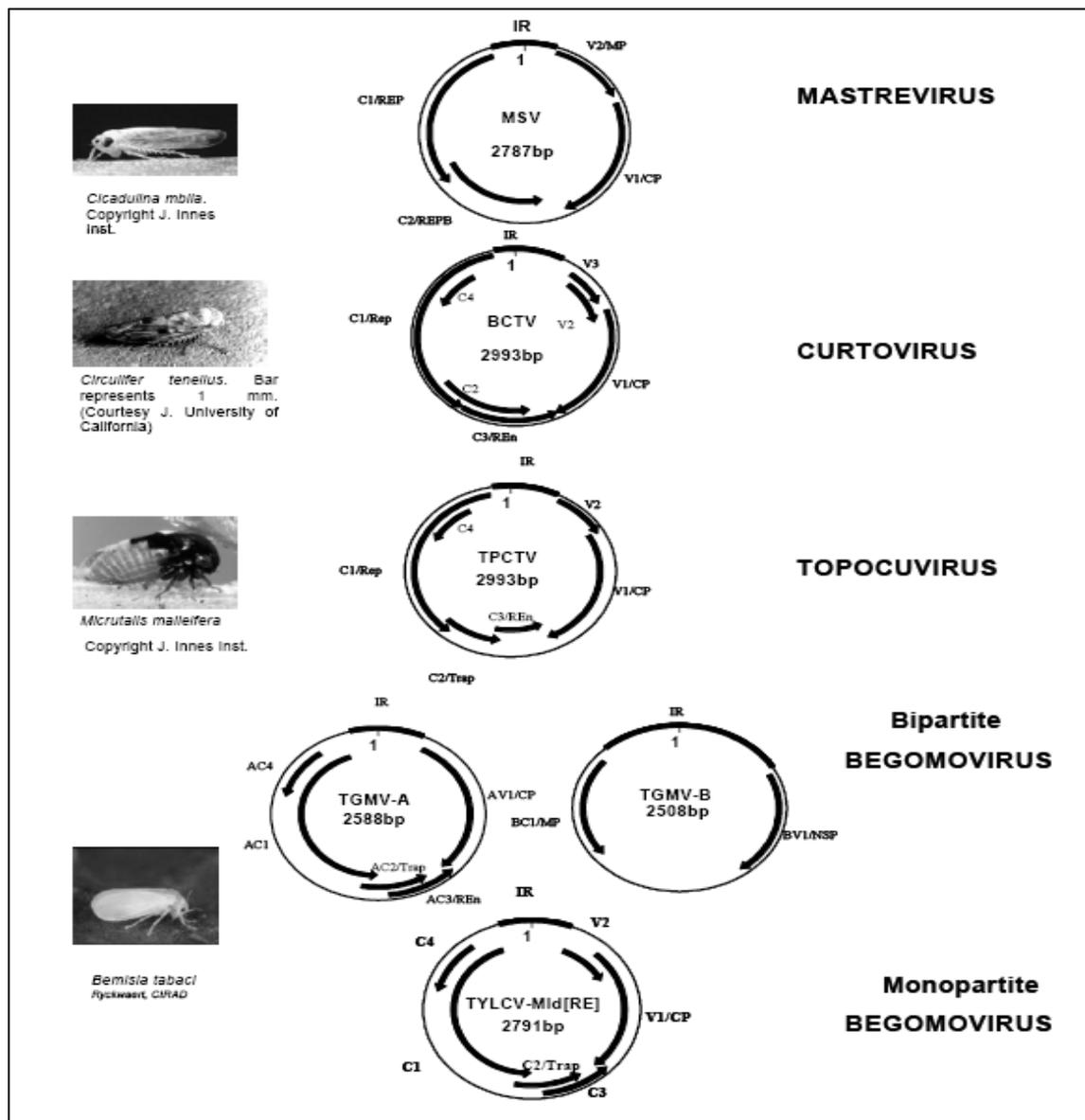


Figure 1: Représentation des génomes des *Geminiviridae* et les images des insectes vecteurs. MSV: *Maize Streak Virus*; BCTV: *Beet Curly Top Virus*; TPCTV: *Tomato Pseudo-Curly Top Virus*; TGMV: *Tobacco Golden Mosaic Virus*; TYLCV: *Tomato Yellow Leaf Curl Virus*. Les flèches indiquent les positions des cadres de lectures ouverts (Delatte, 2005).

6.2. Le genre *Curtovirus*

Les *Curtovirus* ont un génome monopartite de 2,9 à 3 kb. Ils ont pour espèce type le *Beet curly top virus* (BCTV) et sont transmis de manière circulative aux plantes dicotylédones par un insecte *Circulifer tenellus*. L'ADN code pour 6 ou 7 gènes. Les plantes les plus affectés par ces virus sont essentiellement la betterave

à sucre (*Beta vulgaris*), la tomate et le melon (Delatte, 2005). Les *Curtovirus* sévissent en Inde, en Amérique et dans le bassin méditerranéen avec des maladies graves et des conséquences économiques très importantes.

6.3. Le genre *Topocuvirus*

Il a été créé avec les représentants du précédent genre *Curtovirus* avec pour espèce type le *Tomato pseudo curly top virus* (TPCTV). C'est le seul représentant du groupe avec un génome de 2861 nucléotides codant six (6) protéines (Bridson *et al.*, 1996; Pringle, 1999).

6.4. Les *Begomovirus*

Le genre *Begomovirus* comprend les virus qui sont transmis par la mouche blanche (*Bemisia tabaci* Gennadius) aux plantes dicotylédones avec pour espèce type le *Bean golden yellow mosaic virus* (originellement Bean golden mosaic virus Puerto Rico) (Fauquet *et al.*, 2003). Le génome des *Begomovirus* comporte une ou deux molécules d'ADN simple brin qui se répliquent en double brin intermédiaire dans le noyau de la cellule hôte (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000). Les *Begomovirus* provoquent de très graves maladies dans les régions tropicales, subtropicales et méditerranéennes sur les cultures maraîchères ou vivrières (Astier *et al.*, 2001).

6.4.1. Organisation génomique et rôles des différentes protéines

Les *Begomovirus* possèdent un génome bipartite composé d'ADN-A et d'ADN-B (**Figure 2**). Cependant, le nombre de *Begomovirus* à génome monopartite est en augmentation dans le vieux monde. Leur génome est formé uniquement de l'ADN-A. Très récemment, des ADN satellites (ADN Beta et ADN 1) d'environ 1,4 kb ont été mis en évidence en association avec certains *Begomovirus* monopartites (Stanley *et al.*, 1997; Dry *et al.*, 1997; Mansoor *et al.*, 2003b; Bridson et Stanley, 2006).

Chez les *Begomovirus* bipartites, l'ADN-A comporte en général six régions codantes ou ORFs (Open Reading Frames) dont certaines sont chevauchantes et une région intergénique (Intergenic Region ou IR) (**Figure 2**).

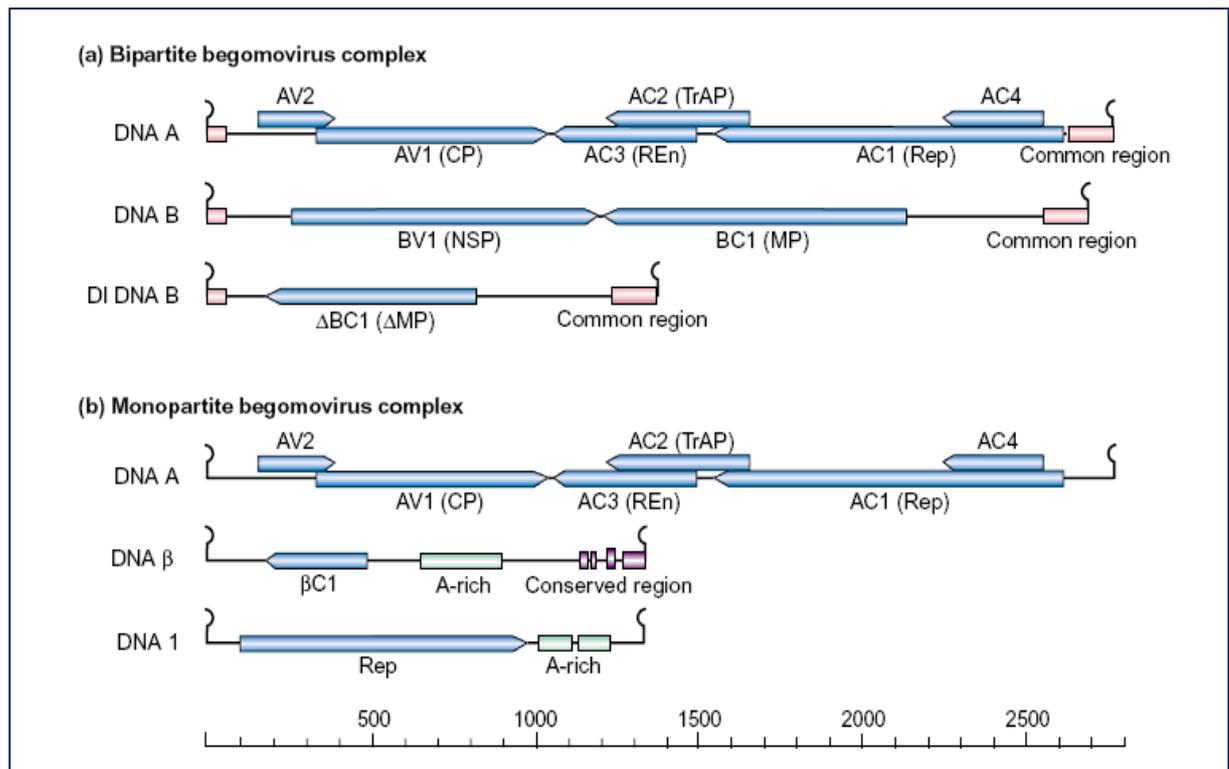


Figure 2: Organisation génomique des *Begomovirus* bipartites (a) et monopartites (b) et des ADN satellites associés (Mansoor *et al.*, 2003b).

Les ORFs AV1 et AV2 sont situés sur le brin viral et les ORFs AC1, AC2, AC3 et AC4 sont sur le brin complémentaire. Il faut cependant noter que AV2 est absent des *Begomovirus* du nouveau monde (Harrison et Robinson, 2002). L'ORF AV1 code pour la protéine de capsid (CP) qui représente l'unité de base dans la constitution de la particule virale. Elle enveloppe le génome viral et est aussi essentielle pour l'expression du virus. C'est une protéine qui permet le transfert de l'ADN viral dans le noyau de la cellule hôte et est aussi requise pour le passage du virus de l'insecte vecteur (la mouche blanche, *Bemisia tabaci*) à la plante. La protéine de capsid (CP) associée à la protéine de mouvement (MP) produite par l'ORF AV2 intervient dans le mécanisme de diffusion du virus dans la plante hôte. La protéine associée à la réplication (Rep) codée par l'ORF AC1, intervient lors de la multiplication virale (Laufs *et al.*, 1995). L'ORF AC3 permet la production de la protéine activatrice de la réplication Ren (Replication Enhancer). Cette dernière en association avec la protéine Rep permet l'accumulation de l'ADN

viral dans les cellules végétales (Azzam *et al.*, 1994; Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000). L'ORF AC2 code la protéine d'activation de la transcription (TrAp). La protéine TrAp contribue au pouvoir pathogène du virus et à l'activation des ORFs des ADN-A et ADN-B dans le sens viral (Sunter et Bisaro, 1991; Van Wezel *et al.*, 2001). La protéine, produit de l'ORF AC4 est impliquée dans la détermination de la gamme d'hôte du virus, la sévérité des symptômes et aussi les mouvements du virus (Laufs *et al.*, 1995; Wartig *et al.*, 1997). Les ORFs BV1 et BC1 situés sur l'ADN-B sont responsables des mouvements inter-cellulaires du virus dans la plante hôte (Lazarowitz, 1992; Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000). Les deux ADNs, A et B ont en commun une région d'environ 200 paires de bases (pb) à l'intérieur de la région IR (Sunter et Bisaro, 1991; Lazarowitz, 1992). La région commune contient aussi deux promoteurs divergents qui régulent différemment l'expression temporelle des gènes viraux (Lazarowitz, 1992).

Les *Begomovirus* monopartites ont une organisation génomique similaire à l'ADN-A des bipartites avec six (6) cadres de lecture (cdls) ou ORFs. Ces ORFs codent pour des protéines d'environ 10 kDa ou plus (Navot *et al.*, 1991; Antignus et Cohen, 1994). Ils sont organisés en deux groupes divergents séparés par une région intergénique (IR). L'unique génome des *Begomovirus* monopartites contient toute l'information nécessaire à la réplication et à l'infectivité du virus (Lazarowitz, 1992).

Le troisième groupe de *Begomovirus* se compose des espèces virales à génome monopartite avec des ADN satellites (ADN Beta ou ADN-1). Ces ADNs avec une taille d'environ 1400 nucléotides participent à l'infection virale. L'ADN Beta est nécessaire à l'induction de symptômes par certains *Begomovirus* et jouerait un rôle de suppression du post-transcriptional gene silencing (PTGS) (Vanitharani *et al.*, 2005 ; Briddon et Stanley, 2006 ; Vanderschuren *et al.*, 2007). Quant à l'ADN-1, il porte un gène codant pour une protéine associée à la réplication (Rep) et semble jouer un rôle dans la modulation de l'accumulation du virus (Briddon et Stanley, 2006).

6.4.2. Réplication des *Begomovirus*

Les *Geminivirus* ne disposent pas d'équipement enzymatique nécessaire à leur expression dans la cellule hôte. Ils dépendent de l'ADN polymérase et des

fonctions génétiques des cellules de la plante hôte. Ces virus se multiplient dans les cellules différenciées en phase G qui ont terminé leur activité de réplication propre. L'infection virale réactive la réplication en convertissant la cellule en phase S du cycle cellulaire (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000). Les *Begomovirus* utilisent deux mécanismes pour la réplication de leur génome: le mécanisme de réplication en cercle roulant (RCR) et la réplication dépendante de la recombinaison (RDR) (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000; Jeske *et al.*, 2001; Preiss et Jeske, 2003) (**Figure 3**).

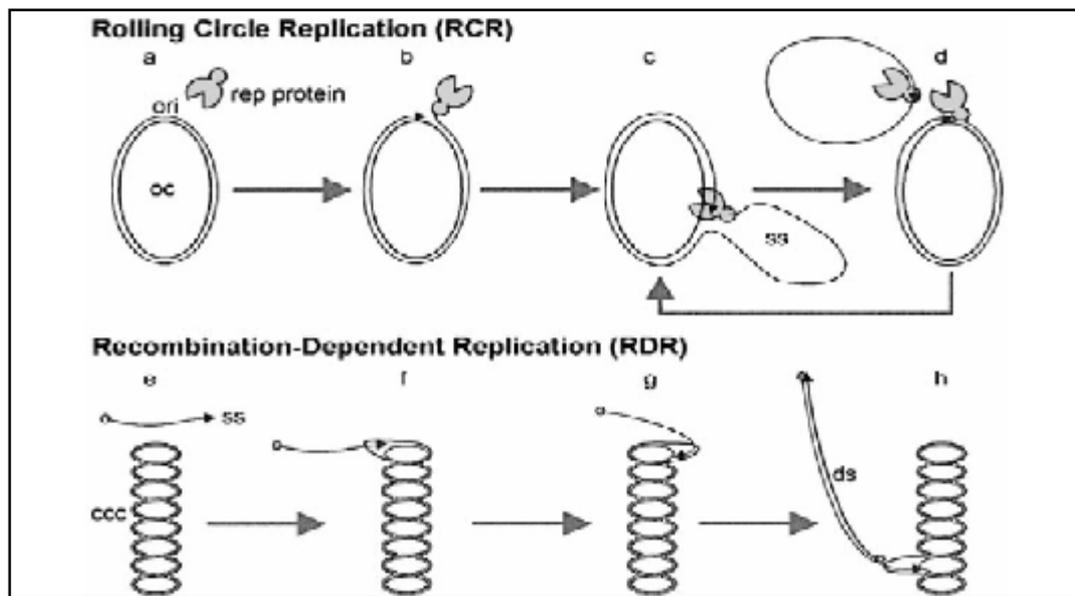


Figure 3: Schématisation des modèles de réplication en cercle roulant (RCR) et de réplication dépendante de la recombinaison (RDR). Etape a: accrochage de la protéine associée à la réplication (Rep) à l'origine de réplication (ori). Etape b: ouverture de l'ADN et liaison covalente de la Rep à l'extrémité 5'. Etape c: déplacement et réplication. Etape d: nouvelle ouverture de l'ADN, fermeture des ADNs simples brins et relargage de la Rep. Etape e: interaction entre un ADN simple brin incomplet et la forme super-enroulée de l'ADN viral (cccDNA) à des sites homologues. Etape f: recombinaison homologue. Etape g: élongation de l'ADN simple brin. Etape h: synthèse de l'ADN complémentaire et obtention d'un ADN double (Lefeuvre, 2008).

En effet, d'une façon générale, les ADN simples brins des *Geminivirus* se répliquent dans le noyau des cellules infectées via un mécanisme de cercle

roulant utilisant une forme intermédiaire double brin (Stenger *et al.*, 1991). La région IR du génome contient un nanonucléotide hautement conservé TAATATT↓AC contenant le site d'initiation (↓) de la RCR (Stanley, 1995; Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000); ce site est aussi appelé origine de la réplication (ori). La protéine Rep initie le cycle de réplication en faisant un clivage unique du brin viral à l'origine de réplication. Après le clivage, la protéine Rep se retrouve liée de façon covalente au bout 5' de l'ADN clivé. La synthèse de l'ADN simple brin (ADNsb) est régulée par l'activité synergique des protéines TrAp et REn qui agissent respectivement pour l'activation de la transcription et l'augmentation de la réplication (Sunter et Bisaro, 1991). Selon Xie *et al.* (1999), les *Geminivirus* dépendent des facteurs cellulaires pour compléter leur cycle de réplication.

Quant au mécanisme de la RDR, il se déroule simultanément avec le mécanisme de la RCR. Ce mécanisme utilise des intermédiaires réactionnels et se déroule comme décrit dans la **Figure 3**. Ce dernier modèle de réplication est analogue à celui du bactériophage T4 (Mosig, 1998; Mosig *et al.*, 2001).

6.4. 3. Variabilité génétique des *Begomovirus*

Les *Begomovirus* sont en pleine expansion dans le monde et semblent très bien adaptés à de nouvelles niches écologiques. Cette adaptation semble liée à la grande variabilité génétique dans ce groupe de virus. Ces variations génétiques peuvent survenir par suite de mutation, de pseudorecombinaison et de recombinaison (Seal *et al.*, 2006). Ces phénomènes se produisent dans la nature (Zhou *et al.*, 1998; Sanz *et al.*, 2000; Pita *et al.*, 2001). Cependant, les facteurs qui concourent à l'évolution des *Begomovirus* dans leur environnement restent insuffisamment connus.

6.4.3.1. La mutation

Les mutations sont des erreurs de copies générées lors de la réplication du génome par les polymérases ARN ou ADN dépendantes. Chez les virus à ARN, les taux d'erreur de la réplication sont compris entre 10^{-3} et 10^{-5} par nucléotide et par réplication (Jenkins *et al.*, 2002). Les ADN cellulaires qui utilisent les polymérases des cellules végétales pour leur réplication ont des taux de mutation estimés entre 10^{-8} et 10^{-11} (Drake *et al.*, 1998). Chez les *Begomovirus* qui utilisent

ces mêmes polymérases, les fréquences de mutation restent très élevées (Ooi *et al.*, 1997; Sanz *et al.*, 1999). Ces fréquences sont souvent équivalentes à celles des virus à ARN. Ces taux de mutation anormalement élevés ont été rapportés chez le *Maize streak virus* (Isnard *et al.*, 1998) et le *Tomato yellow leaf curl China virus* (Ge *et al.*, 2007 ; Duffy et Holmes, 2008).

6.4.3.2. La recombinaison et la pseudorecombinaison

La recombinaison virale est un processus permettant la génèse d'un nouveau virus suite à des combinaisons entre des séquences d'ADN de deux virus parents (Lefeuvre, 2008). Elle présente un avantage énorme pour un virus d'acquérir en une seule étape une grande variabilité génétique. La découverte de ce phénomène chez les *Begomovirus* est relativement récente (Zhou *et al.*, 1997; Padidam *et al.*, 1999). La recombinaison pourrait s'expliquer par le mécanisme de la recombinaison dépendante de la réplication qui survient chez plusieurs *Begomovirus* (Jeske *et al.*, 2001; Preiss et Jeske, 2003). En Ouganda, la pandémie sévère qui a affecté la production du manioc a été causée par un virus recombinant. Ce virus appelé EACMV-UG2 est issu de la recombinaison entre l'EACMV et l'ACMV (Zhou *et al.*, 1997) dans la région de la CP. Une recombinaison entre le *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) et le *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) a aussi été observée (Monci *et al.*, 2002). Des évènements de recombinaison entre les ADN-A et les ADN satellites, de même qu'entre les ADN Beta ont été rapportés (Briddon *et al.*, 2001, 2003; Saunders *et al.*, 2001). Ces recombinaisons surviennent *in natura* par suite de coinfection de l'hôte par différents types de virus (Monci *et al.*, 2002). Avec l'augmentation des séquences complètes de *Begomovirus* et l'amélioration des techniques d'analyse des séquences, le nombre d'évènement de recombinaison rapporté est en constante augmentation (Lefeuvre, 2008). Cependant, la viabilité et les phénomènes d'adaptation des recombinants à l'environnement restent très peu compris.

Quant à la pseudorecombinaison, elle est décrite comme étant des échanges de matériels génétiques survenant entre l'ADN A et l'ADN B des *Begomovirus* (Garrido-Ramirez *et al.*, 2000; Pita *et al.*, 2001; Idris *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 2003). De nombreux progrès ont été faits dans la compréhension de ce

phénomène et il est établi que certains *Begomovirus* monopartites acquièrent de façon définitive un ADN-B; ces virus sont décrits comme des mono-bipartites (Saunders *et al.*, 2002; Chakraborty *et al.*, 2003).

6.5. L'insecte vecteur, *Bemisia tabaci* Gennadius

Les *Begomovirus* sont transmis par une mouche blanche, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: *Aleyrodidae*) qui est le seul insecte vecteur connu pour ces virus (**Figure 4**). Cette mouche polyphage se nourrit sur plusieurs espèces végétales (Osborne, 1988). Plusieurs biotypes ont été signalés à travers les différentes régions du monde. Parmi ces biotypes, le biotype B a beaucoup contribué à l'expression des géminivirus sur de nouveaux hôtes car il est très fécond, plus répandu et est le plus redoutable ravageur des plantes (Perring *et al.*, 1991; Delatte *et al.*, 2007). La transmission des *Geminivirus* par *Bemisia tabaci* se fait selon le mode circulant et non propagatif (Duffus, 1997).



Figure 4: Couples d'individus adultes du biotype B de *Bemisia tabaci* en alimentation sur une feuille de chou. Photo CIRAD.

Les mouches blanches peuvent acquérir et transmettre les *Begomovirus* bipartites dans des délais courts, environ 10 minutes, mais l'efficacité de

l'acquisition croit quand la période d'alimentation augmente, au delà de 24h. Une période de latence de 4 à 21h entre l'acquisition du virus et la possibilité de transmission par la mouche a été observée (Duffus, 1995). Des études de la transmission du TYLCV ont montré que des périodes d'alimentation de la mouche blanche de 4h ou plus étaient nécessaires pour réussir la transmission de TYLCV à des taux proches de 90% (Zeidan et Czosnek, 1991). Par ailleurs, le TYLCV multiplierait chez le vecteur, transmis à la descendance et aussi par voie sexuelle (Ghanim et Czosnek, 2000; Astier *et al.*, 2001); cela augmente le nombre d'individus virulifères capables d'infecter les plantes. Ces propriétés particulières du TYLCV n'ont pas encore été démontrées chez d'autres *Geminiviridae*. C'est essentiellement au stade adulte que l'aleurode par ses piqûres propage la maladie des plantes malades aux plantes saines.

6.6. Hôtes et symptômes causés par les *Begomovirus*

Bemisia tabaci peut se nourrir sur plus de 900 espèces de plantes (Greathead, 1986) appartenant à 74 familles botaniques. Une étude plus précise a indiqué que 73% des plantes cultivées et 66% des mauvaises herbes sont hôtes du biotype B (Servin *et al.*, 1999).

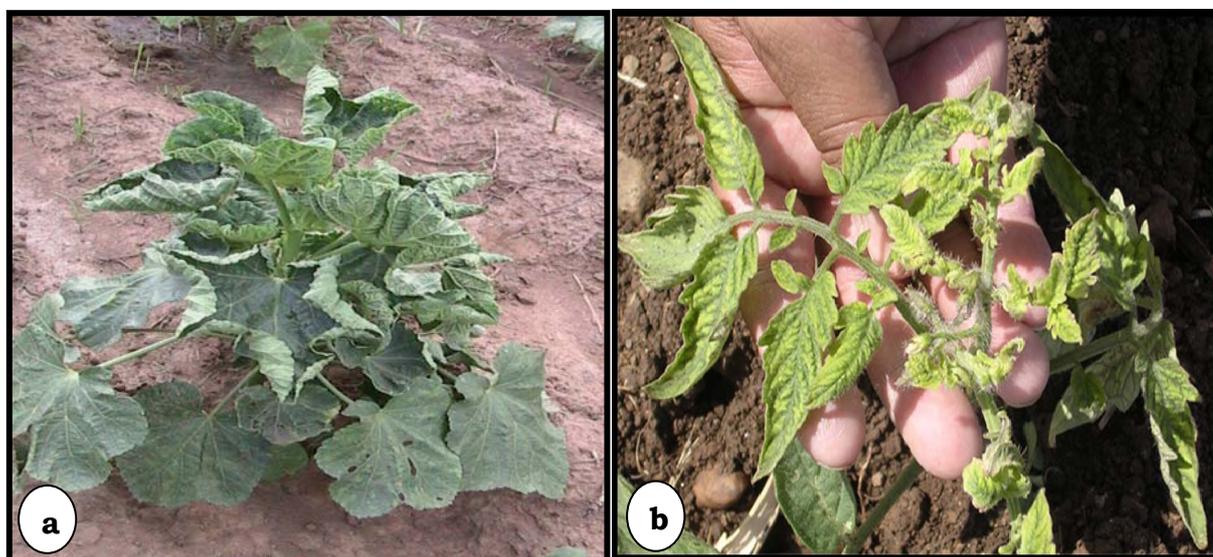


Figure 5: (a) Symptômes de repliements foliaires observés sur le gombo au Burkina Faso (Photo CRSBAN), (b) symptômes de jaunissement et de repliments des feuilles de la tomate à La Réunion (Photo CIRAD).

Ces hôtes du vecteur sont aussi plus souvent hôtes de virus. Les plantes hôtes des *Begomovirus* les plus répertoriées dans la littérature appartiennent aux

familles suivantes: *Leguminosae*, *Malvaceae*, *Solanaceae*, *Euphorbiaceae*, *Convolvulaceae*, *Cucurbitaceae*, *Labiaceae*, *Verbenaceae*, *Cruciferae*, *Amaranthaceae*, *Rosaceae*, *Asteraceae*, *Moraceae*. Cependant, d'autres espèces des familles telles que les *Cleomaceae*, les *Sterculiacaceae*, les *Rubiaceae*, les *Valieranaceae*, les *Hypericaceae* ont été signalées (Oliveira *et al.*, 2001).

Les symptômes des maladies sont surtout des enrroulements et jaunissements foliaires puis des nanismes (Paximadis *et al.*, 1999; Tiendrébégo, 2006; Barro *et al.*, 2007) (**Figure 5**). La plupart des plantes dicotylédones et les mauvaises herbes infectées présentent des symptômes de repliement foliaire, d'épaississement du limbe, de jaunissement des nervures et aussi de mosaïque jaune sur les feuilles (Jones, 2003). Chez les papayers infectés par exemple, les feuilles sont repliées vers le bas, avec des épaississements de nervures et des fruits tordus de petites tailles (Wang *et al.*, 2004). Chez le gombo les enrroulements de feuilles sont marqués par des sinuosités des nervures (Barro, 1994).

6.7. Méthodes de diagnostic des *Begomovirus*

Les symptômes provoqués par les *Begomovirus* sont très caractéristiques et constituent à ce titre un bon diagnostic en vue de suspecter ce groupe de virus. Cependant, plusieurs facteurs peuvent influencer la forme des feuilles et l'état général de la plante; ce sont entre autres l'action des chenilles, des insectes suceurs et aussi le stress hydrique (Green, 1991). Face à cette difficulté de relier de façon formelle symptômes et agent causal, plusieurs méthodes de laboratoire ont été développées (Matthews, 1991). Dans le cas des *Begomovirus*, des méthodes de diagnostic biologique, sérologique et moléculaire sont couramment utilisées.

6.7.1. Le diagnostic par voie biologique: les plantes tests

Les plantes tests sont utilisées pour confirmer une infection virale. Cela répond à l'un des principes généraux de la microbiologie à savoir la vérification du postulat de Koch (Boyd, 1988). L'utilisation de ces tests ne permet pas d'identifier précisément le virus responsable d'une pathologie mais est nécessaire pour l'établissement de l'étiologie d'une infection virale. Les plantes tests

couramment utilisées sont: *Nicotiana benthamiana*, *Lycopersicon esculentum*, *Capsicum annum*, *Capsicum frutescens*, *Phaseolus vulgaris* (Brunt *et al.*, 1990). Dans la pratique, des extraits de plantes malades sont inoculés à des plantes saines pour reproduire exactement les mêmes symptômes. Il faut cependant noter que la plupart des *Begomovirus* sont restreints au phloème et ne sont donc pas transmissibles mécaniquement (Astier *et al.*, 2001). Pour ces virus, la construction d'un clone agroinfectieux est nécessaire (Delatte *et al.*, 2005). Aussi, le vecteur (*Bemisia tabaci*) sain est mis en acquisition sur des plantes malades et transféré sur des plantes saines pour réaliser l'infection.

Il est reproché à cette méthode de consommer trop de temps. Cependant, il faut noter qu'elle est très importante pour l'établissement de l'étiologie virale et la gamme d'hôtes d'un virus donné.

6.7.2. Les tests sérologiques

Les techniques de précipitation en immuno-diffusion (ID) et les tests immuno-enzymatiques (ELISA) sont utilisés pour la détection des *Begomovirus*. Les anticorps utilisant les tests ELISA ont permis la détection des *Begomovirus* dans différents extraits végétaux (Konaté *et al.*, 1995; Harrison et Robinson, 1999). La variante TAS-ELISA utilisant les anticorps monoclonaux a été utilisée pour la détection et la classification de ce groupe de virus (Barro, 1994; Konaté *et al.*, 1995; Zinga, 1999; Tiendrébéogo *et al.*, 2006).

D'autres tests sérologiques utilisant des sérums polyclonaux sont utilisés avec succès. Ce sont: "Western blots", "Leaf imprint blots", "Tissue blots", "Transmission electron microscopy and immunolabeling" (Abouzid *et al.*, 2002). Les *Begomovirus* présentent de fortes relations sérologiques entre eux, cela rend la distinction des espèces virales presque impossible par ces méthodes (Brown *et al.*, 2001).

6.7.3. Les tests moléculaires

Les techniques moléculaires de détection et d'identification des virus ont été développées avec la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) (Duncan et Torrance, 1992). L'acide nucléique des virus est exploré et selon les amorces utilisées, l'identité du virus est révélée avec précision (Lewin, 1997). Des amorces

ont été surtout développées pour la détection des *Begomovirus* à partir d'informations sur la séquence des régions conservées de l'ADN-A (Wyatt et Brown, 1996; Atzmon *et al.*, 1998; Brown *et al.*, 2001). Des tests complémentaires comme la RFLP (Polymorphisme de la longueur des fragments de restriction) sont parfois nécessaires pour distinguer les espèces bégomovirales (Accotto *et al.*, 2000). De plus en plus, les comparaisons de séquences nucléotidiques et la phylogénie permettent de distinguer avec précision les espèces virales (Padidam *et al.*, 1995; Brown, 1997; Fauquet *et al.*, 2003). Ces comparaisons pourraient se baser sur la région intergénique (IR) et le gène de la protéine de capsid (CP) en l'absence de séquence complète de l'ADN-A (Brown, 1997; Brown *et al.*, 2001). Mais pour une taxonomie définitive, la séquence complète de l'ADN-A est exigée et une identité de séquences nucléotidiques inférieure à 89% indique des espèces différentes (Fauquet *et al.*, 2008).

7. Méthodes de lutte contre les *Begomovirus*

L'essentiel des mesures de lutte contre les *Begomovirus* vise surtout à réduire les sources de l'inoculum viral et la population du vecteur. Ces moyens de lutte sont essentiellement biologiques, chimiques, culturels et physiques. L'effort de lutte est aussi basé sur l'utilisation de variétés résistantes ou tolérantes au virus et/ou au vecteur (Brown et Bird, 1992; Brown, 1994; Thresh et Otim-Nape, 1994; Pico *et al.*, 1996; Polston et Anderson, 1997; Varma et Malathi, 2003).

7.1. Pratiques culturelles et lutte physique

Les pratiques culturelles visant à retarder le développement des maladies virales sont à encourager pour leur effet positif sur le rendement. Ainsi, l'utilisation de semences garanties sans virus est à promouvoir bien que les *Begomovirus* ne soient pas transmis par les graines. Pour les plantes à multiplication végétative comme le manioc, il est important de partir d'une plante mère saine pour avoir une descendance indemne de virus. Le but de ces précautions phytosanitaires est de limiter la transmission précoce des virus. Un désherbage des abords des parcelles de production peut permettre d'éliminer des sources de virus et de mouches blanches et d'éviter des contaminations trop précoces. Aussi, les contaminations peuvent provenir des cultures voisines, une culture antérieure infectée peut être une source abondante de virus. Il convient

d'éviter ce genre de situation en éliminant les cultures dès qu'elles ne sont plus productives (Astier *et al.*, 2001).

De façon générale, le contrôle des *Begomovirus* est délicat, le ToMoV a été facilement éradiqué en Floride parce qu'il manquait d'hôtes réservoirs et aussi par le fait que la tomate n'était pas produite toute l'année (Polston et Anderson, 1997). Par contre, cette solution n'est pas envisageable dans le Sud de l'Inde à cause de la présence de plus de 173 plantes hôtes de *Bemisia tabaci* (Saikia et Muniyappa, 1989), de même qu'au Pakistan pour les mêmes raisons, plus de 229 plantes hôtes de *B. tabaci* connues (Attique *et al.*, 2003). Cela montre les difficultés rencontrées dans la lutte contre les *Begomovirus*.

7.2. Lutte chimique

La lutte chimique est dirigée contre le vecteur, *Bemisia tabaci*. Elle utilise essentiellement des insecticides capables de tuer ou de perturber les mouches blanches afin d'éviter la transmission du virus (Mason *et al.*, 2000; Palumbo *et al.*, 2001). Cette méthode de lutte devient inefficace à cause de la résistance des mouches blanches aux insecticides et les conséquences écologiques liées à ces produits chimiques (Palumbo *et al.*, 2001 ; Otoïdobiğa *et al.*, 2003).

7.3. Lutte génétique

La méthode de lutte la plus "simple" à mettre en œuvre est l'utilisation de variétés résistantes aux virus. Cette méthode est la plus commode et la plus rentable pour le contrôle des maladies virales (Hall, 1980; Yang *et al.*, 2004 ; de Castro, 2005). Chez la tomate, la variété Pearl Harbour résiste au *Tomato yellow leaf curl virus (stricto sensus)* (Yassin et Nour, 1965). Une dizaine de lignées de tomate sont partiellement résistantes au TYLCV (de Castro, 2005).

La sélection de plantes naturellement résistantes s'effectue par des croisements. Le plus souvent des rétrocroisements successifs sont effectués entre une variété résistante présentant souvent de piètres qualités et une variété sensible présentant des caractères agronomiques intéressants. Les plantes résistantes ayant les meilleures qualités agronomiques issues de ces croisements sont conservées pour être de nouveau croisées avec la variété sensible. Ce processus est répété plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'une plante résistante et

ayant des qualités agronomiques optimales. La lutte génétique contre les virus en général demeure longue à mettre en œuvre. Il s'écoule parfois plus de 10 ans entre le moment où l'on découvre une résistance et le moment où cette résistance sera intégrée dans une variété intéressante. Dans certains cas, la résistance est spécifique et sera surmontée par des souches particulières du virus. Il faudra donc créer des variétés possédant des résistances à plusieurs virus (les virus qui ont une virulence avérée sur l'espèce végétale) à la fois pour obtenir une protection optimale des cultures.

Une autre possibilité est l'utilisation des plantes transgéniques résistantes. Les plantes transgéniques seraient plus faciles à mettre en œuvre et cette perspective est beaucoup encouragée (Beachy, 1997). Le transfert des gènes par le génie génétique est un moyen inespéré pour lutter contre les maladies à virus des plantes (Astier *et al.*, 2001).

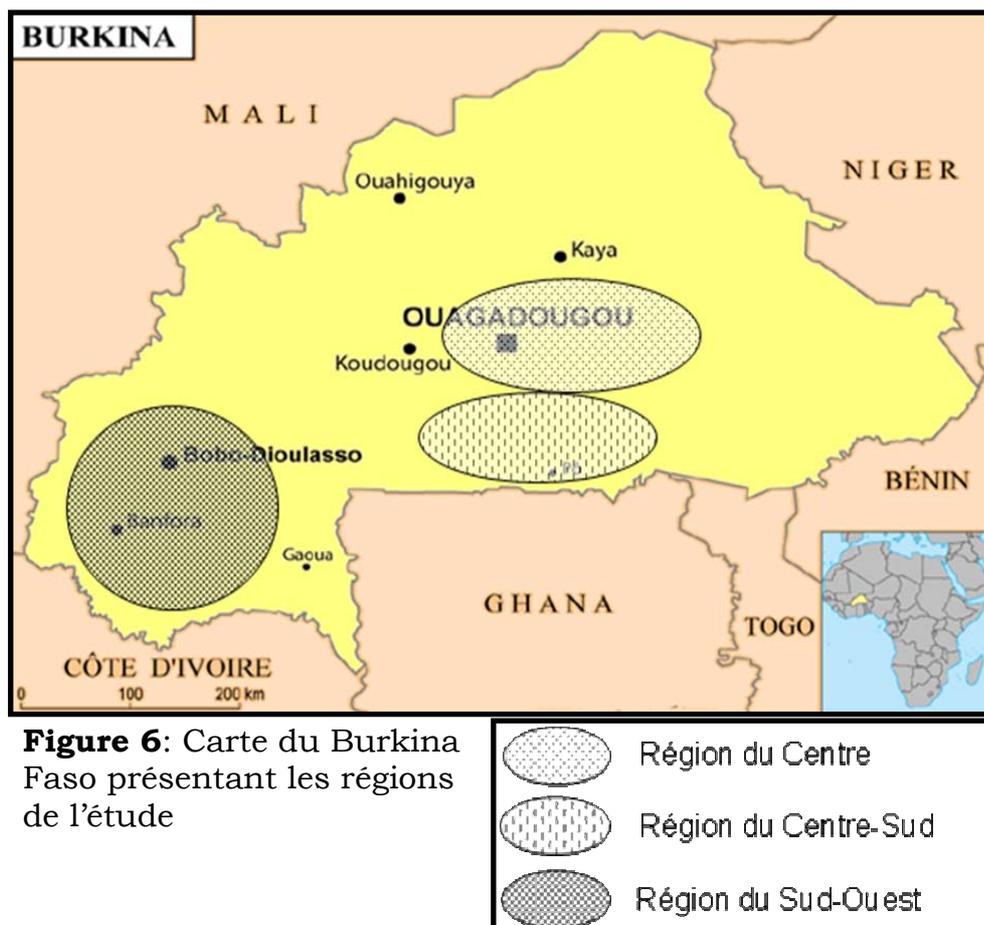
CHAPITRE 2:

MATERIEL ET METHODES

I. Matériel d'étude

1. La zone d'étude

L'étude de terrain a été faite au niveau des périmètres irrigués, des champs de case, des abords des barrages et d'autres retenues d'eau. Pour ce faire, nous sommes intéressés à trois grandes régions où la culture maraîchère est importante (**Figure 6**). Il s'agit de la région Sud-Ouest (Banfora, Bama "Vallée du Kou", Léguéma, Toussiana), de la région du Centre (Ouagadougou, Kamboinsé, Loumbila, Koubri) et de la région du Centre-Sud (Bazéga, Kombissiri, Pô, Kampala, Tiébélé). Ces différentes régions ont des conditions agroclimatiques différentes.



2. Le matériel végétal

2.1. Les espèces cultivées

Les études ont porté essentiellement sur les espèces végétales suivantes: la tomate (*Lycopersicon esculentum*), le gombo (*Abelmoschus esculentus*), le poivron (*Capsicum annuum*), le piment (*Capsicum frutescens*), le papayer (*Carica papaya*), le manioc (*Manihot esculenta*), les aubergines (*Solanum melongena*, *Solanum nigrum*), la pomme de terre (*Solanum tuberosum*), l'amaranthe (*Amaranthus sp.*), le concombre (*Cucumis sativus*), la courgette (*Cucurbita pepo*), le haricot vert (*Phaseolus vulgaris*), le chou (*Brassica oleracea*) et l'oignon (*Allium cepa*). La plupart de ces végétaux sont essentiellement des cultures maraîchères qui ont une grande importance dans l'alimentation et sont des sources de revenus pour les populations au Burkina Faso.

2.2. Les plantes adventices

Les plantes adventices ont été également prospectées pour la recherche d'hôtes réservoirs de *Begomovirus*. Il s'agit notamment de *Manihot glaziovii*, *Sida acuta*, *Ageratum conyzoides*, *Physalis vulgaris*, *Acanthospermum sp.* et *Erythrina indica* var. *picta*. Cette dernière est une plante ornementale.

2.3. Les plantes tests

Les plantes tests utilisées au cours de cette étude ont été le tabac (*Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana glutinosa*, *Nicotina tabacum* L. cv. Sumsun), le piment jaune du Burkina Faso (JBF), le piment rouge du Burkina Faso (RBF), le piment cv. Cayenne, le poivron (cvs. Yollo Wonder, Doux des Landes, HD801, Florida VR2, Serrano Vera Cruz, HD 103, Avelar, Miord, PM 687, CM 334, Pérénial et Yolo Y), la tomate cv. Farmer, le gombo (cvs. *Man Yanga*, Clemson spineless, Indiana, F1 Lima et Volta), *Phaseolus vulgaris* L., *Cucumis sativus* L., *Datura stramonium* L., *Chenopodium quinoa* Willd., *Chenopodium amaranticolor*. Ces plantes ont servi à l'évaluation de l'infectivité de virus ou à l'étude de l'impact de virus sur la production globale.

II. Méthodologie

1. Collecte des échantillons et données épidémiologiques

1.1. Collecte et traitement des échantillons

Durant mars 2005 à avril 2009, trois cent soixante douze (372) échantillons présentant des symptômes caractéristiques des infections à *Begomovirus* (repliements foliaires, taches nécrotiques, enroulement et jaunissement des feuilles) ont été prélevés. Ces échantillons constitués de jeunes feuilles ont été placés en sachets plastiques et conservés dans la glace jusqu'au laboratoire où ils ont été analysés directement ou conservés au congélateur à -20°C. Pour les besoins des analyses moléculaires, une partie des échantillons a été préservée par séchage à l'étuve à 40°C.

1.2. Evaluation de l'incidence des maladies

L'incidence est le rapport entre le nombre de plants malades et le nombre total de plants, exprimé en pourcentage. Cette incidence a été déterminée: (a) soit par sondage dans les parcelles de grandes surfaces. Ainsi, dans des points des parcelles les plants malades ont été dénombrés par observation visuelle. L'incidence dans le champ a été déterminée en faisant la moyenne des incidences obtenues dans les différents points du champ. (b) par dénombrement de tous les plants (en moyenne 500 plants) dans les parcelles de petites surfaces.

1.3. Evaluation des pertes de récoltes : cas du gombo (*Abelmoschus esculentus*)

Les pertes de récoltes causées par l'infection à *Begomovirus* ont été évaluées sur le gombo. A cet effet, des essais de gombo ont été placés à Kombissiri et à Kamboinsé. Une variété locale "Man Yanga" et 4 variétés améliorées (Indiana, Clemson spineless, F1 Lima et Volta) ont été implantées en conditions naturelles. A maturité, les incidences ont été évaluées et les paramètres suivants ont été relevés sur les plantes saines et malades: longueur de la plante, nombre de fruits par plante, longueur des fruits, diamètre des fruits, poids des fruits. Ces paramètres ont servi à évaluer l'impact des repliements foliaires observés sur le rendement et les pertes associées. Pour la comparaison des paramètres entre les plants sains et

malades, des analyses de variance (ANOVA) ont été effectuées à l'aide du logiciel STATISTICA (version 6.0). Les incidences en pourcentage ont subi au préalable une transformation angulaire (Zar, 1999).

2. Détection des virus par le test immunoenzymatique ELISA

La variante "triple anticorps sandwich (TAS-ELISA)" du test ELISA a été utilisée pour la détection des *Begomovirus* dans les échantillons collectés. Cette variante est aussi connue sous le nom de "double anticorps sandwich indirect (IDAS-ELISA)" (Van Regenmortel et Burckard, 1980). Le test ELISA (anglais: *Enzyme linked ImmunoSorbent Assay*) a été réalisé dans des plaques de microtitration (Nunc MaxiSorb, certifié) selon le protocole suivant: le fond des puits de la plaque de microtitration a été revêtu avec un IgG polyclonal de lapin anti-ACMV dilué 10^3 fois dans le tampon carbonate 50 mM pH 9,6. La plaque a été incubée à 37°C pendant 2 h. Les extraits de tissus végétaux à analyser ont été préparés comme suit: 1 g de feuilles a été broyé à l'aide d'un mortier en porcelaine dans 10 ml (échantillons de gombo) et dans 5 ml (autres échantillons) de tampon extraction Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contenant 60 mM de sulfite de sodium. Les broyats ont été clarifiés par centrifugation à 10000 g pendant 5 mn. Plusieurs anticorps monoclonaux initialement développés par le SCRI (Scottish Crops Research Institute) pour la détection des *Begomovirus* ACMV (African Cassava Mosaic Virus) et OLCV (Okra leaf curl virus) ont été utilisés.

Dans le cas de l'étude de la variabilité antigénique, les anticorps monoclonaux produits à partir d'antigènes ACMV ont été le SCR12, SCR14, SCR16, SCR25, SCR53 et ceux produits à partir d'antigènes OLCV étaient le B1, B3, C1, C3 et C12. Ces anticorps ont été utilisés pour la différenciation des isolats. Ces différents anticorps ont été dilués 100 fois dans du tampon anticorps. La durée de l'incubation des anticorps de détection a été de 2 h à 37°C. Les conjugués anticorps de Chèvre anti-Mouton couplé à la Phosphatase alcaline (GAM-PAL) ou streptavidine-enzyme (Strep-PAL) ont été dilués 10^3 fois dans du tampon phosphate salin additionné du tween 20 (PBS-Tween). Ils ont été incubés à 37°C pendant 2h. La plaque a été lavée avec le tampon PBS-Tween lors du passage d'une étape à une autre. Le substrat a été le para-nitrophényl phosphate (PNP) utilisé à la concentration de 1 mg/ml dans du tampon substrat. Les

absorbances à 405 nm ont été mesurées au lecteur de microplaque $\Sigma 960$ Metertech après une incubation d'une heure à 37°C ou une nuit à 4°C.

La composition des différents tampons utilisés dans les réactions sérologiques est indiquée en annexe.

3. Détection des *Begomovirus* par PCR

3.1. Extractions d'ADN

Les ADNs ont été extraits par l'utilisation soit du Cétyle Triméthyl Ammonium Bromide (CTAB) selon le protocole de Doyle et Doyle (1987) ou du kit DNeasy® de Qiagen (France).

3.1.1. Extraction par le CTAB

L'extraction de l'ADN total des échantillons de jeunes feuilles de plante a été faite selon le protocole de Doyle et Doyle (1987). Un poids de 0,3 g de feuilles a été broyé dans le tampon d'extraction CTAB (2% hexadécyltriméthylammonium bromide, 1,4 M NaCl, 0.2 % mercaptoéthanol, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8,0) et chauffé à 60°C pendant 30 mn sous agitation. Après centrifugation à 6000 g, un égal volume de mélange de chloroforme et d'alcool isoamylique (24:1) a été ajouté. Cet ajout permet de débarrasser le mélange des débris en suspension dans la phase aqueuse. La phase aqueuse a été ensuite transférée dans un nouveau tube et 2/3 d'isopropanol a été ajouté pour permettre la précipitation des acides nucléiques. Les acides nucléiques après un rinçage avec 500 µl d'éthanol (70%) pendant au moins 20 mn ont été recueillis dans un volume de 25 à 125 µl de tampon TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,4) selon la masse de culot obtenu.

3.1.2. Extraction à l'aide du Kit DNeasy® de Qiagen

L'ADN total a été extrait des feuilles des plantes malades à l'aide du kit DNeasy® (Qiagen, France). Les feuilles séchées ont été broyées finement dans un tampon de lyse et les contenus cellulaires libérés avec les acides nucléiques. La RNase A a été ajoutée au lysat cellulaire pour éliminer tout ARN. Les différents débris ont été éliminés par l'utilisation d'une première colonne de filtration. Le filtrat a été rincé, puis coulé sur une dernière colonne d'où l'ADN total est élué.

Cet ADN total est de bonne qualité (ratio $DO_{260}/DO_{280} \sim 1,8-2,0$) pour les différentes analyses moléculaires.

3.2. Amplifications par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

3.2.1. Amorces utilisées

Les réactions de polymérisation en chaîne ont été réalisées au Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire du CRSBAN, au Laboratoire de Virologie et de Biotechnologie Végétale de l'INERA et au Pôle de Protection des Plantes, CIRAD-Université de la Réunion, UMR 53 PVBMT. Les amorces consignées dans le **Tableau I** ont été utilisées pour la détection des *Begomovirus* dans les échantillons de plantes malades et aussi pour la détection des ADN satellites.

3.2.2. Composition des mix et programmes PCR

Les réactions PCR ont été conduites selon respectivement les protocoles de Navot *et al.* (1991), Wyatt et Brown (1996), Briddon *et al.* (2002), Bull *et al.* (2003) et Delatte *et al.* (2005). Les mix et les programmes PCR ont été conformes aux indications des auteurs ci-dessus. Cependant, les couples d'amorce Okra-F318/Okra-R1004 et Okra-1469/Okra-R2338 ont été dessinés pour la détection des *Begomovirus* du gombo. Pour ces deux couples d'amorces, le volume final de la réaction était de 25 μ l avec 20 pmole de chaque amorce, 20 mM de dNTPs, 1,5 mM de $MgCl_2$. Le programme d'amplification était le suivant: 5 mn à 94°C, suivi de 30 cycles de 1 mn à 94°C, 30 s à 60°C, 1 mn à 72°C et une étape finale de 5 min à 72°C.

3.3. Electrophorèse sur gel d'agarose

Du gel d'agarose (sigma grade biologie moléculaire RNase free) à 1% (p/v) a été préparé dans du tampon TBE (100 mM Trizma base, 100 mM acide borique, 2 mM EDTA). Quelques gouttes de bromure d'éthyldium (BET) à 0,5 μ g/ml a été ajouté à la solution d'agarose lorsqu'elle a atteint 60°C après refroidissement. Le mélange a été coulé sur le support de gel midi pour l'électrophorèse.

Tableau I: Liste des amorces utilisées pour les différentes PCR

Couples d'amorces	Séquences des amorces	Taille du produit attendu (nt)
Détection de l'ADN A		
AV494 AC1048 (Wyatt & Brown, 1996)	5'-GCCYATRTAYAGRAAGCCMAG-3' 5'-GGRTTDGARGCATGHGTACAT-3'	552
PTYv369 PTYc1023 (Navot <i>et al.</i> , 1991)	5'- ACGCCCGCTCGAAGGTTTCG-3' 5'-CGTCAGCCATATAACAATAACAAGGC-3'	601
VD360 CD1266 (Dellate <i>et al.</i> , 2005)	5'-AGRCTGAACTTCGACAGC-3' 5'-TCTCAACTTCARGGTCTG-3'	906
*Okra-F318 *Okra-R1004	5'-AATTATGTCTCGAAGCGACCAG-3 5'-GCATTCTCCGTATGATTCTC-3'	700
*Okra-1469 *Okra-R2338	5'-CAGTGATGAGTTCCCCTGTG-3' 5'- GTCAAGTCCTACATCGACAAGG-3'	900
Détection de l'ADN Beta		
Beta01 Beta02 (Bridon <i>et al.</i> , 2002)	5'-GGTACCACTACGCTACGCAGCAGCC-3' 5'-GGTACCTACCCTCCCAGGGGTACAC-3'	~1400
Détection de l'ADN 1		
UN101 UN102 (Bull <i>et al.</i> , 2003)	5'-AAGCTTGCGACTATTGTATGAAAGAGG-3' 5'-AAGCTTCGTCTGTCTTACGAGCTCGCTG-3'	~1400
DNA101 DNA102 (Bull <i>et al.</i> , 2003)	5'-CTGCAGATAATGTAGCTTACCAG-3' 5'-CTGCAGATCCTCCACGTGTATAG-3'	~1400
Vérification des clonages pGEM3Zf (+)		
M13 F M13 R	5'-GTAAAACGACGGCCAGTG-3' 5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'	~3000

*Amorces dessinées pour les besoins de cette étude, nt = nucléotides

La cuve d'électrophorèse a été remplie avec le tampon TBE (1%) jusqu'à immersion totale du gel. Les ADNs amplifiés par PCR ont été mélangés avec du tampon de charge (0,040% bromophénol, 7% glycérol, 6 mM EDTA). Une quantité de 10 µl du mélange a été prélevée à l'aide d'une micropipette et déposée dans

des puits du gel d'agarose à 1%. La migration électrophorétique a été faite à 100 volts pendant 45 min. La visualisation a été faite sur un transilluminateur.

4. Séquençage direct des produits PCR

Les produits PCR issus des amplifications avec les amorces Navot *et al.* (1991), Wyatt et Brown (1996) ont été envoyés à la compagnie Cogenics (France) pour séquençage.

5. Clonage des génomes complets (ADN-A)

5.1. Amplification par Rolling Circle Amplification (RCA)

Cette technique a été utilisée au CIRAD, UMR 53 PVBMT CIRAD-Université de la Réunion, Pôle de Protection des Plantes. L'ADN total extrait par DNeasy® a été soumis à une réaction d'amplification en cercle roulant (RCA) utilisant le kit TempliPhi (Amersham, Biosciences) (**Figure 7**).

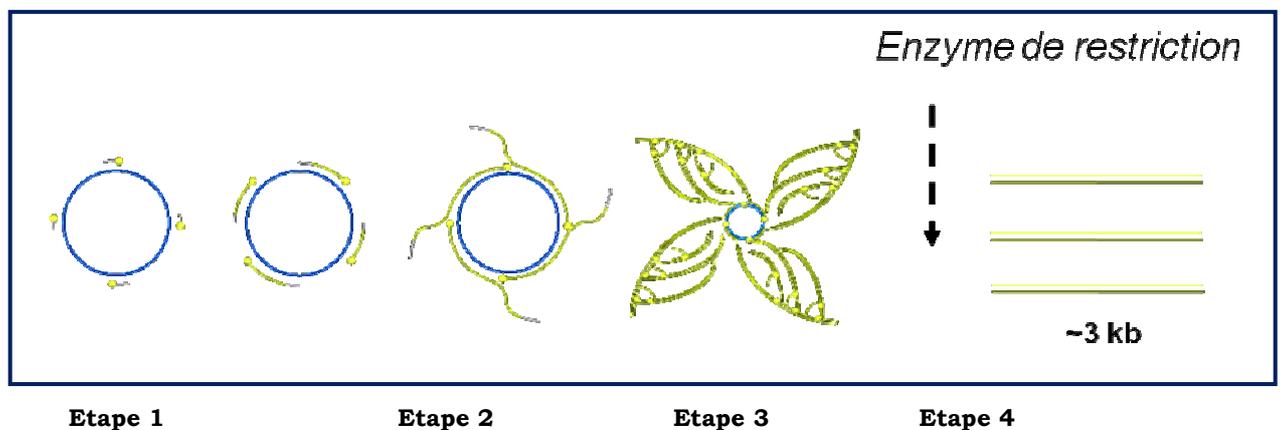


Figure 7 : Schéma du principe d'amplification par *Phi 29* (Rolling Circle Amplification).
Etape 1 : Les amorces s'accrochent à l'ADN cible ainsi que la polymérase du phage *Phi 29*; **Etape 2 :** Extension et synthèse d'un nouveau brin; **Etape 3 :** Processus d'amplification se répète sur les nouveaux brins d'ADN formés; **Etape 4 :** Digestion avec une enzyme de restriction appropriée.

L'ADN polymérase du bactériophage $\Phi 29$ amplifie l'ADN circulaire des *Geminivirus* en utilisant des hexamers comme primer (Inoue-Nagata *et al.*, 2004).

Pour cela, un volume de 3,5 µl de l'ADN a été dénaturé en présence de 2,5 µl du *sample buffer* à 95°C pendant 3 mn. Ce mélange a été alors amplifié pendant 20h à 30°C avec la *reaction buffer* et l'enzyme du phage Φ29. L'enzyme a été ensuite désactivée à 65°C pendant 20 mn.

5.2. Digestion par des enzymes de restriction et ligation vecteur-insert

Les produits d'amplification par la polymérase du phage Φ29 ont été digérés par une endonucléase (*Bam*HI pour l'ADN A chez plusieurs *Begomovirus*) ayant un site de restriction unique sur le génome à cloner (**Figure 7, Etape 4**). Un volume de 10 µl de l'amplifiat, 2 µl d'enzyme de restriction (*Bam*HI), 2 µl de tampon (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM Dithiothreitol ; pH 7,9), 6 µl d'eau ont été mélangés et laissés en incubation à l'étuve à 37°C pendant 3h. Les produits issus de cette réaction ont été déposés sur un gel d'agarose (0,7% p/v) et la bande d'intérêt située à environ 3 kb a été découpée et purifiée à l'aide du kit GENE CLEAN® (MP Biomedicals, EUROPE).

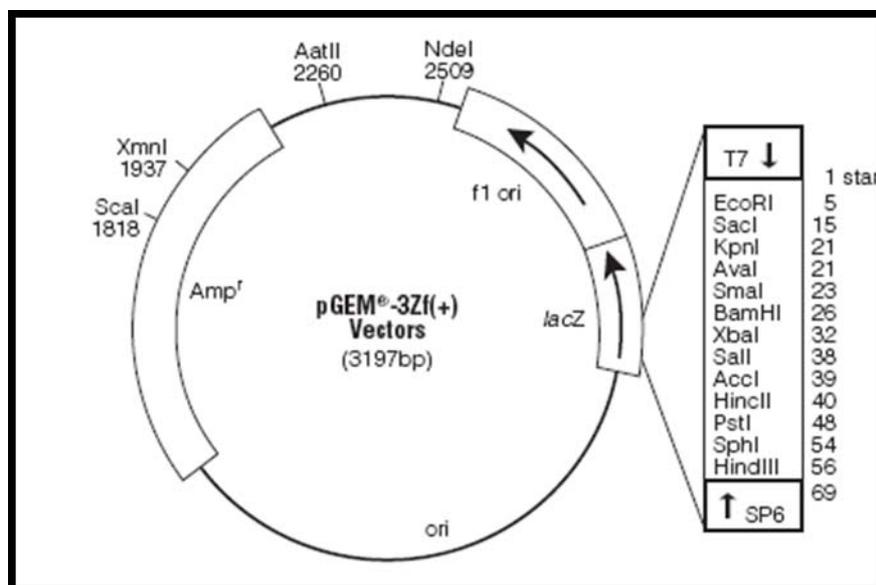


Figure 8: Représentation du vecteur pGEM®-3Zf(+) (source: Promega, USA)

Le vecteur utilisé a été le pGEM®-3Zf(+) (**Figure 8**); Il a été préalablement linéarisé par la même enzyme de restriction (*Bam*HI) et déphosphorylé par la phosphatase alcaline. Cette déphosphorylation permet au vecteur de ne pas se refermer sur lui-même. La digestion plasmidique s'est déroulée dans un volume final de 40 µl comprenant 20 µl du vecteur pGEM®-3Zf(+), 3 µl d'enzyme (*Bam*HI),

4 μ l de tampon enzymatique et 13 μ l d'eau durant 2 à 3 h. Pour la déphosphorylation, le mix était le suivant: 20 μ l de plasmide digéré, 2 μ l de phosphatase alcaline, 3 μ l de tampon (330 mM Tris-acetate à pH 7,8, 660 mM potassium acetate, 100 mM magnesium acetate et 5 mM dithiothreitol) et 5 μ l d'eau. La durée de cette dernière est de 10 mn à l'étuve à 37°C.

Une ligation de l'insert (7 μ l) et du vecteur déphosphorylé (1 μ l) a été réalisée grâce à la ligase du phage T4 (1 μ l) dans un tampon ligase (50 mM Tris-HCl, 10 MgCl₂, 1 mM ATP, 10 mM Dithiothreitol; pH 7,5) (1 μ l). Ce mélange d'un volume final de 10 μ l a été laissé au repos 1 h sur paillasse à température ambiante.

5.3. Transformation des bactéries compétentes JM-109

Le mélange insert-vecteur pGEM[®]-3Zf(+) a été ajouté à des souches JM-109 de *Escherichia coli* (50 μ l) préalablement conservées à -80°C et un choc thermique à 42°C pendant 45 s a été réalisé. Un volume de 200 μ l de LB (Milieu Luria Broth) liquide a été ajouté au mélange et les bactéries compétentes ont été laissées en croissance sous agitation pendant 1h 30 mn à 37°C. Elles ont été ensuite mises en culture à 37°C pendant une nuit dans des boîtes de Pétri contenant de la gélose LB, de l'ampicilline (1 μ g/ml), de l'IPTG (isopropylthio- β -D-galactoside) (100 mM) et de la X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) (20 mg/ml).

5.4. Sélection des colonies et extraction plasmidique

Les colonies bactériennes recombinantes ont été identifiées par leur couleur blanche (car ne synthétisant pas de la β -galactosidase) et les non recombinants qui synthétisent de la β -galactosidase étaient de couleur bleue. Pour mettre en évidence la présence ou non d'une activité β -galactosidase, deux réactifs sont indispensables: IPTG et X-Gal. IPTG induit par dérégulation, comme le fait physiologiquement l'allolactose, la synthèse de β -galactosidase, mais l'IPTG n'est pas hydrolysé par cet enzyme. X-Gal est un galactoside qui, de même que le lactose, peut être hydrolysé par la β -galactosidase. L'avantage de ce substrat sur le lactose, est que son hydrolyse libère, en plus du galactose, un substrat X (5-bromo-4-chloro-3-hydroxy-indole) coloré en bleu. Il est donc très facile de voir si de la β -galactosidase est ou non présente dans le milieu grâce à ce dérivé indole bleu insoluble formé lors de l'hydrolyse (à partir de X-Gal incolore). Chez les

recombinants, le gène *LacZ* est désactivé et ces bactéries sont incapables de métaboliser le substrat X-Gal. Finalement, les colonies blanches, témoins de la présence de recombinants, ont été précieusement recueillies.

Quelques colonies blanches bien visibles ont à chaque fois été sélectionnées. Pour vérifier que les inserts sont bien à la bonne taille, une PCR a été réalisée avec les amorces M13-F et M13-R en diluant simplement les colonies bactériennes dans le mix PCR. Les colonies présentant une bande à ~3kb ont été mises en culture dans du milieu LB liquide pendant 24h. Une extraction plasmidique est réalisée à l'aide du Kit QIAprep® Spin Miniprep (Qiagen, France).

6. Clonage des ADN satellites (ADN Beta et ADN-1)

Les ADN satellites Beta et Alpha ont été détectés respectivement avec les couples d'amorces Beta01/02 et DNA101/102 (Bridson *et al.*, 2002; Bull *et al.*, 2003). Ces ADN étant circulaires, ils ont été amplifiés à l'aide du kit TempliPhi comme l'ADN-A. Les bandes d'intérêt d'environ 1400 nucléotides ont été obtenues par digestion avec l'endonucléase *Pst*I pour l'ADN Beta et *Bam*HI pour l'ADN Alpha. Ces bandes découpées et purifiées ont été clonées dans le vecteur pGEM®-3Zf(+). La transformation de la souche JM-109 de *Escherichia coli*, la sélection des colonies recombinantes et la préparation pour le séquençage ont été faites comme ci-dessus pour le génome complet.

7. Séquençage des clones viraux

Pour obtenir les séquences virales clonées, les produits plasmidiques ont été séquencés par primer walking (Macrogen, Séoul, Corée du Sud). Le séquençage initial a été réalisé avec les primers M13 forward (M13-F) et M13 reverse (M13-R). D'autres amorces internes ont été dessinées sur la base des premières séquences afin d'obtenir la séquence complète des différents *Begomovirus*.

Il faut cependant noter que pour les ADN satellites, un seul séquençage avec les amorces M13-F et M13-R a suffi pour recouvrir toute la séquence d'environ 1400 nucléotides.

8. Traitement bioinformatique des séquences

Pour mieux comprendre les informations génétiques générées, des outils de la bioinformatique ont été utilisés. Les fragments de séquençage appelés "contigs" ont été assemblés à l'aide du logiciel DNAMAN (version 5.2.2, Lynnon Biosoft, Quebec, Canada). Une fois, les séquences consensus obtenues, l'algorithme BLASTn (NCBI) a été utilisé pour la recherche de l'identité des virus. Les séquences génomiques d'intérêt ont été ensuite retirées de GenBank-EMBL-DDBJ. Toutes les séquences obtenues ont été alignées avec l'algorithme ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) implémenté sous MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007). Les séquences alignées ont été utilisées pour les analyses phylogénétiques avec principalement le logiciel PAUP version 4.0 (sous Windows) (Swofford, 2000). Les modèles d'évolution ont été estimés par le ModelTest Server (Posada, 2006). Les arbres phylogénétiques ont été reconstruits soit par PAUP (Neighbour-joining) et visualisé par TreeView (Win32) 1.6.6, soit par PHYML_v2.4.4 (Maximum Likelihood) et visualisés par FigTree v1.1.2 (Guindon *et al.*, 2005). Dans tous les cas de figures, les arbres ont été construits avec 1000 répliquions de bootstrap.

9. Etude de l'infectivité des *Begomovirus* des piment-poivrons

9.1. Construction du clone agroinfectieux

Afin de vérifier que le seul *Begomovirus* caractérisé sur les piments et poivrons est bien responsable des symptômes observés, un clone agroinfectieux a été construit. En effet, le génome viral a été retiré du plasmide bactérien pGEM®-3Zf(+) par une digestion avec l'enzyme de restriction *Bam*HI. Ce génome linéarisé de 2779 bp a été ensuite digéré par *Nco*I et cette digestion a généré trois fragments dont les tailles sont les suivantes: 504 bp, 945 bp et 1330 bp. Le fragment de 945 bp correspondant à 0,34 mer a été découpé et purifié. Ce fragment d'intérêt contenant la tige boucle a été inséré dans le vecteur plasmidique pCAMBIA0380 (Cambia). Le génome entier soit 1 mer a aussi été ajouté à cette construction. Le plasmide recombinant a été multiplié dans la souche JM-109 de *Escherichia coli*.

Les plasmides recombinants (pCAMBIA0380) ont été transférés des cellules de *Escherichia coli* JM-109 (Promega) dans *Agrobacterium tumefaciens* (souche C58) par conjugaison triparentale utilisant *Escherichia coli* HMB101 contenant le plasmide helper pRK2013 (Ditta *et al.*, 1980). En pratique, les trois souches ont été mises en culture liquide: *Agrobacterium tumefaciens* à 28°C pendant 48h dans du milieu LB contenant de la Rifampicine et de la Gentamycine (G). Les deux souches de *Escherichia coli* ont été mises en culture à 37°C dans du LB contenant de la Kanamycine (K). Les densités optiques à 600 nm (DO₆₀₀) ont été mesurées et les volumes à centrifuger, calculés avec la formule suivante: Volume (ml)= [0,5/DO₆₀₀] x 0,5. Les différents volumes ont été centrifugés à 5000 rpm pendant 5 mn, puis les culots repris dans 0,5 ml de milieu LB liquide.

Le mélange constitué par les trois souches à raison de 30 µl par souche a été étalé sur une boîte LB solide sans antibiotique et incubé à 28°C pendant 48h. Toute la surface de la boîte de Petri recouverte de bactérie a été raclée dans 1 ml d'eau distillée stérile. Une série de dilutions a été réalisée et les dilutions 10⁻⁵ et 10⁻⁶ ont été étalées sur des boîtes de Petri LB + RGK et incubé à 28°C durant 48h. La vérification de la construction a été faite par une remise en culture dans du LB liquide (RGK), suivi d'une miniprep et d'une PCR de détection du virus avec les amorces VD360/CD1266 (Delatte *et al.*, 2005). Les colonies sur les boîtes LB + RGK ont servi aux agroinoculations.

9.2. Agroinoculations

Six cultivars de *Solanaceae* ont été utilisés pour tester l'infectivité du *Begomovirus* du piment. Il s'agit: du piment jaune du Burkina Faso (JBF), du piment rouge du Burkina Faso (RBF), du poivron cv. Yollo Wonder, du tabac (*Nicotiana benthamiana*), de la tomate cv. Farmer et du piment cv. Cayenne. Les agroinoculations ont été faites par piqûre à l'aide d'aiguille et le suivi des symptômes sur 30 jours. Les plantes ont été maintenues au laboratoire avec une photopériode de 12h/12h (lumière produite par des lampes fluorescentes blanches et rouges), une température de 25°C ± 2°C et une humidité relative de 60 ± 10. Au terme du suivi, toutes les plantes (symptomatiques et asymptomatiques) ont été testées par PCR avec le couple d'amorces dégénérées VD360/CD1266 (Delatte *et al.*, 2005).

CHAPITRE 3:

RESULTATS ET DISCUSSION

**Principales viroses des plantes maraîchères
au Burkina Faso**

1. Identification et écologie des principales viroses

Au Burkina Faso, au cours de l'inventaire des cinq (5) dernières années sur les maladies virales des plantes maraîchères, plusieurs symptômes ont été observés. L'utilisation des techniques de détection immunoenzymatique ELISA et des tests biologiques de transmission ont permis de relier les symptômes observés à cinq groupes de virus et à un viroïde. Ces cinq groupes de virus sont: *Tymovirus*, *Potyvirus*, *Tobamovirus*, *Potexvirus* et *Begomovirus*. Au total, onze virus appartenant à ces groupes ont été détectés sur les principales cultures maraîchères.

Sur la tomate (*Lycopersicon esculentum*) deux types de symptômes, liés à deux virus différents ont été observés, il s'agit du virus de l'enroulement des feuilles (TomLCV) et du virus de l'enroulement et jaunissement des feuilles (TYLCV). Ces deux virus causent des symptômes totalement différents et appartiennent au genre *Begomovirus*. Les symptômes de rabougrissement observés sur la tomate sont causés par le viroïde du rabougrissement apical de la tomate (RAT). Ces viroses sont très répandus dans le pays et menacent sérieusement la production de la tomate en saison sèche et en saison pluvieuse (Barro, 1994).

Le gombo (*Abelmoschus esculentus*) est menacé par deux groupes de virus : *Tymovirus* et *Begomovirus*. Le virus de la mosaïque du gombo (OMV), un *Tymovirus* est responsable de symptômes de jaunissement nervaires sur les feuilles de gombo (Barro, 1994). Des symptômes de repliements foliaires ont été aussi observés sur le gombo. Ces repliements foliaires sont causés par des *Begomovirus* dont l'Okra leaf curl virus (OLCV) (Konaté *et al.*, 1995). Ces deux virus sont parfois en association sur le gombo. L'OLCV est répandu sur le gombo dans tout le pays avec plusieurs formes de repliements accompagnés parfois de durcissement du limbe des feuilles.

Sur les piments (*Capsicum annum* et *Capsicum frutescens*), trois groupes de virus sévissent, ce sont: les *Potyvirus*, les *Tobamovirus* et les *Begomovirus*. Le *Potyvirus* détecté sur le piment est le virus de la panachure du poivron ou *Pepper vein mottle virus* (PVMV) (Barro, 1994; Konaté et Traoré, 1999). Le deuxième virus détecté sur les piments est le Virus de la mosaïque du poivron et du piment (VMT) qui appartient au genre *Tobamovirus*. Ces virus sévissent et avaient été

signalés lors des prospections réalisées sur les cultures maraîchères entre 1990 et 1994 (Barro, 1994). De nos jours, une nouvelle maladie a émergé sur les piments/poivrons avec des symptômes très sévères de réplissements foliaires, de présence de cloques et de légers jaunissements. Il s'agit d'un *Begomovirus* provisoirement nommé Pepper leaf curl virus (PepLCV) (Tiendrébéogo, 2006).

Sur la pomme de terre (*Solanum tuberosum*), deux virus ont été détectés. Il s'agit du PVX (*Potexvirus*) et du PVY (*Potyvirus*). Le PVX est le virus de la mosaïque de la pomme de terre qui provoque des jaunissements sur les jeunes feuilles et des lésions nécrotiques sur les vieilles feuilles (Traoré, 2002). Tandis que le PVY qui est le virus de la mosaïque nécrotique de la pomme de terre cause des lésions nécrotiques sur les feuilles avec des dessèchements très précoces (Traoré, 2002).

Deux autres *Begomovirus* ont été signalés. L'un sur le manioc, il s'agit du virus de la mosaïque africaine du manioc ou African cassava mosaic virus (ACMV) (Barro, 1994; Konaté *et al.*, 1995); l'autre sur le papayer avec des symptômes de repliement foliaire. Ce dernier a été nommé provisoirement Papaya leaf curl virus (PaLCV) (Tiendrébéogo, 2006; Barro *et al.*, 2007).

Tableau II: Bilan des virus infectant les plantes maraîchères

Plantes	Virus et Viroïde	Nombre de virus/ nombre total
Tomate	TomLCV ^a , TYLCV ^a , RAT	3/12 (25%)
Piment/Poivron	PVMV ^b , VMT ^c , PepLCV ^a	3/12 (25%)
Manioc	ACMV ^a	1/12 (8,33%)
Pomme de terre	PVX ^d , PVY ^b	2/12 (16,66%)
Gombo	OLCV ^a , OMV ^e	2/12 (16,66%)
Papayer	PaLCV ^a	1/12 (8,33%)

a: *Begomovirus*, b: *Potyvirus*, c: *Tobamovirus*, d: *Potexvirus*, e: *Tymovirus*.

Il ressort de l'analyse de ce tableau que les tomates et les piments/poivrons sont les plus infectées par les virus. Ensuite viennent la pomme de terre et le gombo. Ces espèces sont parmi les plantes maraîchères les plus importantes sur le plan économique et nutritionnel. Par ailleurs, des douze virus infectant ces plantes six appartiennent au genre *Begomovirus*. Ceci démontre l'importance de la menace que représentent ces *Begomovirus* sur les plantes hôtes sus-citées.

L'incidence de certaines de ces maladies était très importante (environ 90%) avec des symptômes sévères. Ces maladies ont été observées dans toutes les zones agroécologiques du pays avec une relative importance dans la moitié Ouest du pays.

2. Article 1 : Principales viroses des plantes maraîchères au Burkina Faso: symptômes et quelques aspects écologiques. [*Ann. Bot. Afr. Ouest* 4: 1-12, (2007)].

PRINCIPALES VIROSES DES PLANTES MARAICHERES AU BURKINA FASO : SYMPTOMES ET QUELQUES ASPECTS ECOLOGIQUES

BARRO N.¹, TIENDREBEOGO F.¹, TRAORE A. S.¹ et KONATE G.²

Biochimie/Virologie CRSBAN/ Université de Ouagadougou UFR SV
Département de Biochimie et Microbiologie

² Centre National de Recherche scientifiques et technologiques (CNRST) Institut de l'Environnement et de Recherches Agricoles (INERA) Centre de Recherches Agricoles et de Formation de Kamboise CRAFT Laboratoire de virologie

RESUME

Au Burkina Faso, au cours de l'inventaire des maladies virales des plantes maraîchères plusieurs symptômes ont été observés. L'utilisation du test ELISA et des tests biologiques ont permis d'identifier onze virus et un viroïde responsables des différents symptômes. Il s'agit du virus de l'enroulement des feuilles de la tomate (TomLCV) du virus l'enroulement et la jaunisse des feuilles de la tomate (TYLCV) du virus l'enroulement du gombo (OLCV), du virus de la mosaïque du gombo (OMV), du virus de la panachure du poivron (PVMV), du virus de l'enroulement des feuilles du poivron (PepPLCV), des virus X (PVX) et Y (PVY) de la pomme de terre, du virus de la mosaïque du poivron, du piment (TMV souche tomate) du virus de l'enroulement des feuilles du papayer (PaLCuV), du virus de la mosaïque africaine du manioc (ACMV) et du viroïde du rabougrissement apical de la tomate (RAT). Certaines maladies comme la mosaïque du gombo, l'enroulement du gombo et la panachure du poivron ont été observées aussi bien en saison sèche qu'en saison humide (de juin en septembre). L'incidence de certaines de ces maladies était très importante en saison sèche et pouvant atteindre 90%. Ces maladies ont été observées dans toutes les zones agroécologiques du pays. Cependant, elles sont plus importantes dans la moitié Ouest du pays.

Mots clés : Plantes maraîchères, maladies virus, symptômes, ELISA, écologie

SYMPTOMS AND SOME ECOLOGICAL ASPECTS OF IMPORTANT VEGETABLE CROPS VIRAL DISEASES IN BURKINA FASO

ABSTRACT

A seasonal surveys on vegetable crops viral diseases were done between 1990 and 2005 in Burkina Faso. Through the symptoms observation following by serological ELISA test (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), twelve main vegetable viral diseases were identified. The main virus causing these diseases were Tomato leaf curl virus (TomLCV),

Auteur pour correspondance : Université de Ouagadougou/UFR SVT/DBM /CRSBAN
03 BP 7021 Fax (226) 33 73 73 Tel portable (226) 62 11 51 E mail nicolas_barro@univ ouaga bf

Tomato Yellow leaf curl virus (TYLCV), Tomato bunchy top viroïd (PStV), Okra mosaic virus (OMV), Okra leaf curl virus (OLCV), Pepper venal mottle virus (PVMV), Pepper leaf curl virus (PepLCV), Potato virus X (PVX) Potato virus Y (PVY), Pepper mosaic virus (TomMV), Papaya leaf curl virus (PaLCuV) and African cassava mosaic virus (ACMV). These diseases were frequently observed between October and November in irriguous fields. Okra leaf curl, Okra mosaic and Pepper venal mottle diseases were always observed in dry and rainy season. Their incidences increased to reach an optimum of 90% in March and April. The ecological studies of these diseases showed that they occurred in all the climatic areas of Burkina Faso but mostly occurred in West area.

Key words : Vegetable crops, symptoms, viruses, ELISA, ecology.

INTRODUCTION

Dans plusieurs pays de l'Afrique de l'Ouest, de nombreuses maladies virales ont été décrites sur les cultures céréalières et maraîchères (Thottappily, 1992 ; Fauquet et Thouvenel, 1987). Ces virus causent d'importantes pertes de production sur ces espèces cultivées. Plusieurs études ont mis en évidence leur recrudescence sur les plantes maraîchères, qui sont d'une grande importance socio-économique. Au Burkina Faso, au cours des inventaires réalisés dans les dix dernières années sur les maladies virales des plantes cultivées au Burkina Faso, plusieurs virus ont été identifiés sur les céréales (Traoré et Konaté, 1997) sur les légumi-neuses (Neya, 2002) et sur les cultures maraîchères (Barro, 1994). Les études antérieures avaient identifiées les principaux virus suivants sur les plantes maraîchères : le virus de l'enroulement du gombo (OLCV), le virus de la mosaïque du gombo (OMV-BF), le complexe du virus de l'enroulement de la tomate (TYLCV), les virus X et Y de la pomme de terre

(PVX, PVY), le virus de la panachure du poivron (PVMV) (Konaté et Traoré, 1999), les virus de la mosaïque de poivron et des piments (VMTom) et le viroïde du rabougrissement apical de la tomate (RAT-BF). Les récentes études d'identification des virus (Barro, 2003) ont montré l'existence de plusieurs virus sur les plantes maraîchères. En outre, ces maladies autrefois observées dans quelques localités sont de nos jours recrudescentes dans toutes les régions agroécologiques du pays. Ce travail rapporte la description des symptômes pour une identification et reconnaissance facile des virus responsables, de leurs incidences, leurs périodes d'apparition et leurs distributions géographiques.

MATERIELS ET METHODES

MATERIEL VEGETAL

Les plantes de l'étude : l'étude a porté sur les plantes maraîchères, fruitières et à tubercule indiquées dans le tableau I.

Tableau I : espèces végétales retenues pour l'étude

Familles	Espèces
Solanaceae	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill <i>Solanum melongena</i> L. <i>Solanum nigrum</i> L. <i>Capsicum annuum</i> L. <i>Capsicum frutescens</i> L. <i>Solanum tuberosum</i> L.
Malvaceae	<i>Abelmoschus esculentus</i> (L.) Moench
Cucurbitaceae	<i>Cucumis sativus</i> L. <i>Cucurbita pepo</i> L.
Fabaceae	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
Brassicaceae	<i>Brassica oleracea</i> L.
Caricaceae	<i>Carica papaya</i> L.
Liliaceae	<i>Allium cepa</i> L.
Euphorbiaceae	<i>Manihot esculentus</i> Crantz.

Les plantes tests : elles ont été utilisées pour la détection et l'identification des virus. Il s'agit des plantes suivantes : *Chenopodium quinoa* Willd., *Chenopodium. amaranticolor* Reyn. et Coste, *Nicotiana benthamiana* Domin., *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench et de douze lignées de *Capsicum annuum* L. (Doux des Landes, HD 801, Florida VR2, Serrano Vera Cruz, HD 103, Avelar, Miord, PM 687, CM 334, Pérénial, Yolo Y et Yolo Wonder), *Datura stramonium* L., *Nicotiana glutinosa*, L., *Nicotiana tabacum* L. cv. samsun, *Phaseolus vulgaris* L. et *Cucumis sativus* L.

LES SITES ET PROSPECTIONS

Toutes les zones agro-écologiques du pays ont été prospectées. Les prospections ont été réalisées en continu une fois par mois pendant les trois premières années de l'études puis 4 fois par ans pendant les périodes de culture maraîchère. Elles ont été faites sur les périmètres irrigués, les abords des barrages et dans les champs de case. L'incidence c'est à dire le rapport entre le nombre de plants malades et nombre total de plants exprimé en pourcentage a été déterminée de deux manières : - par

sondage dans les parcelles de grandes surfaces; c'est à dire que l'incidence a été déterminée dans des carrés de 5m x 5m, la moyenne de ces incidences par carré a donné l'incidence dans la parcelle; - par dénombrement de tous les plants dans les petites parcelles.

L'ECHANTILLONNAGE ET LA DETECTION DES VIRUS

Notation des symptômes et collecte : les plantes malades portant les symptômes ont été minutieusement observées et les faciès des symptômes ont été notés sur des fiches conçues à cet effet.

Cinq à dix échantillons de feuilles à symptômes d'enroulement ou de mosaïque et de nécrose ont été prélevés sur les plants malades dans chaque parcelle. Les échantillons ont été mis en sachet plastique autoscélable, puis conservés dans la glace et acheminés jusqu'au laboratoire pour être analysés.

Détection par le test ELISA : les virus ont été détectés avec des anticorps spécifiques par le test immuno-

enzymatique, réalisé dans des plaques de microtitrations *Nunc-Immuno*TM, *MaxiSorp*TM Surface. Les anticorps, utilisés dans le test ELISA et spécifiques à chaque virus ont été obtenus par le Scottish Crops Research Institute, ou achetés à *Agdia Inc.* ou à *Sigma Immuno Chemicals*. Après l'incubation successive des différents ingrédients, la Densité Optique (DO), de chaque puits de la plaque a été mesurée à 405 nm ou à 492 nm avec un lecteur de plaque *Ö 960 Metertech* après une nuit d'incubation à 4°C.

La détection biologique : elle a consisté à l'inoculation mécanique des jeunes feuilles des plantes tests âgées de 15 à 30 jours, avec des extraits bruts de feuilles de plantes malades (1 g de feuilles a été broyé dans 2 ml de tampon phosphate 100 mM, pH 7,0 et le broyat a été filtré sur la gaze). Ces plantes inoculées ont été gardées pendant deux mois à l'abri des insectes dans une serre à 30°C, sous une humidité relative de 60 %, pour la manifestation des symptômes. Les plantes sans symptômes ou à symptômes douteux ont été testées par l'ELISA pour la confirmation de leur état d'infection.

RESULTATS

DESCRIPTION DES SYMPTOMES ET IDENTITES DES VIRUS RESPONSABLES

Les tableaux II et III montrent les réactions des plantes test vis-à-vis des différents virus et la description des symptômes caractéristiques de leurs infections. Les différentes plantes malades ont été facilement identifiées en champ par les symptômes typiques. En plus, les tests biologiques avec des plantes tests ont permis l'identification des virus. Lors des cas de symptômes douteux, le test de détection sérologique a été utilisé pour la confirmation de l'infection de la plante.

LA DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE DES VIRUS

Les douze principales maladies ont été observées dans toutes les régions agroécologiques du Burkina Faso (Figure 1). D'une façon générale c'est dans la moitié Ouest du pays que plusieurs virus ont été identifiés. Les maladies de l'enroulement de la tomate et de l'enroulement du gombo sont plus répandues dans tout le pays. La mosaïque du gombo et la panachure du poivron n'ont été observées que dans les régions du centre et de l'Ouest du pays. La mosaïque de la pomme de terre et le rabougrissement apical de la tomate ont été observés dans la région Nord et dans la partie centrale du pays. La mosaïque du poivron n'a été observée que les différentes localités visitées. Les autres ont été occasionnellement observées dans certaines localités.

LA DISTRIBUTION SPATIO-TEMPORELLE ET LA PREVALENCE DES MALADIES

Toutes ces maladies virales des plantes maraîchères ont été observées pendant la période sèche et froide qui est la période des cultures maraîchères au Burkina Faso (Figure 2). Les maladies de la mosaïque et de l'enroulement des feuilles du gombo de l'enroulement des feuilles du poivron et des feuilles du papayer ont été observées également en saison pluvieuse. Quant à la panachure et la mosaïque des piments, elles ont été observées pendant toute l'année sur des vieux plants tous infectés. Les plantes malades se présentaient soit façon isolée et dispersées dans le champ, soit en plages localisées en bordure ou dans les champs, soit enfin distribuées de façon homogène dans tous les champs.

L'incidence de la plupart de ces maladies était faible entre mai et

octobre sauf la mosaïque du poivron et l'enroulement des feuilles du poivron. Cependant, la proportion des plantes malades augmentait progressivement au fur et à mesure qu'on s'acheminait vers la fin de la campagne maraîchère en mars avril. A cette période des incidences de plus de 80% ont été

observées. Les incidences des maladies du gombo et la panachure du poivron atteignaient un maximum en septembre pendant la saison pluvieuse et entre les mois de mai d'avril en saison sèche. Les enroulements de la tomate ont été fréquemment observés en saison sèche avec des incidences plus élevées.

Tableau II : Recherche de virus par les tests ELSA et Biologique parmi les hôtes à symptômes

Plantes	Symptômes ¹	Virus recherchés	Réactions	
			ELISA	plante test
MALVACEAE				
<i>Abelmoschus esculentus</i> (L.) Moench	En	OLCV	+	1
<i>Abelmoschus esculentus</i> (L.) Moench	Mos	OMV	+	1
LILLIACEAE				
<i>Allium cepa</i> L	En	Begomovirus	-	0
CUCURBITACEAE				
<i>Cucumis melo</i> L	Mos	CMV	-	0
<i>Cucumis sativus</i> L	Mos	CMV	-	0
<i>Cucurbita pepo</i> L	T ag	Begomovirus	-	0
TILIACEAE				
<i>Corchorus olitorus</i> L	Mos	OMV	+	1
CARICACEAE				
<i>Carica papaya</i> L	En	PLCV	+	nt
SOLANACEAE				
<i>Lycopersum esculentum</i> Mill	En, J	TYLCV/TLCV	+	0
	En	TYLCV/TLCV	+	0
<i>Solanum incanum</i> L	En	Begomovirus	-	0
<i>Solanum incanum</i> L	Mos	PVMV	+	1
<i>Solanum tuberosum</i> L	Mos, J	PVX	+	1
<i>Solanum tuberosum</i> L	Mos,	NPVY	+	1
<i>Capsicum frutescens</i> L	En	PepLCV	+	nt
<i>Capsicum annum</i> L	En	PepLCV	+	nt
<i>Capsicum annum</i> L	Mos, C	PVMV	+	1
EUPHORBIACEAE				
<i>Manihot esculenta</i> Cranz	Mos, J, D	ACMV	+	1

1 = symptômes majeurs, En = enroulement des feuilles avec déformation des nervures, N= nécrose, D = déformation des feuilles, C = Chlorose, Mos = mosaïque, j = jaune, + = réaction positive, - = réaction négative, i = infection à réaction caractéristiques du virus recherché, T ag = taches argentées, o = pas d'infection. les plantes tests ont été infectées soit par inoculation mécanique soit par insectes vecteurs. * Barro, (1994)

Tableau III : Symptômes induits et virus ou viroïde identifiés sur les hôtes cultivés

Nature des symptômes et virus ou viroïdes	Hôtes naturels cultivés	Symptômes de la plante malade
Virus l'enroulement des feuilles de la tomate TomLCV (Begomovirus)	Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	Le plant malade avait un aspect buissonneux avec de nombreux bourgeons secondaires. Les folioles étaient rondes et enroulées en forme de cuillère. Sur certaines variétés elles étaient enroulées sur elles-mêmes. Les nervures étaient saillantes sur la face inférieure des feuilles. Il n'y avait pas de jaunissement.
Virus de l'enroulement et le jaunissement des feuilles de la tomate TYLCV (Begomovirus)	Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	Le plant malade avait un aspect buissonneux avec de nombreux bourgeons secondaires. Les folioles étaient rondes et enroulées en forme de cuillère. Sur la plupart des variétés elles étaient de couleur jaune chlorotique et souvent enroulées sur elles-mêmes.
Viroïde du rabougrissement apical de la tomate RAT (viroïde)	Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	Les plantes malades se sont distinguées par leur aspect rabougré avec les feuilles serrées au sommet de la tige. Les folioles de couleur verte foncée gaufrées, recourbées avec des nécroses brunes le long des nervures principales et souvent sur les branches et la tige.
Virus de la mosaïque du gombo OMV-BF (Tymovirus)	Gombo (<i>Abelmoschus esculentus</i>)	Des bandes jaunes bordaient les nervures puis s'élargissaient jusqu'à ne plus laisser que quelques petites taches vertes sur le limbe. Ce dernier apparaissait alors presque entièrement jaune.
Virus de l'enroulement du gombo OLCV (Begomovirus)	Gombo (<i>Abelmoschus esculentus</i>)	Les feuilles des plantes malades étaient rugueuses, enroulées soit sur elles-mêmes soit vers le bas avec des nervures épaisses, saillantes et sinueuses. Dans certains cas le pétiole était sinueux également. Le plant malade donnait des fruits petits et souvent enroulés.
Virus de l'enroulement des feuilles du piment PeplCV (Begomovirus)	Piment (<i>Capsicum annuum</i>)	Le plant malade avait un aspect buissonneux. Les feuilles étaient rondes, gaufrées et enroulées en forme de cuillère bas avec des nervures épaisses, saillantes et sinueuses. Une légère chlorose a été observée sur certaines feuilles.
Virus de la panachure du piment PVMV-BF (Potyvirus)	Piment (<i>Capsicum annuum</i>) et Piment (<i>Capsicum frutescens</i>)	Sur le piment la maladie provoquait des tâches vert-sombres, une chlorose internervaire, un gaufrage, l'apparition de cloques et une déformation des feuilles. Sur le piment en plus de la chlorose internervaire, il a été observé sur les jeunes feuilles des bandes vertes le long des nervures.
Virus de la mosaïque du piment et du piment VMTom (Tobamovirus)	Piment (<i>Capsicum annuum</i>) et Piment (<i>Capsicum frutescens</i>)	Les symptômes observés étaient variables dépendant dans la plupart des cas il y avait sur les feuilles une chlorose internervaire, des bandes vertes le long des nervures et de petites tâches vertes donnant à la feuille un aspect mosaïque.

Tableau III : Symptômes induits et virus ou viroïde identifiés sur les hôtes cultivés (suite)

Nature des symptômes et virus ou viroïde	Hôtes naturels cultivés	Symptômes de la plante malade
Virus de la mosaïque de la pomme de terre PVX (Potexvirus)	Pomme de terre (<i>Solanum tuberosum</i>)	La plante état de petite taille et les jeunes feuilles avaient un aspect rugueux avec une coloration jaune Des lésions nécrotiques ont été observées sur les vieilles feuilles
Virus de la mosaïque nécrotique de la pomme de terre PVY (Potyvirus)	Pomme de terre (<i>Solanum tuberosum</i>)	La plante état de petite taille et les jeunes feuilles avaient un aspect rugueux et avec une mosaïque Des lésions nécrotiques ont été observées sur les nervures et un jaunissement et dessèchement précoce des feuilles du bas de la plante
Virus de la mosaïque du manioc ACMV (Begomovirus)	Manioc (<i>Manihot esculenta</i>)	Sur les feuilles des plantes malades on a observé une mosaïque jaune verte couvrant 20 à 100% du limbe avec déformation des feuilles une réduction de l'appareil végétatif
Virus de l'enroulement des feuilles du papayer PaLCuV (Begomovirus)	Papayer (<i>Carica papaya</i>)	Les feuilles du papayer s'enroulaient vers le bas en une boule Le pétiole et les nervures sont épais et sinueux La plante présente un aspect rabougrissement apical Le virus responsable est le Papaya Leaf Curl Virus seulement décrit en Inde

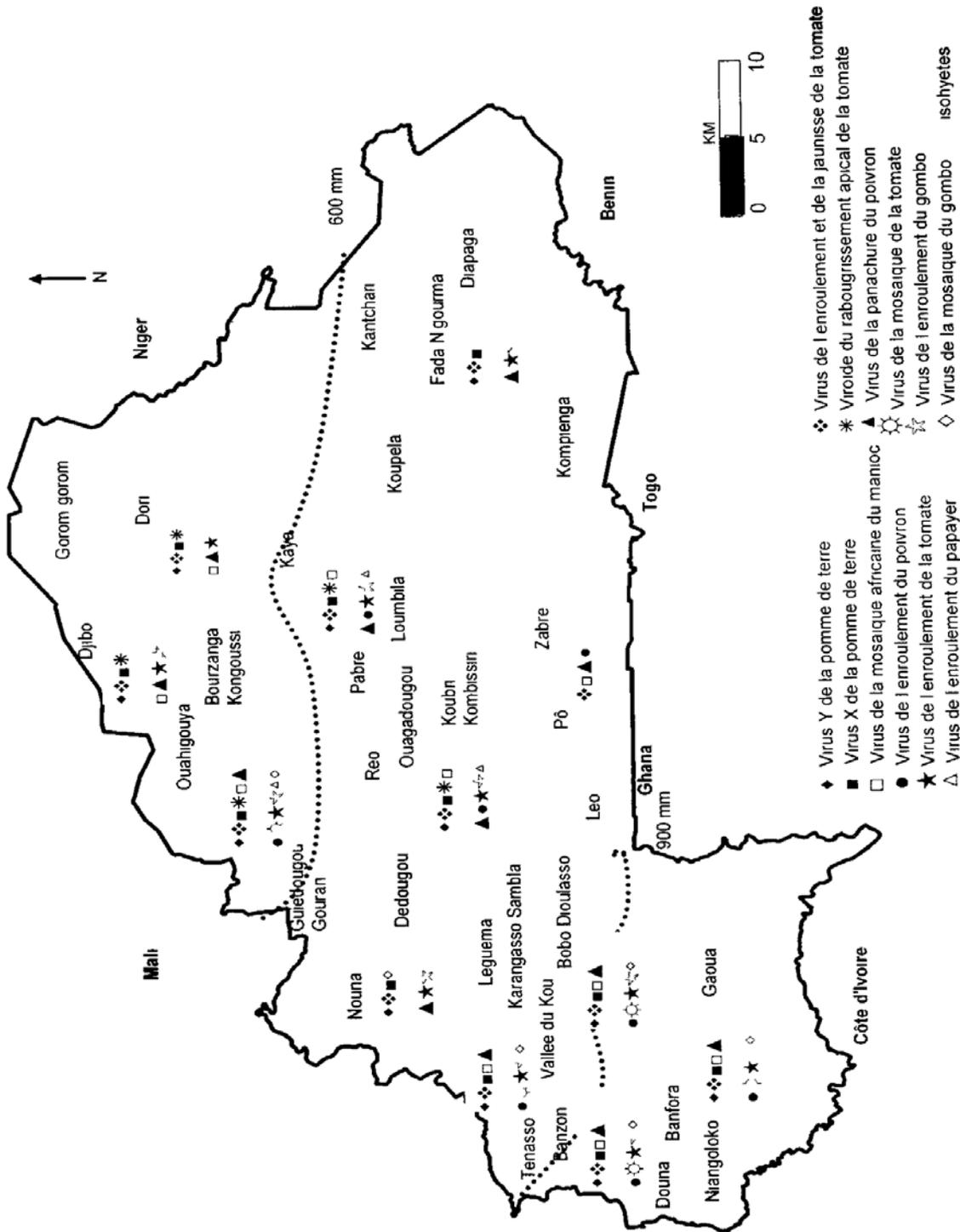


Figure 1 : Distribution géographique des principaux virus des plantes maraîchères au Burkina Faso

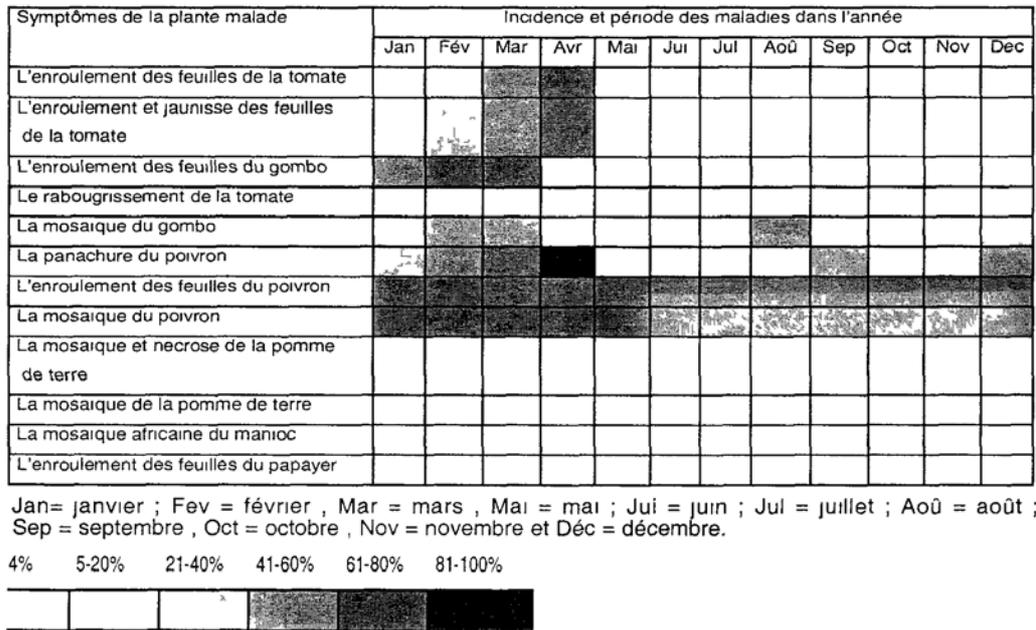


Figure II : Incidence et répartition spatio-temporelle des maladies

DISCUSSION

Onze virus et un viroïde sont responsables des principales maladies des plantes maraîchères au Burkina Faso. Ces maladies ont été identifiées sur la base des symptômes qui étaient assez nets et caractéristiques. En effet, les symptômes constituent l'un des premiers critères de distinction entre des plantes saines et malades. Dans certains cas (maladies Begomovirales) les symptômes se caractérisaient généralement par de la mosaïque et/ou des enroulements de feuille (Harrison et Robinson, 1999) associé à l'épaississement et la sinuosité du système de nervation et du pétiole Barro, 1994; (Brunt *et al.*, 1996). La mosaïque du gombo (Barro et Konaté, 1994) a été facilement identifiée sur la base de comparaison de symptômes similaires décrit en Côte d'Ivoire et au Nigeria (Givord, 1977 ; Atiri et Varma, 1984). Par contre, sur le poivron, le piment et la pomme de terre, les symptômes (chlorose, nécroses et mosaïque) ont difficilement été observés et décrits car

ils étaient souvent faibles et moins sévères cela est probablement liés aux souches responsables. Parmi ces maladies celles causées par les Begomovirus sont nombreuses et importantes, une étude récente a confirmé cela (Tiendrébéogo, 2006)

Les virus responsables des symptômes d'enroulement ont été identifiés par le diagnostic sérologique utilisant des anticorps spécifiques; Selon Konaté *et al.*, (1995), Swanson *et al.*, (1998) ces anticorps sont très efficaces pour la distinction et la caractérisation des Begomovirus. Ainsi, six Begomovirus ont été mis en évidence. En effet, ces virus sont transmis par un vecteur cosmopolite, la mouche Blanche (*Bemisia tabaci* Genn.). Elles sont très répandues dans le monde et causent de sérieux dommages sur les plantes maraîchères cultivées (Barro, 1994 ; Konaté *et al.*, 1995 ; Morales et Anderson, 2001 ; Mariones et Navas-Castillo, 2000). En effet, Cohen *et al.*, (1998); Atiri et varma, (1984) ont montré l'existence d'une

corrélation positive entre la taille de la population de vecteurs et la propagation de virus.

Les virus responsables des autres maladies en plus du test de détection avec des anticorps ont été identifiés sur la base des tests biologiques avec des plantes tests à réactions spécifiques. Ainsi, il a été identifié sur les piments le VMTom, le PVMV (Konaté et Barro, 1995 ; Barro, 1994 ; Konaté et Traoré, 1999). Sur la pomme de terre le PVX et le PVY ont été identifiés (Barro et Konaté, 1998, Traoré, 2002).

Les maladies sévissent selon l'importance de la culture dans les régions ou elles ont été observées. Leur taux de prévalence est élevé en saison sèche et froide, pendant laquelle on obtient des conditions meilleures de température, de photopériode et d'humidité favorable aux plantes maraîchères. La rareté des maladies dont les virus sont transmis par pucerons et les mouches blanches, pendant la saison pluvieuse est due aux intempéries. En effet, selon Khalifa et El-Khidir (1981); Fishpool et al. (1987), les violentes pluies l'humidité élevée et les vents forts des mois de juillet et d'août entraîneraient une forte mortalité par noyade de ces insectes. La persistance de ces maladies d'une saison à l'autre est sans doute liée d'une part à l'utilisation dans certains cas de semences infectées comme les tubercules provenant de plants malades de pomme de terre, d'autre part à l'existence de nombreux hôtes réservoirs constitués par les mauvaises herbes et les vieux plants malades. A partir de ces sources d'inoculum primaire les insectes propageront les virus dans les champs. Dans le cas du PVMV, VMTom, RAT-BF, et le PVX ils se transmettent facilement par contact par frottement et par les outils souillés de virus (Broadbent, 1976). Leur progression rapide peut s'expliquer en partie par ces faits.

Nos études antérieures des années 1990 à 1994 avaient rapportés un nombre réduit de virus et que ces maladies étaient présentes dans quelques localités et circonscrits aux abords des points d'eau (Barro, 1994). Aujourd'hui les maladies virales des plantes maraîchères sévissent dans toutes les régions de maraîcheculture du pays. L'importance de ces maladies sur les plantes dans la zone Ouest du pays est liée d'une part aux conditions agroclimatiques favorables et d'autre part à l'existence permanente de sources d'inoculum primaire autour des nombreux points d'eau. Par ailleurs, ces résultats indiquent la recrudescence des maladies Begomovirales dans la région ouest du pays ou les cultures maraîchères représentent une importante activité socio-économique et aussi une part importante dans l'alimentation des populations. L'anéantissement des champs par ces maladies peuvent alors avoir plusieurs conséquences sur le développement économique de la région et aussi sur les revenus annuels des ménages vivant de la maraîcheculture. La lutte contre la recrudescence de ces maladies est alors une bonne action de lutte contre la pauvreté et contre la malnutrition.

CONCLUSION

Plusieurs virus infectent les plantes maraîchères d'importance économique au Burkina Faso. Ces pathogènes autrefois circonscrits à certaines localités, sont de nos jours répandus dans toute les zones agroclimatiques du pays. Ainsi donc, les résultats de ces travaux serviront de guide d'identification des zones sinistrées et de reconnaissance rapide en champ des plantes malades pour leur élimination.

REFERENCES

- AL-MUSA A , 1982 - Incidence, economic importance and control of yellow leaf curl in Jordan Plant Disease 66 561-563
- ATIRI G I et VARMA A , 1984 - Effect of inoculation with okra mosaic virus on growth and yield of okra Tropical Agriculture 61 97-98
- BARRO N , 1994 - Caractérisation sérologique, biologique et aspects écologiques de quelques virus infectant les plantes maraîchères au Burkina Faso These de Doctorat 3^e cycle, Biochimie Microbiologie, Université de Ouagadougou, UFR-SVT, Ouagadougou (Burkina Faso), 171 p
- BARRO N , 2003 - Identification et différenciation sérologique des Begomovirus au Burkina Faso Rapport et d'activité projet Aire développement convention n°01-2-BF25 - 1, 15 p
- BARRO N et KONATE G , 1994 - Caractérisation biologique d'un isolat du virus de la mosaïque du gombo et aspects écologiques de la maladie au Burkina Faso Sciences et Technique, série Sciences Naturelles 21 (1) 6 - 18
- BARRO N et KONATE G , 1998 - Le virus X de la pomme de terre au Burkina Faso Reconnaissance sérologique et biologique Sciences et Technique, série Sciences Naturelle, 23 (1) 101-106
- BARRO N et KONATE G 1994 - Caractérisation biologique d'un isolat du virus de la mosaïque du gombo et aspects écologiques de la maladie au Burkina Faso Sciences et Technique série Sciences naturelles 21 6-18
- BARRO N et KONATE G , 1998 - Le virus X de la pomme de terre au Burkina Faso reconnaissance sérologique et biologique du virus Sciences et Technique, série Sciences Naturelles 23 101-106
- BROADBENT L ,1976 - Epidemiology and control of tomato mosaic virus Annual Review of Phytopathology 14 75-96
- BRUNTA A CRABTREE K, DALLWITZ M J, GIBBS A J ET WATSON L , 1996 - Bigeminiviruses Geminiviridae In Viruses of plant Description and list from the wide database , CABI pp 8-9
- BRUNTA A A , KENTEN R H et PHILLIPS S U E , 1978 - Symptomatologically distinct strain of pepper vein mottle virus from four West African Solanaceous crops Annals Applied of Biology 88 115-119
- COHEN S DIFFUS J E et BERLINGER MJ , 1998 - Epidemiological studies of withefly-transmitted viruses in California adisrael Final report BARD PROJECT N°1 589-83 ARD Bet Dagan Israel, 91p
- FAUQUET, C et THOUVENEL, J-C , 1987 - Maladies virales des plantes cultivées en Côte d'Ivoire documentation et techniques 1^{ère} édition ORSTOM, Paris n° 46
- FISHPOOL L D C , VAN HELDEN M , VAN HELDER I , FAUQUET C et FARGETTE D , 1987 - Monitoring of *Bemisia tabaci* population in cassava field count and trap catches In International seminar on african cassava mosaic disease and its control CTA,FAO,ORSTOM IITA,IAPC yamoussokro 4-7 Mai, pp 64-76
- GIVORD L , 1977 - Identification des souches du virus de la mosaïque du gombo (Okra mosaic virus) Annals of phytopathology 9 53-70
- HARRISON B D ROBINSON D J 1999 - Natural genomic and antigenic variation in withefly-transmitted geminiviruses (Begomoviruses) Annual Review Phytopathology 37 369-398
- KHALIFA A et EL-KHIDIR E , 1981 - Biological study of trialeurodes lubia and Bemisia tabaci (Aleyrodidae) Bulletin of Entomological Society of Egypt 48 115-120

- KONATE G et BARRO N , 1993 - Dissemination and detection of peanut clump virus in groundnut seed *Annals of Applied of Biology* 123 623-627
- KONATE G et TRAORE O , 1999 - Caracterisation et distribution du virus de la panachure du poivron en Afrique de l'ouest *Cahiers agricultures* 8 132-134
- KONATE G , BARRO N , FARGETTE D , SWANSON M M et HARRISSON B D , 1995 - Occurrence of whitefly-transmitted geminiviruses in crops in Burkina Faso, and their serological detection and differentiation *Annals of Applied of Biology* 126 . 121-129
- MARIONES E et NAVAS-CASTILLO J , 2000 - Tomato yellow leaf curl virus an emerging virus complexe causing epidemics worldwide *Viruses Research*, 71 123-134
- MORALES F J et ANDERSON P K , 2001 - Emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminivirus in Latin America *Archives of Virology* 146 : 415-441
- NEYA J B , 2002 - Variabilite serologique et aspects épidémiologiques du virus de la mosaïque du niébe (*Vigna unguiculata* (L) Walp) transmis par pucerons au Burkina Faso *Memoire de Diplôme d'études Approfondies*, Université de Ouagadougou, UFR-SVT, Ouagadougou (Burkina Faso) 47 p
- SWANSON M M , VALAND G B , MUNIYAPPA V et HARRISON B D , 1998 - Serological detection and antigenic variation of two whitefly-transmitted geminiviruses tobacco leaf curl and croton yellow vein mosaic viruses *Annal Applied of Biology* 132 427-435
- TIENDREBEOGO F , 2006 - Identification serologique et moleculaire de Begomovirus au Burkina Faso DEA, Université de Ouagadougou, Burkina Faso, 54 p
- THOTTAPPILLY G , 1992 - Plant virus diseases of importance to african agriculture *Journal of Phytopathoogy* 132 265-288
- TRAORÉ E S V , 2002 - Contrôle de la qualite sanitaire des tubercules de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L) utilises comme semenceaux au Burkina Faso detection des virus X et Y de la pomme de terre *Rapport de stage de fin d'etude de DUT*, Université de Ouagadougou UFR-SVT Ouagadougou (Burkina Faso), 30 p
- TRAORÉ O et KONATE G , 1997 - Viroses du maïs et hôtes reservoirs en Afrique occidentale et centrale *Cahiers agricultures* 6 257-262

**Les *Begomovirus*: une nouvelle menace pour la
production des piments au Burkina Faso**

1. Aspects généraux

Les travaux d'inventaire des principales viroses des plantes maraîchères au Burkina Faso ont abouti à la conclusion que les *Begomovirus* étaient les plus nombreux (Barro *et al.*, 2007). En Afrique, ce groupe de virus infecte des plantes d'intérêt économique comme le manioc, la tomate et le gombo avec des symptômes très sévères (Fargette *et al.*, 1987; Konaté *et al.*, 1995; Thresh *et al.*, 1998). Les *Begomovirus* sont transmis de façon permanente par la mouche blanche *Bemisia tabaci* aux plantes dicotylédones (Harrison et Robinson, 1999).

Ces dernières années, dans toute la région ouest africaine, les populations de mouches blanches ont augmenté à cause de leur résistance aux traitements insecticides (Otoïdobiya *et al.*, 2003). Cette augmentation de la population s'est accompagnée d'une émergence des maladies à *Begomovirus* avec des incidences plus élevées (Tiendrébéogo, 2006). Barro (1994) a montré un lien entre l'augmentation de la population du vecteur et l'apparition des infections bégomovirales notamment sur la tomate et le gombo. Au Burkina Faso, des symptômes de repliements foliaires retardant la croissance et affectant l'appareil végétatif des plants de piments ont été observés au centre et au Sud-Ouest du pays.

L'étiologie de la maladie caractérisée par des repliements et des distorsions foliaires sur les variétés de piments et les poivrons cultivées au Burkina Faso a été étudiée. Les surveillances conduites sur les parcelles de production de poivron (*Capsicum annuum*) et de piment (*Capsicum frutescens*) ont montré une grande prévalence de cette maladie. Le virus responsable de ces symptômes ne se transmet pas par inoculation mécanique, par contre sa transmission par les mouches blanches a été un succès avec un taux d'infection de plus de 80%. Ces données biologiques ci-dessus, et les données sérologiques et moléculaires ont montré que la maladie observée était associée à un *Begomovirus*. Le gène de la CP (protéine de capsid ou Coat Protein) de l'ADN du virus séquencé et analysé a présenté une identité nucléotidique de plus de 99% avec le même type de gène CP du *Pepper yellow vein Mali virus* (PepYVMV). L'analyse phylogénétique a montré que le virus décrit dans ce présent document (**Article 2**) est le PepYVMV.

Afin d'établir la taxonomie définitive du virus, les ADN-A de quelques virus ont été clonés et séquencés. Au total, dix (10) séquences complètes de l'ADN-A ont été obtenues et déposées dans la banque de donnée EMBL-GenBank-DDBJ (**Article 3**). L'analyse des séquences d'ADN-A a révélé la présence d'une région intergénique (IR) et de six (6) gènes que sont V1, V2, C1, C2, C3 et C4, caractéristiques des *Begomovirus* de l'ancien monde (Rojas *et al.*, 2005). Ces dix séquences génomiques ont plus de 98% d'identité nucléotidique entre elles et sont de ce fait des isolats d'un même virus. Un clone agroinfectieux a été construit avec une des séquences (numero d'accèsion FM876848) pour vérifier le postulat de Koch et tester l'infectivité du virus (Boyd, 1988). Les plantes de piments et poivrons (cultivars JBF, RBF, Cayenne Long, Yollo Wonder) agroinoculés sont restées asymptomatiques et le virus a été détecté par PCR dans 24% de piment JBF, 15% de RBF, 15% de Cayenne Long et 6% de Yollo Wonder. Chez la tomate (cv. Farmer) et *Nicotiana benthamiana* des symptômes de repliements foliaires, de nanisme et de jaunissement sont apparus sur respectivement 26% et 100% des plantes agroinoculées. Cela suggère que le virus seul n'est pas responsable des symptômes observés sur les piments mais contribuerait soit en interaction avec d'autres virus notamment les *Potyvirus* très fréquents sur les piments au Burkina Faso ou avec des facteurs environnementaux non encore élucidés. Avec la vérification du postulat de Koch et la présence du virus sur la tomate au Mali, Zhou *et al.* (2008) ont proposé de renommer le virus *Tomato yellow leaf crumple virus* (ToYLCrV) en remplacement de *Pepper yellow vein Mali virus* qui avait été donné au virus sur la base des symptômes observés sur les piments.

En conséquence, nous avons proposé la dénomination de ToYLCrV au *Begomovirus* caractérisé sur les piments au Burkina Faso en suivant les règles de nomenclature des *Geminiviridae* (Fauquet *et al.*, 2008). Ce sont: *Tomato yellow leaf crumple virus*-[Burkina Faso:Bazega:sweet pepper:2007] (ToYLCrV-[BF:Baz:SPe:07]; FM876847), *Tomato yellow leaf crumple virus*-[Burkina Faso:Bazega:hot pepper1:2007] (ToYLCrV-[BF:Baz:HPe1:07]; FM876848), *Tomato yellow leaf crumple virus*-[Burkina Faso:Ouagadougou:sweet pepper1:2008] (ToYLCrV-[BF:Oua:SPe1:08]; FM876849), *Tomato yellow leaf crumple virus*-[Burkina Faso:Ouagadougou:hot pepper:2008] (ToYLCrV-[BF:Oua:HPe:08]; FM876850), *Tomato yellow leaf crumple virus*-[Burkina Faso:Ouagadougou:sweet

pepper2:2008] (ToYLCrV-[BF:Oua:SPe2:08]; FM876851), *Tomato yellow leaf crumple virus*-[Burkina Faso:Bazega:hot pepper2:2008] (ToYLCrV-[BF:Baz:Hpe2:08]; FM876852), *Tomato yellow leaf crumple virus*-[Burkina Faso:Banfora:hot pepper1:2009] (ToYLCrV-[BF:Ban:Hpe1:09]; FN555172), *Tomato yellow leaf crumple virus*-[Burkina Faso:Banfora:hot pepper2:2009] (ToYLCrV-[BF:Ban:Hpe2:09]; FN555173), *Tomato yellow leaf crumple virus*-[Burkina Faso:Banfora:hot pepper3:2009] (ToYLCrV-[BF:Ban:Hpe3:09]; FN555174), *Tomato yellow leaf crumple virus*-[Burkina Faso:Pô:hot pepper:2009] (ToYLCrV-[BF:Pô:Hpe:08]; FN555171) (**Article 3**).

Ces résultats ont fait l'objet des deux articles (**Article 2 et Article 3**).

2. Article 2: Characterization of *Pepper yellow vein Mali virus* in *Capsicum sp.* in Burkina Faso. [Plant Pathology Journal 7 (2): 155-161, (2008)].

Characterization of Pepper yellow vein mali virus in *Capsicum* sp. in Burkina Faso

¹Fidèle Tiendrébéogo, ²V.S. Edgar Traoré, ¹Nicolas Barro,

¹Alfred S. Traoré, ²Gnissa Konaté and ²Oumar Traoré

¹Laboratoire de Biochimie and Biologie Moléculaire, CRSBAN/UFR/SVT,
Université de Ouagadougou, 03 BP 7021 Ouagadougou 03, Burkina Faso

²Institut de l'Environnement et de Recherches Agricoles (INERA),
01 BP 476 Ouagadougou 01, Burkina Faso

Abstract: The aetiology of a disease characterized by severe leaf curling and leaf distortion symptoms in peppers was studied in Burkina Faso. Surveys were conducted in fields planted with sweet pepper (*Capsicum annuum*) and hot pepper (*Capsicum frutescens*) to collect leaf samples and assess disease incidence. Collected samples were analyzed using biological tests (mechanical inoculation and whitefly transmission), triple-antibody-sandwich-enzyme linked-immunosorbent assay (TAS-ELISA), Polymerase Chain Reaction (PCR) and sequence analysis. Mechanical inoculation tests were negative while transmission by the whitefly *Bemisia tabaci* led to infection rates of more than 80%. TAS-ELISA and PCR tests indicated that symptoms observed were associated with begomovirus infections. Involved virus isolates showed pairwise nucleotide identity of more than 99% with Pepper yellow vein mali virus (PepYVMV) and formed with this virus a distinct clade in phylogenetic analyses. Altogether, these results indicated that PepYVMV was the causal agent of leaf curling symptoms in peppers.

Key words: Pepper, leaf curling, aetiology, *Bemisia tabaci* Genn., *Begomovirus*

INTRODUCTION

Geminiviruses (family *Geminiviridae*) have emerged as economically important plant pathogens worldwide (Harrison and Robinson, 1999). The *Geminiviridae* family owns its name from a common feature shared by all virus member species which have twin or geminate particles. Most virus species in this family have bipartite genome, the two genomic components being called DNA-A and DNA-B both of which are circular and single-stranded DNA. DNA-A encodes functions necessary for viral replication and encapsidation, while genes on DNA-B are required for viral movement in plants (Lazarowitz, 1992). Some virus species have monopartite genomes and possess DNA-A component only. Part of monopartite begomoviruses have been found associated with a satellite molecule called DNA β which function is not fully known. However, it was found that DNA β plays an essential role in symptom induction by the begomovirus to which they are associated and in the increases of the level of viral nucleic acids in infected plants (Saunders *et al.*, 2000; Mansoor *et al.*, 2003).

The *Geminiviridae* family is composed of four virus genera (*Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Begomovirus* and

Topocuvirus) which have been distinguished in relation to host range, insect vector and genome organization (Stanley *et al.*, 2005). Begomoviruses have monopartite or bipartite genomes, are transmitted by the whitefly *Bemisia tabaci* Genn. and infect dicotyledonous plants. They formed the group of viruses formerly known as whitefly-transmitted geminiviruses (WTGs) (Harrison and Robinson, 1999). Common symptoms induced by begomoviruses include leaf-curling, mosaic, vein yellowing or more generalized leaf yellowing, often accompanied by stunting of infected plants and therefore severe yield losses. Besides their transmission by the same vector *B. tabaci*, begomoviruses exhibit close serological relationships among member species (Harrison and Robinson, 1999). This feature makes it possible to detect almost all begomoviruses with antibodies raised against a particular virus species of the genus. However, serology is not fully suitable for distinguishing between virus species. For this purpose, new molecular tools especially those targeting the viral genome had to be developed (Wyatt and Brown, 1996).

Early studies showed that tubers plants such as cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and vegetables such as tomato (*Lycopersicon esculentum* L. Mill) and okra

Corresponding Author: Dr. Oumar Traore, Laboratoire de Virologie et de Biotechnologies Végétales INERA/CNRST,
01 BP 476 Ouagadougou 01, Burkina Faso. Tél: +226 50319208 Fax: +226 50340271

Plant Pathol. J., 7 (2): 155-161, 2008

(*Abelmoshus esculentus* L. Moench) were severely affected by WTGs in different parts of Africa (Fargette *et al.*, 1987; Konate *et al.*, 1995; Thresh *et al.*, 1998). Since the last decade, with the emergence of the *Bemisia tabaci* in West Africa due to resistance to insecticides (Otoïdobia *et al.*, 2003), begomoviruses have become a major constraint to vegetable production in this region. Particularly, in Burkina Faso, new diseases most of which involved leaf curling symptoms appeared in peppers (*Capsicum* sp.). These symptoms resemble those induced by begomovirus infections and were clearly distinct from mosaic symptoms already reported to be caused by the *Pepper vein mottle virus* in the country (Konaté and Traoré, 1999). Although pepper plantings were severely affected, the problem was not paid much attention and even the causal agent of observed the symptoms has not been clearly identified. The research described here was aimed at establishing the etiology of leaf curling symptoms commonly observed in pepper plantings in Burkina Faso.

MATERIALS AND METHODS

Leaf samples collection: During the years 2005 and 2006, pepper fields were surveyed in five localities of Burkina Faso (3 to 10 fields per locality) in some of the country main vegetable crops producing areas (Fig. 1). Virus samples were collected in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) and hot pepper (*Capsicum frutescens*) field plantings. Leaves were collected from symptomatic plants and some leaves were also taken from symptomless plants to be used as negative controls. Leaf samples were put in small sampling plastic bags maintained on ice for two to three days. Upon arrival in the laboratory, they were immediately analysed or kept at -20°C for future processing.

Plant inoculation: All transmission tests were done in an insect-proof greenhouse with temperature between 25 and 30°C and 80-90% relative humidity. Seeds of sweet pepper (*C. annuum* cv. Yolo Wonder) and hot pepper (*C. frutescens* cv. JBF) were sown in steamed-sterilized soil. Emerged seedlings were transplanted in plastic pots 30 days after sowing and inoculated 10 days later. In a first experiment, leaves from infected pepper plants were ground in 1 M phosphate buffer, pH 8.0 and the sap was subsequently rubbed onto leaves of healthy seedlings. In a second experiment, viruliferous adult insects (*B. tabaci*) were allowed a 48 h acquisition-access period on diseased plants of both *C. annuum* and *C. frutescens* collected from the fields. Three diseased plants per species and from distinct localities were used. Then, 20 insects were placed

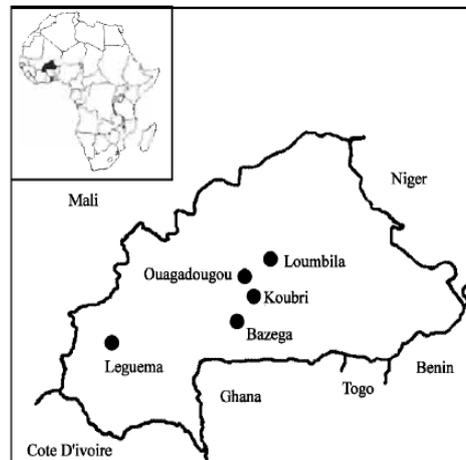


Fig. 1: Map of Burkina Faso showing locations of collection of leaf samples

on healthy pepper seedlings maintained in individual transmission cages for an inoculation access-period of 48 h. Transmission tests from every diseased plant were done to five healthy seedlings of each of the two pepper species. Insects were subsequently removed and the plants were treated with a systemic pyrethroid insecticide. All inoculated plants were monitored for symptom development during 45 days post-inoculation.

Seed transmission tests: Seeds were collected from field-infected pepper plants (*C. annuum* and *C. frutescens*) and air-dried for three months. A total of 1000 seeds (500 seeds per pepper species) were subsequently sown in sterile soil. After germination, seedlings were maintained in the greenhouse for two months to monitor any development of symptoms.

Serological tests: Leaf samples were analyzed by triple antibody sandwich enzyme linked-immunosorbent assay (TAS-ELISA), as described in Zhou *et al.* (1997). The monoclonal antibodies (MAbs) to *African cassava mosaic virus* (ACMV) and *Okra leaf curl virus* (OkLCuV) were kindly provided by Dr. B.D. Harrison, Scottish Crop Research Institute, UK. Absorbance readings were recorded at 405 nm using a Metertech Σ 960 automatic microplate reader.

Nucleic acid extraction, PCR and sequencing: Total nucleic acids were extracted from two selected leaf samples using the CTAB method as described by Doyle and Doyle (1987). Polymerase Chain Reaction (PCR) tests

Table 1: List of begomoviruses from Genbank database used in phylogenetic analyses

Virus/Isolate	Abbreviation	Accession No.
Pepper yellow vein Mali virus	PepYVMV	AM691548
Tobacco leaf curl Zimbabwe virus	ToLCZV	AM701756
Tomato curly stunt virus	TomCuSV	AF261885
Tomato leaf curl Madagascar virus	TomLCMaV	AJ865338
Tomato yellow leaf curl Mali virus Ethiopia	TYLCMV Eth	DQ358913
Tomato yellow leaf curl virus Mild Spain	TYLCVMild	AF071228
Tomato yellow leaf curl Mali virus	TYLCMV	AY502934
Tomato yellow leaf curl virus Iran	TYLCVIran	AJ132711
Tomato yellow leaf curl virus Cucumber	TYLCVCu	EF433426
South African Cassava mosaic virus ZW	SACMVZW	AJ575560
South African Cassava mosaic virus M12	SACVM12	AJ422132
East African Cassava mosaic virus Zanzibar	EACMVZan	AF422174
East African Cassava mosaic virus K12	EACMVK12	AJ717561
Okra yellow crinkle virus Mali	OkYCVM	EU024118
Mimosa yellow leaf curl virus	MiYLCV	DQ641695
Ageratum enation virus	AgENV	AJ437618
Tomato yellow leaf curl virus from USA	TYLCVUSA	EF110890
Tomato yellow leaf curl virus from Jordan	TYLCVJor	EF054893
Tomato yellow leaf curl virus from Uganda	TYLCVUg	DQ127170
Tomato yellow leaf curl virus Sardinia	TYLCVSar	L27708

were performed using degenerate primers designed for amplification of the core region of begomoviruses coat protein located on DNA-A. Two pairs of primers (P1 and P2) were used. Primer pair P1 consisted of primers PTYv369 (5'-ACGCCGCTCGAAGGTTTCG-3') and PTYcl023 (5'-CGTCAGCCATATACAATAACAA GGC-3'). Primer pair P2 comprised primers V324 (5'-GCC(CT)AT(GA)TA(TC)AG(AG)AAGCC(AC)AG-3') and C889 (5'-GG(AG)TT(ATG)GA (GA)GCATG(TCA)GTAC ATG-3'). PCR conditions were those described in Navot *et al.* (1991) and in Wyatt and Brown (1996), respectively for primers pairs P1 and P2. To check amplifications, 10 µL of PCR products were electrophoresed in 1% agarose gels, subsequently stained with ethidium bromide and viewed under UV transillumination. PCR products were sequenced using the *Taq* terminator sequencing kit (Applied Biosystems) and analyzed on an Applied Biosystems 373A sequencer. To get adequate sequence accuracy, two readings per base (in the 3' to 5' and 5' to 3' directions) were done (Fargette *et al.*, 2004). Sequences obtained were assembled by Seqman (DNASTAR) and a blast search (www interface) was performed to retrieve homologous sequences. The database accession numbers of the begomovirus sequences retrieved are indicated in Table 1. Then, the whole corpus of sequences was aligned by Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) and the phylogenetic software Paup (Swofford, 2000) was used to analyse phylogenetic relationships between begomoviruses in the corpus.

RESULTS

Description of field symptoms: The most prominent symptoms were severe distortions of the leaves of

infected plants (Fig. 2). There was an overall upward curling of the leaves especially when the plants were infected at an early stage. When infection happened in late stages, symptoms were always present on top leaves whereas basal leaves maintained a relatively normal shape. In addition to leaf curling, leaf distortions also included formation of several swellings with dark green margins resembling mosaic symptoms (Fig. 2a). At the whole plant scale, infected plants were stunted, giving a stacked aspect to the leaves. Moreover, infected plants produced smaller fruits with irregular maturity. Most of the time, disease incidence reached 100% in pepper fields surveyed, regardless of the pepper species and the localities of surveys. However, marked differences were noticed in disease severity, indicating discrepancies in time of disease establishment between fields.

Transmission tests: No plant inoculated mechanically developed any disease symptom. Inoculated plants showed aspects similar to that of healthy uninoculated plants. By contrast, in transmission test through the whitefly *B. tabaci*, inoculated seedlings of sweet and hot peppers showed symptoms which were similar to those observed on field infected plants. Transmission tests were highly successful as infection rates were between 80 and 100%, regardless of the virus source and the tested plants. In almost all cases, infected plants become stunted and produce no fruit. When seeds from diseased plants were sown, emerged plantlets remained healthy throughout the experiment, indicating the absence of seed transmission.

Begomovirus detection by serology: MAbs directed to ACMV and OkLCuV reacted with all tested symptomatic samples in TAS-ELISA, indicating virus detection in these

Table 2: Detection of begomoviruses in infected pepper leaf extracts by TAS-ELISA using monoclonal antibodies (MAbs)*

Leaf extracts ^b	Plant species	MAbs against ACMV					MAbs against OkLCuV				
		SCR 12	SCR 14	SCR 16	SCR 25	SCR 53	B1	B3	C12	C5	C1
S1	<i>C. annuum</i>	5	2	3	0	0	0	5	0	1	0
S2	<i>C. annuum</i>	5	2	3	0	0	0	5	0	1	0
S3	<i>C. frutescens</i>	2	2	2	0	0	0	5	0	1	0
S4	<i>C. annuum</i>	5	2	3	0	0	0	5	0	1	0
S5	<i>C. annuum</i>	5	2	3	0	0	0	5	0	1	0
S6	<i>C. frutescens</i>	2	2	3	0	1	0	3	0	0	0
S7	<i>C. frutescens</i>	2	1	2	0	0	0	4	0	1	0
S8	<i>C. frutescens</i>	2	2	3	0	0	0	3	0	1	0
S9	<i>C. frutescens</i>	2	3	3	0	0	0	5	0	1	0
S10	<i>C. annuum</i>	5	3	3	0	0	0	5	0	1	0
OkLCuV-infected okra	Okra	2	2	1	0	5	4	5	3	3	5
ACMV-infected cassava	Cassava	5	5	5	3	4	0	5	0	1	0
Healthy controls	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

*: MAbs were directed to *African cassava mosaic virus* (ACMV) and *Okra leaf curl virus* (OkLCuV), respectively. Figures in the table are reaction scores that represent intensity of reactions as follows: 5 (A405 nm⁻¹ > 1.8), 4 (1.21-1.8), 3 (0.61-1.2), 2 (0.31-0.6), 1 (0.15-0.3), 0 (<0.15). ^b: Leaf extracts of okra and cassava infected by OkLCuV and ACMV respectively, were used as positive controls. Healthy controls included leaf extracts of *C. annuum*, *C. frutescens*, cassava and okra, respectively



Fig. 2: Field symptoms of severe distortions (a) and upward curling (b) of the leaves of diseased peppers

samples (Table 2). Reactions of respective healthy leaf extracts were all negative and allowed clear distinction from those of extracts from diseased leaves. As expected, OkLCuV-infected leaf extract reacted more strongly with anti-OkLCuV MAbs than anti-ACMV MAbs and vice versa. Both OkLCuV-infected and ACMV-infected extracts reacted differently from any of the symptomatic pepper leaf extracts. Half of the MAbs (SCR12, SCR14,

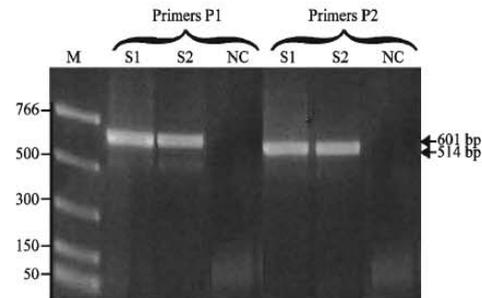


Fig. 3: PCR-amplified fragments from four virus samples (S3, S4, S6 and S10) visualized in ethidium-bromide-stained 1% agarose gel. PCR amplification was done using primers pairs P1 (PTYv369/PTYc1023) and P2 (V324/C889) both directed to the core region of begomoviruses. M: PCR markers (sizes in bp); S3 and S6: infected *Capsicum frutescens* cv. JBF; S4 and S10: infected *Capsicum annuum*; NC: negative controls (healthy *C. frutescens* and *C. annuum*, respectively). Expected fragments from each pair of primers are indicated by arrows

SCR16, B3 and C5) reacted with most pepper leaf extracts. In contrast, no pepper leaf extract reacted positively with four MAbs (SCR25, B1, C1 and C12) while extract S6 weakly reacted with SCR53. Overall, pepper extracts could be divided in three main groups according to their serological reaction profiles. Group 1 included samples S1, S2, S4, S5 and S10 which reacted strongly with MAbs SCR12 and B3. Samples in group 2 (S3, S7 and S9) reacted strongly with MAb B3 but weakly with SCR12. In the last group (S6 and S8), samples reacted weakly with both MAbs B3 and SCR12.

Plant Pathol. J., 7 (2): 155-161, 2008

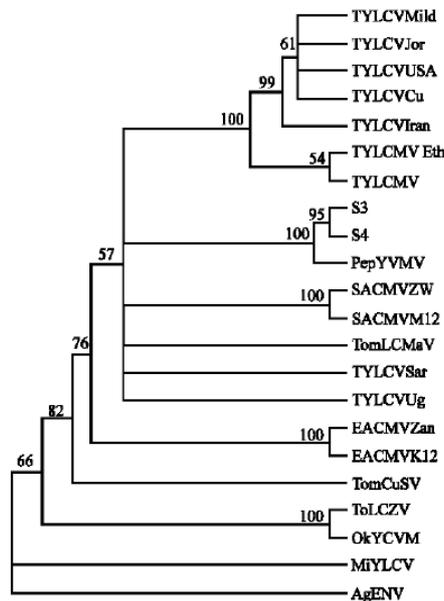


Fig. 4: Phylogenetic tree showing relationships among pepper-infecting begomoviruses and other representative begomoviruses based on multiple alignments of nucleotide sequences of the coat protein core region. The tree was constructed by the neighbour-joining method as implemented in PAUP (Swofford, 2000). Bootstrap supports of the nodes are indicated as percentages (from 1000 replicates) branches with bootstrap values less than 50% were collapsed

PCR amplification and sequence analysis: Two fragments of 601 and 550 bp were amplified using the two sets of degenerate primers P1 (PTYv369/PTYc1023) and P2 (V324/C889), respectively (Fig. 3). Normally, primer set P2 was the one chosen to be used in all PCR tests. Unfortunately, no amplification was obtained from samples S3 and S6 when primer set P2 was used. Therefore, primer set P1 was tested and successfully used for DNA amplification in these two samples.

Sequences of PCR-amplified fragments from samples S3 and S4 were compared to those of 20 begomoviruses retrieved from Genbank database. Sequence identity was 99.8% between S3 and S4. Of begomoviruses included in the analysis, only *Pepper yellow vein Mali virus* (PepYVMV) had particularly high sequence identity with samples S3 and S4 (99.0 and 99.2%, respectively). Sequence identity between the two samples and other begomoviruses ranged from 72.6 and 84.8%. Phylogenetic

analyses indicated that both samples S3 and S4 clustered with PepYVMV and their clade was clearly distinct from any other clade (Fig. 4).

DISCUSSION

Begomoviruses are known to induce a diversity of symptoms in the plants they infect (Harrison and Robinson, 1999). However, leaf curling and other leaf distortions seem to be the most frequent symptoms associated with infections caused by begomoviruses (Paximadis *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2004; Seal *et al.*, 2006). Severe leaf curling symptoms were observed in recent years in peppers in Burkina Faso but no virus associated with such symptoms was reported. In this study, mechanical inoculation tests of the causal agent were unsuccessful. Because whiteflies were the most frequent insects observed in affected pepper fields, transmissions through these insects were attempted. Unlike in mechanical inoculation tests, disease symptoms were readily induced through transmissions by whiteflies, as infections rates were higher than 80%.

Virus transmission by *B. tabaci* is somewhat specific. Particular genes involved in the ability of this species to transmit plant viruses have been reported (Liu *et al.*, 1998). However, more than 111 plant viruses including begomoviruses, criniviruses, carlaviruses and ipomoviruses are transmitted by the insect (Jones, 2003). Therefore, virus transmissibility by *B. tabaci* cannot be used as the only criterion for virus identification. In this study, leaf samples taken from diseased pepper plants were positive in TAS-ELISA using antibodies raised against begomoviruses. Added to transmission by *B. tabaci*, this result indicated that leaf samples were infected by viruses which belong to the *Begomovirus* genus.

Although transmission by *B. tabaci* and serological tests, especially using monoclonal antibodies are two useful criteria for identification of begomoviruses, they are not suitable for taxonomic demarcation of begomovirus species (Brown *et al.*, 2001; Fauquet *et al.*, 2003). The core CP gene was successfully amplified from diseased pepper leaf samples by PCR. This result is consistent with transmission and serological data and confirms the begomoviral aetiology of the disease observed in peppers. Moreover, analysis of sequences obtained from PCR-amplified fragments indicated high pairwise nucleotide identity (>99%) with *Pepper yellow vein mali virus* (PepYVMV). No other begomovirus species had pairwise nucleotide identity exceeding 85%. Nucleotide identity not less than 89% has been advocated

Plant Pathol. J., 7 (2): 155-161, 2008

as the threshold for demarcating begomovirus species (Fauquet *et al.*, 2003). Therefore, begomoviruses identified in diseased pepper leaf samples belong to the PepYVMV species (Vadivukarasi *et al.*, 2007).

Altogether, the results obtained in this study indicated that leaf curling symptoms observed in sweet and hot pepper in Burkina Faso were caused by PepYVMV. However, Zhou *et al.* (2008) recently proposed the name tomato yellow leaf crumple virus (ToYLCrV) instead of PepYVMV because of marked discrepancies in symptoms caused by the virus in pepper and tomato. They reported that first symptoms induced by the virus were upcurled leaves and yellow vein symptoms in pepper. But, subsequently, surveys in a few West African country including Burkina Faso, Benin, Ghana, Niger, Senegal and Togo indicated that the virus was mostly associated with yellow leaf crumple symptoms in tomato. In the present study, the virus incidence in tomato was not assessed. However, high incidences observed in pepper fields indicated that the virus is widely spread in pepper.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to the following institutions for providing laboratory facilities for this work: CRSBAN/UFR-SVT (University of Ouagadougou) and INERA (CNRST, Burkina Faso). This study is part of F. Tiendrebeogo's Ph.D project supervised by Dr. O. Traoré (INERA) and Prof. A.S. Traoré (University of Ouagadougou).

REFERENCES

- Brown, J.K., A.M. Idris, I. Torres-Jerez, G.K. Banks and S.D. Wyatt, 2001. The core region of the coat gene is highly useful for the establishing the provisional identification and classification of begomoviruses. *Arch. Virol.*, 146: 1581-1598.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.*, 19: 11-15.
- Fargette, D., J.C. Thouvenel and C. Fauquet, 1987. Virus content of cassava infected by *African cassava mosaic virus*. *Ann. Applied Biol.*, 110: 65-73.
- Fargette, D., A. Pinel, Z. Abubakar, O. Traore, C. Brugidou, F. Sorho, E. Hebrard, M. Choisy, Y. Sere, C. Fauquet and G. Konaté, 2004. Inferring the evolutionary history of *Rice yellow mottle virus* from genomic, phylogenetic and phylogeographic studies. *J. Virol.*, 78 (7): 3252-3261.
- Fauquet, C.M., D.M. Bisaro, R.W. Briddon, J.K. Brown, B.D. Harrison, E.P. Ribicki, D.C. Stenger and J. Stanley, 2003. Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family Geminiviridae and an updated list of begomovirus species. *Arch. Virol.*, 148: 405-421.
- Harrison, B.D. and D.J. Robinson, 1999. Natural genomic and antigenic variation in whitefly-transmitted Geminiviruses (Begomoviruses). *Annu. Rev. Phytopathol.*, 37: 369-398.
- Jones, D.R., 2003. Plant viruses transmitted by whiteflies. *Eur. J. Plant Pathol.*, 109: 195-219.
- Konate, G., N. Barro, D. Fargette, M.M. Swanson and B.D. Harrison, 1995. Occurrence of whitefly-transmitted Geminiviruses in crops in Burkina Faso and their serological detection and differentiation. *Ann. Applied Biol.*, 126: 121-129.
- Konate, G. and O. Traore, 1999. Characterization and distribution of *Pepper vein mottle virus* in West Africa. *Cahiers Agric.*, 8: 129-131.
- Lazarowitz, S.G., 1992. Geminiviruses: Genome structure and gene function. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 11: 327-349.
- Liu, S., R.W. Briddon, I.D. Bedford, M.S. Pinner and P.G. Markham, 1998. Identification of Genes Directly and Indirectly Involved in the Insect Transmission of *African cassava mosaic geminivirus* by Bemisia Tabaci. *Virus Genes*, 18 (1): 5-11.
- Mansoor, S., R.W. Briddon, Y. Zafar and J. Stanley, 2003. Geminivirus disease complexes: An emerging threat. *Trends Plant Sci.*, 8 (3): 128-134.
- Navot, N., E. Pihersky, M. Zeidan, D. Amir and H. Czosneck, 1991. *Tomato yellow leaf curl virus*; a whitefly-transmitted geminivirus with a single genomic component. *Virology*, 185: 151-161.
- Otoidobiga, L.C., C. Vincent and R.K. Stewart, 2003. Susceptibility of field populations of adult *Bemisia tabaci* Gemadius (Homoptera: Aleyrodidae) and *Eretmocerus* sp. (Hymenoptera: Aphelinidae) to cotton insecticides in Burkina Faso (West Africa). *Pest Manage. Sci.*, 59 (1): 97-106.
- Paximadis, M., A.M. Idris, I. Torres-Jerez, A. Villarreal, M.E.C. Rey and J.K. Brown, 1999. Characterization of tobacco geminiviruses in the Old and New World. *Arch. Virol.*, 144: 703-717.
- Saunders, K., I.D. Bedford, R.W. Briddon, P.G. Markham, S.M. Wong and J. Stanley, 2000. A novel virus complex causes *Ageratum* yellow vein disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 97 (12): 6890-6895.
- Seal, S.E., F. VandenBosch and M.J. Jeger, 2006. Factors influencing Begomovirus evolution and their increasing global significance: Implications for sustainable control. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 23: 23-46.

Plant Pathol. J., 7 (2): 155-161, 2008

- Stanley, J., D.M. Bisaro, R.W. Briddon, J.K. Brown, C.M. Fauquet, B.D. Harrison, E.P. Rybicki and D.C. Stenger, 2005. *Geminiviridae*. In: *Virus Taxonomy*, 8th Report of the ICTV, Fauquet, C.M., M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger and L.A. Ball (Eds.). Elsevier/Academic Press, London, pp: 301-326.
- Swofford, D.L., 2000. PAUP*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Version 4.0b4a Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Thompson, J., D. Higgins and T. Gibson, 1994. CLUSTAL W. Improving the sensitivity of the progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.*, 22 (22): 4673-4680.
- Thresh, J.M., G.W. Otim-Nape, M. Thankappan and V. Muniyappa, 1998. The mosaic diseases of cassava in Africa and India caused by whitefly-borne geminiviruses. *Rev. Plant Pathol.*, 77: 935-945.
- Vadivukarasi, T., K.R. Girish and R. Usha, 2007. Sequence and recombination analyses of the Geminivirus replication initiator protein. *J. Biosci.*, 32 (1): 17-29.
- Wang, X., Y. Xie and X. Zhou, 2004. Molecular characterization of two distinct begomoviruses from papaya in China. *Virus Genes*, 29 (3): 303-309.
- Wyatt, S.D. and J.K. Brown, 1996. Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 86: 1288-1293.
- Zhou, X., Y. Liu, L. Calvert, C. Munoz, G.W. Otim-Nape, D.J. Robinson and B.D. Harrison, 1997. Evidence that DNA-A of a Geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. *J. Gen. Virol.*, 78: 2101-2111.
- Zhou, Y.C., M. Noussourou, T. Kon, M.R. Rojas, H. Jiang, L.F. Chen, K. Gamby, R. Foster and R.L. Gilbertson, 2008. Evidence of local evolution of tomato-infecting begomovirus species in West Africa: Characterization of *Tomato leaf curl Mali virus* and *Tomato yellow leaf crumple virus* from Mali. *Arch. Virol.* (Published online; DOI 10.1007/s00705-008-0042-9).

161

3. Article 3: Complete genomic sequences of *Tomato yellow leaf crumple virus* isolates associated to pepper yellow vein disease in Burkina Faso (soumis à *Archives of virology*).

Complete genomic sequences of *Tomato yellow leaf crumple virus* isolates associated to pepper yellow vein disease in Burkina Faso

Fidèle Tiendrébéogo^{1,2}, Pierre Lefeuvre², Murielle Hoareau², V.S. Edgar Traoré³, Nicolas Barro¹,
Frédéric Péréfarres², Bernard Reynaud², Alfred S. Traoré¹, Gnissa Konaté³, Jean-Michel Lett² &
Oumar Traoré^{3*}

¹*Laboratoire de Biochimie & Biologie Moléculaire, CRSBAN/UFR/SVT, Université de
Ouagadougou 03 BP 7021 Ouagadougou 03, Burkina Faso*

²*CIRAD, UMR 53 PVBMT CIRAD-Université de la Réunion, Pôle de Protection des Plantes,
7 Chemin de l'IRAT, 97410 Saint Pierre, La Réunion, France*

³*Institut de l'Environnement et de Recherches Agricoles (INERA)
01 BP 476 Ouagadougou 01, Burkina Faso*

***Corresponding author:** Dr Oumar Traoré

Laboratoire de Virologie et de Biotechnologies Végétales INERA/CNRST

01 BP 476 Ouagadougou 01,

Burkina Faso

Tél: +226 50319208 Fax: +226 50340271

E-mail: kourouda@gmail.com

Alternate E-mail: ohmar@hotmail.com

Introduction

The whitefly *Bemisia tabaci* transmitted begomoviruses (family: *Geminiviridae*) cause serious diseases in several economically important crops [8]. Begomoviruses have monopartite or bipartite genomes and infect dicotyledonous plants. With the exception of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) introduced inadvertently into the New World, all monopartite begomoviruses have been described in Africa, Asia and the Australian subcontinent and DNA β satellites have occasionally been found associated with them [1]. Common symptoms induced by begomoviruses include leaf-curling, mosaic, vein yellowing, often accompanied by stunting of infected plants and therefore severe yield losses.

In Burkina Faso, peppers are widely used as condiments and are a major source of income for many small-scale farmers, but they are susceptible to yellow vein disease occurring in West Africa [17, 19]. These symptoms resemble those induced by begomovirus infections and were clearly distincts from mosaic symptoms already reported to be caused by the *Pepper veinal mottle virus* in the country [10]. Recently, in order to establish the disease aetiology, a new monopartite begomovirus species, *Tomato yellow leaf crumple virus* (ToYLCrV) has been shown to be associated to yellow vein disease on pepper even if its role on the disease is still unclear [19].

Nevertheless, despite the importance of yellow vein disease in Burkina Faso and several West African countries [17, 19], very few studies have so far characterized the complete genomes of ToYLCrV isolates. Such data helped unravel the emergence of new virus strains, particularly within the Begomovirus genus [11, 18].

Virus material

During the years 2005 to 2009, pepper fields were surveyed around Ouagadougou, Bazéga, Pô and Banfora few main areas of Burkina Faso where vegetables are cultivated. Twenty-five leaf samples presenting with the most obvious symptoms were randomly collected from sweet pepper (*Capsicum annuum*) and hot pepper (*Capsicum frutescens*) and preserved by dehydration. Total DNAs of samples were extracted using DNeasy Plant Minikit (Qiagen). Samples were then tested for the presence of begomoviruses using polymerase chain reaction (PCR)-based assay employing degenerate primer set (VD360-CD1266). This primer pair was designed to amplify about 904 nucleotides of the coat protein (CP) gene of the DNA-A component of begomoviruses [3]. PCR products of the expected size were obtained with fourteen samples. No PCR products were obtained with primers designed to amplify DNA beta satellite sequences [2]. Full-length viral genomes were amplified from the PCR-positive samples by rolling circle amplification (RCA) using the kit

TempliPhi™, GE Healthcare [8]. After digestion with the restriction enzyme *Bam*HI, monomeric genomes about 2.8 Kb were ligated into pGEM-3Zf+ (Promega Biotech), and one clone per sample was sequenced by primer walking (Macrogen, South Korea). Ten full-length DNA-A were successfully obtained. More than 98% nucleotide identity was found between the ten isolates. The highest nucleotide identity (98%; BLASTn, NCBI) was obtained with Tomato yellow leaf crumple virus (ToYLCrV, AY502935).

To determine the infectivity of the clones, one isolate (Accession number FM876848) was generated in the binary vector pCAMBIA0380 (Cambia). An ~0.969 kb *Bam*HI-*Nco*I digested fragment containing the intergenic region (IR) was cloned to generate a 0.34 mer (pCAMBIA0380-0.34). The full-length monomer was cloned into *Bam*HI-digested pCAMBIA0380-0.34 to generate a 1.34 mer. Recombinant plasmids were mobilized from *Escherichia coli* JM-109 cells (Promega) into *Agrobacterium tumefaciens* (strain C58) by triparental mating using *Escherichia coli* HMB101 containing the plasmid helper pRK 2013 [4]. Host range determination was performed using the agroinoculation system with tomato (cv. Farmer), pepper (cvs. JBF, RBF, Cayenne Long, Yollo Wonder) and *Nicotiana benthamiana*. Ten day old seedlings were agro-inoculated with the *Agrobacterium* cell using a needle [12], and symptoms of infection were evaluated 30 days post-inoculation. *Nicotiana benthamiana* seedlings were severely affected and developed upcurling, swelling and yellowing in leaves. Tomato seedlings inoculated also developed severe symptoms of leaf curling, yellowing, and severe stunting. Pepper plants agro-inoculated did not develop symptoms. All the agro-inoculated plants were tested for the presence of viral DNA. ToYLCrV was detected in top leaves of 34/34 *Nicotiana benthamiana*, 9/34 tomato, 2/34 pepper cv. Yollo Wonder, 5/21 pepper cv. JBF, 5/34 pepper cv. RBF and 5/34 pepper cv. Cayenne Long (**Table 1**). The lack of symptoms on peppers (cvs. JBF, RBF and Yollo Wonder) confirmed that the yellow vein disease did not relate to the nature of peppers widely grown in Burkina Faso. The role of ToYLCrV in yellow vein disease of pepper remain less clear despite the inclusion of the peppers widely grown in West Africa in the determination of host range of the virus as suggest by Zhou et al [19].

Genome properties and phylogeny

The ten full-length DNA-A components were 2779 nt long for four of them, three others had 2786 nt and the last three had repectively 2785 nt, 2787 nt and 2778 nt. Nucleotide sequence analyses showed that the genome organization of the ten DNA-A components was typical of that of Old World monopartite begomoviruses. Therefore, six open reading frames (ORFs) were distinguished and corresponded to the V1 and V2 genes on the viral strand and C1, C2, C3 and C4

genes on the complementary strand [14]. The intergenic region (IR) sequences enclosed between nt 304 and nt 312 contained the inverted repeat (underlined) capable of forming a stem-loop structure (5'- GCGGCCATCCDTATAATATTACCGGATCCGC - 3') which include the conserved nonanucleotide (5'TAATATT↓AC3') present at almost all geminivirus virion strand replication origins (arrow). Five sequences (accessions numbers FM876848, FM876850, FM876851, FM876852 and FN555171) showed the same deletion of seven nucleotides in the IR between the nonanucleotide and the replication-associated protein gene (C1) start codon.

For phylogenetic analyses, the ten complete genome sequences reported here were aligned with the only publicly available complete genome sequence of ToYLCrV from Africa, a Chinese isolate of ToYLCrV and several African monopartite and bipartite begomoviruses, using the ClustalW alignment tool [16] implemented in MEGA4 [15]. Similarities between sequences were calculated in MEGA 4 with pairwise deletion of gaps. The optimal model of sequence evolution (GTR+I+G₄), defined with ModelTest [13], was used for maximum likelihood (ML) phylogenetic reconstruction with PHYML [7]. The degree of support for individual branches within the resulting phylogenetic tree was assessed with 1000 full ML bootstrap iterations (**Figure 1**). The tree was visualized using FigTree v1.1.1 software.

Pairwise sequence analysis indicated that the ten new ToYLCrV genomes from Burkina Faso had 96 to 99.9% identity amongst themselves and shared between 95.9 to 98.6% highest similarity with Tomato yellow leaf crumple virus-[Mali:2003] (ToYLCrV-[ML:03]; AY502935), and 92.3 to 96% with Tomato yellow leaf crumple virus-[China:Fujian:2006] (ToYLCrV-[CN:Fuj:06]; AM691547) (**Table 3**). The ML consensus tree also confirmed the clustering with ToYLCrV isolates reported elsewhere and showed the close relatedness with *Tobacco leaf curl Zimbabwe virus* from Zimbabwe (TbLCZV-[ZW:01]) and *Tomato curly stunt virus* from South Africa (ToCSV-[ZA:Ond:02]) (**Figure 1**). In accordance with standard begomovirus classification criteria [6], we classified this group of isolates from Burkina Faso as belonging to ToYLCrV [19]. Accordingly, we named the ten isolates as ToYLCrV-[BF:Baz:SPe:07], ToYLCrV-[BF:Baz:HPe1:07], ToYLCrV-[BF:Oua:SPe1:08], ToYLCrV-[BF:Oua:HPe:08], ToYLCrV-[BF:Oua:SPe2:08], ToYLCrV-[BF:Baz:HPe2:08], ToYLCrV-[Ban:Hpe1:09], ToYLCrV-[Ban:Hpe2:09], ToYLCrV-[Ban:Hpe3:09] ToYLCrV-[Pô:Hpe:08] (**Table 2**). The high genetic diversity observed among some isolates of Burkina Faso and China (**Table 3**) suggests the occurrence of several ToYLCrV strains. Because of the presence of its V2 gene, ToYLCrV is distinct from the New World begomoviruses [5]. Yet, ToYLCrV and related viruses (**Figure 1**) naturally infect solanaceous plant species domesticated in the New World. Consequently, these viruses are possibly African indigenous begomoviruses that evolved to infect exotic plants such as pepper, tomato and tobacco. Thus,

indigenous host plant species should be identified in order to better understand the genetic diversity of African monopartite begomoviruses and to devise adequate control measures against ToYLCrV and its related viruses.

Acknowledgments

This study was supported by the following institutions: International Foundation for Science (IFS) fellowship N° C/4472-1 to F. Tiendrébéogo, AIRES-Sud: a programme from the French Ministry of Foreign and European Affairs implemented by the Institut de Recherche pour le Développement (IRD-DSF), CRSBAN/UFR-SVT (University of Ouagadougou), CIRAD, Conseil Régional de La Réunion, European Union (FEDER) and GIS Centre de recherche et de veille sanitaire sur les maladies émergentes dans l'Océan Indien (N°PRAO/AIRD/CRVOI/08/03). The technical assistance of Mr Martial Grondin is gratefully appreciated. FT completed this research as part of his PhD Degree.

References

1. Briddon RW, Brown JK, Moriones E, Stanley J, Zerbini M, Zhou X, Fauquet CM (2008) Recommendations for the classification and nomenclature of DNA- β satellites of begomoviruses. *Arch Virol* 153:763-781
2. Briddon RW, Bull SE, Mansoor S, Amin I, Markham PG (2002) Universal primers for the PCR-mediated amplification of DNA β ; a molecule associated with some monopartite begomoviruses. *Mol Biotechnol* 20:315-318
3. Delatte H, Martin DP, Naze F, Golbach RW, Reynaud B, Peterschmitt M, Lett JM (2005) South West Indian Ocean islands tomato begomovirus populations represent a new major monopartite begomovirus group. *J Gen Virol* 86:1533-1542
4. Ditta G, Stanfield S, Corbin D, Helsinki DR (1980) Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:7347-7351
5. Fauquet CM, Bisaro DM, Briddon RW, Brown JK, Harrison BD, Rybicki EP, Stenger DC, Stanley J (2003) Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family *Geminiviridae*, and an updated list of begomovirus species. *Arch Virol* 14:405-421
6. Fauquet CM, Briddon RW, Brown JK, Moriones E, Stanley J, Zerbini M, Zhou X (2008) Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Arch Virol* 153:783-821

7. Guindon S, Lethiec F, Duroux P, Gascuel O (2005) PHYML Online-a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Res* 33:557-559
8. Harrison BD, Robinson DJ (1999) Natural genomic and antigenic variation in whitefly-transmitted Geminiviruses (Begomoviruses). *Ann Rev Phytopathol* 37 :369-398
9. Inoue-Nagata AK, Albuquerque LC, Rocha WB, Nagata T (2004) A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage ϕ 29 DNA polymerase. *J Virol Methods* 116:209–211
10. Konaté G, Traoré O (1999) Characterization and distribution of Pepper veinal mottle virus in West Africa. *Cahiers Agric.* 8:129-131
11. Navas-Castillo J, SanchezCampos S, Noris E, Louro D, Accotto GP, Moriones E (2000) Natural recombination between Tomato yellow leaf curl virus-Is and Tomato leaf curl virus. *J Gen Virol* 81:2797-2801
12. Paximadis M, Rey MEC (2001) Genome organization of Tobacco leaf curl Zimbabwe virus, a new distinct monopartite begomovirus associated with subgenomic defective DNA molecules. *J Gen Virol* 82:3091–3097
13. Posada D (2006) ModelTest Server: a web-based tool for the statistical selection of models of nucleotide substitution online. *Nucleic Acids Res* 34: W700-3
14. Rojas MR, Hagen C, Lucas WJ, Gilbertson RL (2005) Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Annu Rev Phytopathol* 43:361–394.
15. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-9
16. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-80
17. Tiendrébéogo F, Traoré VSE, Barro N, Traoré AS, Konaté G, Traoré O (2008). Characterization of *Pepper yellow vein Mali virus* in *Capsicum* sp. in Burkina Faso. *Plant Pathol J* 7:155-161
18. Zhou X, Liu Y, Calvert L, Munoz C, Otim-Nape GW, Robinson DJ, Harrison BD (1997) Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. *J Gen Virol* 78:2101-2111
19. Zhou YC, Noussourou M, Kon T, Rojas MR, Jiang H, Chen LF, Gamby K, Foster R, Gilbertson R L (2008) Evidence of local evolution of tomato-infecting begomovirus species

in West Africa: characterization of tomato leaf curl Mali virus and tomato yellow leaf crumple virus from Mali. Arch Virol 153:693–706

Table 1: Infectivity of ToYLCrV associated to pepper yellow vein disease determined by agroinoculation

Plants	cultivars	Infectivity (% infected plants)	
Tomato	Farmer	9/34 ^a (26%)*	9/34 ^b (26%)
Pepper	Yollo Wonder	0/34 ^a (0%)	2/34 ^b (6%)
	JBF†	0/21 ^a (0%)	5/21 ^b (24%)
	RBF†	0/21 ^a (0%)	5/34 ^b (15%)
	Cayenne		
	Long	0/21 ^a (0%)	5/34 ^b (15%)
<i>Nicotiana benthamiana</i>		34/34 ^a (100%)*	34/34 ^b (100%)

Infectivity: Number of infected plants/number of inoculated plants, ^a Verified by visual observation of symptoms, ^b confirmed by PCR amplification of viral genomic fragment.

†: Local pepper cultivar

***: Severe symptoms

Table 2: Name, acronym and accession numbers of virus reported in this study

Virus name	Acronym	GenBank-EMBL-DDBJ Accession numbers
Tomato yellow leaf crumple virus-[Burkina Faso :Bazega:sweet pepper:2007]	ToYLCrV-[BF:Baz:SPe:07]	FM876847
Tomato yellow leaf crumple virus-[Burkina Faso :Bazega:hot pepper1:2007]	ToYLCrV-[BF:Baz:HPe1:07]	FM876848
Tomato yellow leaf crumple virus-[Burkina Faso :Ouagadougou:sweet pepper1:2008]	ToYLCrV-[BF:Oua:SPe1:08]	FM876849
Tomato yellow leaf crumple virus-[Burkina Faso:Ouagadougou:hot pepper:2008]	ToYLCrV-[BF:Oua:HPe:08]	FM876850
Tomato yellow leaf crumple virus-[Burkina Faso:Ouagadougou:sweet pepper2:2008]	ToYLCrV-[BF:Oua:SPe2:08]	FM876851
Tomato yellow leaf crumple virus-[Burkina Faso:Bazega:hot pepper2:2008]	ToYLCrV-[BF:Baz:HPe2:08]	FM876852
Tomato yellow leaf crumple virus-[Burkina Faso :Banfora:hot pepper1:2009]	ToYLCrV-[BF:Ban:Hpe1:09]	FN555172
Tomato yellow leaf crumple virus-[Burkina Faso:Banfora:hot pepper2:2009]	ToYLCrV-[BF:Ban:Hpe2:09]	FN555173
Tomato yellow leaf crumple virus-[Burkina Faso:Banfora:hot pepper3:2009]	ToYLCrV-[BF:Ban:Hpe3:09]	FN555174
Tomato yellow leaf crumple virus-[Burkina Faso:Pô:hot pepper:2008]	ToYLCrV-[BF:Pô:Hpe:08]	FN555171

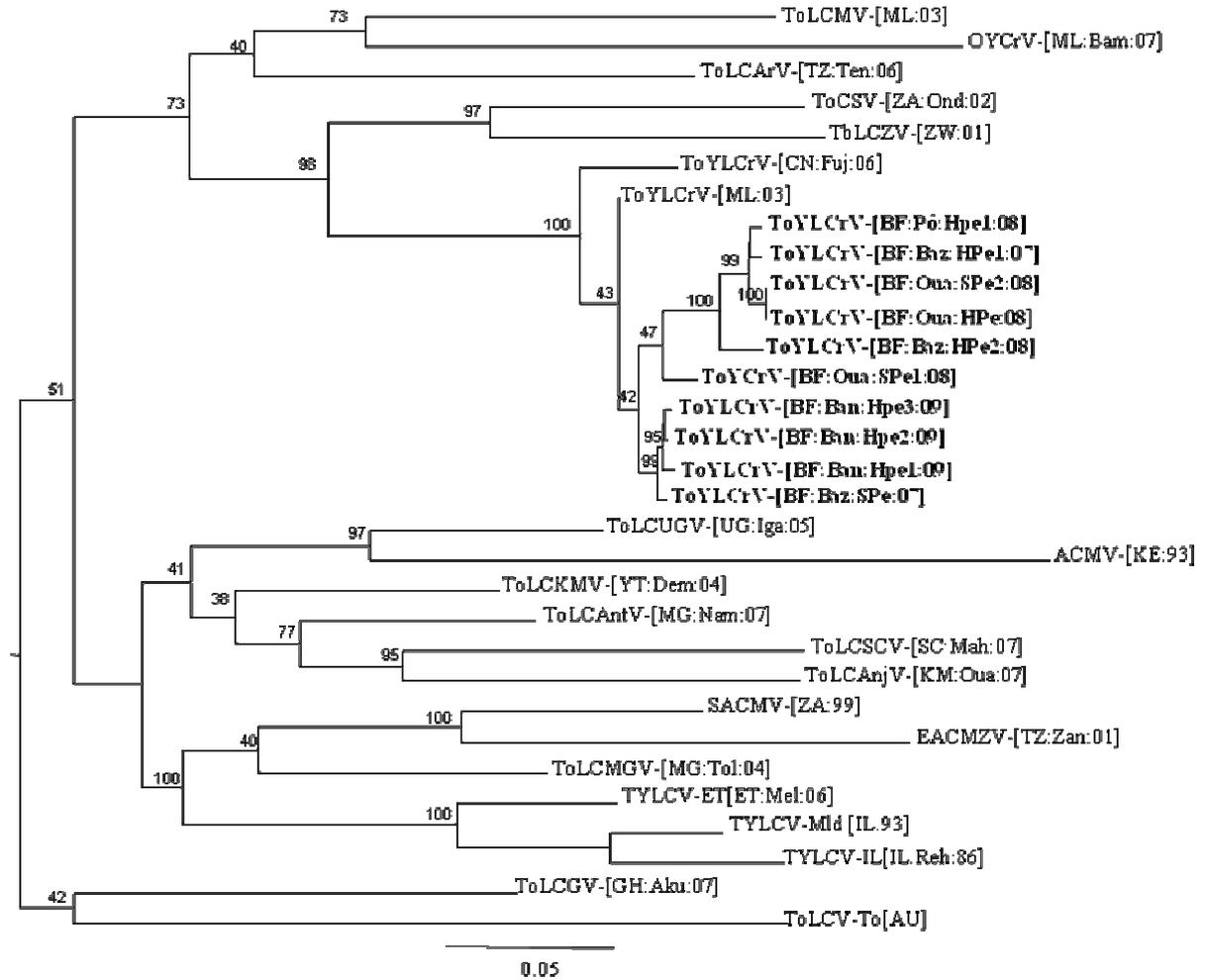


Figure 1: Maximum likelihood tree showing the relationships between the complete genomes of Burkina Faso isolates of Tomato yellow leaf crumple virus (ToYLCrV) reported in this study (in bold) and those of other representative begomoviruses sequences: *Tomato leaf curl virus Ghana virus*-[Ghana:Akumadan:2007] (ToLCGV-[GH:Aku:07]; EU350585), *Tomato leaf curl Mali virus*-[Mali:2003] (ToLCMV-[ML:03]; AY502938), *Okra yellow crinkle virus*-[Mali:Bamako:2007] (OYCrV-[ML:Bam:07]; EU024118), *Tomato leaf curl Arusha virus*-[Tanzania:Tengeru:2006] (ToLCArV-[TZ:Ten:06]; DQ519575), *Tomato curly stunt virus*-[South Africa:Ondenberg:2002] (ToCSV-[ZA:Ond:02]; AF261885), *Tobacco leaf curl Zimbabwe virus*-[Zimbabwe:2001] (TbLCZV-[ZW:01]; AF350330), *Tomato yellow leaf crumple virus*-[China:Fujian:2006] (ToYLCrV-[CH:Fuj:06]; AM691547), *Tomato yellow leaf crumple virus*-[Mali:2003] (ToYLCrV-[ML:03]; AY502935), *Tomato leaf curl Madagascar virus*-[Madagascar:Toliary:2004] (ToLCMGV-[MG:Tol:04]; AJ865339), *South African cassava mosaic virus*-[South Africa:1999] (SACMV-[ZA:99]; AF155806), *East African cassava mosaic Zanzibar virus*-[Tanzania:Zanzibar:2001] (EACMZV-[TZ:Zan:01]; AF422174), *Tomato leaf curl Uganda virus*-

[Uganda:Iganga:2005] (ToLCUGV-[UG:Iga:05]; DQ127170), *African cassava mosaic virus*-[Kenya:1993] (ACMV-[KE:93]; J02057), *Tomato leaf curl Comoros virus*-[Mayotte:Dembeni:2004], (ToLCKMV-[YT:Dem:04]; AJ865341), *Tomato leaf curl Antsiranana virus*-[Madagascar:Namakely:2007] (ToLCAntV-[MG:Nam:07]; AM701764), *Tomato leaf curl Seychelles virus*-[Seychelles:Mahe:2007] (ToLCSCV-[SC:Mah:07]; AM491778), *Tomato leaf curl Anjouan virus*-[Comoros:Ouani:2007] (ToLCAnjV-[KM:Oua:07]; AM701758), *Tomato yellow leaf curl virus*-Ethiopia [Ethiopia:Melkassa:2006] (TYLCV-ET[ET:Mel:06]; DQ358913), *Tomato yellow leaf curl virus*-Mild [Israel:1993] (TYLCV-Mld[IL:93]; X76319), *Tomato yellow leaf curl virus*-Israel [Israel:Rehovot:1986] (TYLCV-IL[IL:Reh:86]; X15656), *Tomato leaf curl virus*-Tomato [Australia] (ToLCV-To[AU]; S53251).

Table 3: Matrix of pairwise identity percentages between the complete DNA-A nucleotide sequences of the six isolates of *Tomato yellow leaf crumple virus* from Burkina Faso (in bold) and some closely related begomoviruses. Percentages of identity over the 89% taxonomic threshold of begomovirus are presented in bold.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1 ToLCCV-[GHE:Alm:07]	100																				
2 ToLCSV-To[AU]	73,6	100																			
3 ACMV-[KIR:93]	73,5	70,3	100																		
4 BACMV-[TZ:Zam:01]	76,1	72,2	72,8	100																	
5 SACMV-[ZA:99]	77,9	73,5	73,9	82,3	100																
6 OYCV-[ML:Bar:07]	74,8	71,5	69,8	72,1	74,3	100															
7 ToYLCV-[BF:Bar:SPe:07]	78,8	73,0	73,7	78,1	78,8	77,0	100														
8 ToYLCV-[BF:Bar:HIp:07]	78,5	72,9	73,3	77,9	78,4	76,5	96,9	100													
9 ToYLCV-[BF:Omm:SPe:06]	78,5	72,9	73,4	77,8	78,7	76,9	97,5	96,2	100												
10 ToYLCV-[BF:Bar:HIp:08]	78,6	72,7	73,1	77,7	78,5	76,5	96,2	99,1	96,5	100											
11 ToYLCV-[BF:Omm:SPe:2:06]	78,5	72,8	73,1	77,6	78,4	76,4	96,2	99,1	96,5	99,9	100										
12 ToYLCV-[BF:Bar:HIp:2:06]	78,4	73,2	73,4	77,8	78,4	76,4	95,9	97,7	96,2	97,4	97,4	100									
13 ToYLCV-[BF:PE:HIp:1:08]	78,4	72,6	73,1	77,6	78,2	76,4	96,1	99,3	96,3	99,1	99,1	97,7	100								
14 ToYLCV-[BF:Bar:HIp:2:05]	78,7	72,8	73,5	78,1	78,7	76,9	99,3	95,9	97,8	96,2	96,2	95,9	96,1	100							
15 ToYLCV-[BF:Bar:HIp:1:07]	78,4	72,8	73,3	78,1	78,4	76,9	99,2	95,7	97,5	96,8	96,8	95,7	95,9	99,5	100						
16 ToYLCV-[BF:Bar:HIp:3:05]	78,5	72,7	73,5	78,1	78,7	76,9	99,3	96	97,7	96,2	96,2	95,9	96,1	99,6	99,4	100					
17 ToYLCV-[ML:03]	78,7	73,1	73,5	78,0	78,9	76,9	98,6	96,0	97,7	96,2	96,2	95,9	96,1	98,5	98,3	98,4	100				
18 ToYLCV-[CN:Huj:06]	77,7	72,9	72,7	76,7	77,3	75,6	94,7	92,4	93,9	92,5	92,5	92,3	92,5	94,6	94,4	94,4	96,0	100			
19 ToLCCMV-[MG:Tel:04]	80,2	75,0	75,8	78	82,6	75,2	80,0	79,7	79,7	79,7	79,6	79,9	79,6	79,9	79,7	79,9	80,0	77,9	100		
20 ToLCCV-[ZW:01]	76,3	73,0	71,3	74,6	75,1	76,9	83,0	83,0	83,0	83,1	83,0	83,1	83,0	82,9	82,9	83,1	82,9	82,2	75,8	100	
21 ToLCCV-[TZ:Tom:06]	76,8	74,0	72,4	75,8	78,2	75,5	79,3	79,5	79,5	79,5	79,5	79,5	79,3	79,2	79,2	79,2	79,1	78,7	80,2	77,5	100

**Le "Okra leaf curl disease" ou maladie de
l'enroulement des feuilles du gombo
(*Abelmoschus esculentus*)**

**Caractérisation moléculaire des *Begomovirus*
infectant le gombo (*Abelmoschus esculentus*)**

1. Introduction

Au Burkina Faso, la culture du gombo (*Abelmoschus esculentus*) s'effectue sur toute l'année. Ce légume constitue une source de revenu financier pour les femmes. Cependant, des symptômes de repliements foliaires sont fréquemment observés sur la plante au Burkina et dans plusieurs pays de l'Afrique de l'Ouest. Les plantes atteintes présentent un retard de croissance avec des feuilles repliées et un épaississement des nervures. Ces symptômes ont été associés au groupe des *Begomovirus* (Barro, 1994; Konaté *et al.*, 1995).

En vue de connaître les espèces virales responsables de cette maladie sur le gombo, des travaux de caractérisation moléculaire ont été entrepris sur des échantillons du Centre, Centre-Sud et Ouest du Burkina Faso. Le génome complet (ADN-A) du *Begomovirus* responsable ainsi que les ADN satellites (ADN-beta et ADN-1) ont été recherchés (Briddon *et al.*, 2002; Bull *et al.*, 2003 ; Delatte *et al.*, 2005), amplifiés, clonés et séquencés (Inoue-Nagata *et al.*, 2004). Au total, vingt-trois (23) séquences complètes d'ADN-A, sept (7) d'ADN- β et quatre (4) d'ADN-1 ont été obtenues avec succès. Après les analyses phylogénétiques (Thompson *et al.*, 1994 ; Guindon *et al.*, 2005 ; Posada, 2006; Tamura *et al.*, 2007), il ressort que toutes les séquences d'ADN-A sont les isolats d'un même virus (94,7 à 100% d'identité nucléotidique): le *Cotton leaf curl Gezira virus* (CLCuGV), le seuil de démarcation des espèces bégomovirales étant de 89%, (Fauquet *et al.*, 2008). Les isolats du Burkina Faso ont entre 89,3 et 98,8% d'identité nucléotidique avec des isolats de CLCuGV du Niger, du Soudan, de l'Egypte et du Cameroun.

Tous les ADN-Beta ont entre 94,6 et 100% d'identité nucléotidique entre eux et sont des isolats du *Cotton leaf curl Gezira betasatellite* (seuil de démarcation des espèces 78% d'identité nucléotidique, Briddon *et al.*, 2008). Chez les ADN-1, deux espèces ont été caractérisées, la première (FN554580) est un isolat du *Cotton leaf curl Gezira alphasatellite* et la seconde constitue une nouvelle espèce. En effet, les 3 séquences FN554581, FN554582 et FN554583 ont seulement entre 52,4 et 60,1% d'identité nucléotidique avec les alphasatellites connus. Le seuil de démarcation des espèces chez les alphasatellites étant de 83% (Mubin *et al.*, 2009), ces trois séquences constituent donc les isolats d'une même espèce.

L'appellation Okra leaf curl Burkina Faso alphasatellite (OLCBFA) a été proposée pour cette nouvelle espèce.

Aussi, une analyse de recombinaison incluant les 23 séquences d'ADN-A du Burkina Faso et 121 séquences (ADN-A) représentatives de la diversité des *Begomovirus* africains a été conduite en utilisant le logiciel RDP3 (Martin *et al.*, 2005). Trois évènements de recombinaison (a, b, c) ont été détectés dont la plus importante est l'évènement b. Cet évènement intervient entre le HoLCrV-[EG:Cai:97] et le ToLCDiaV-[MG:Nam5:01] au niveau du gène C1 ou Rep. Cet évènement majeur entre un *Begomovirus* (HoLCrV-[EG:Cai:97]) infectant une *Malvaceae* sauvage (*Althea rosea*) décrite dans le Nord-Est de l'Afrique et un *Begomovirus* de la tomate (ToLCDiaV-[MG:Nam5:01]) décrit à Madagascar suggère qu'ils ont un ancêtre commun et que les réservoirs naturels sont impliqués dans l'évolution et l'épidémiologie des *Begomovirus* en Afrique. Les résultats ont été soumis pour publication.

2. Article 4: Molecular diversity of *Cotton leaf curl Gezira virus* isolates and their satellite DNAs associated with okra leaf curl disease in Burkina Faso (*Virology Journal in press*)

This Provisional PDF corresponds to the article as it appeared upon acceptance. Fully formatted PDF and full text (HTML) versions will be made available soon.

Molecular diversity of Cotton leaf curl Gezira virus isolates and their satellite DNAs associated with okra leaf curl disease in Burkina Faso

Virology Journal 2010, **7**:48 doi:10.1186/1743-422X-7-48

Fidele Tiendrebeogo (fidelet@gmail.com)
Pierre Lefeuvre (pierre.lefeuvre@gmail.com)
Murielle Hoareau (murielle.hoareau@cirad.fr)
Julie Villemot (julie.villemot@cirad.fr)
Gnissa Konate (gnataramen@yahoo.fr)
Alfred S Traore (astraore@univ-ouaga.bf)
Nicolas Barro (nicolas_barro@univ-ouaga.bf)
Valentin S Traore (traorevalentin@yahoo.fr)
Bernard Reynaud (bernard.reynaud@cirad.fr)
Oumar Traore (ohmar@hotmail.com)
Jean-Michel Lett (lett@cirad.fr)

ISSN 1743-422X

Article type Short report

Submission date 20 November 2009

Acceptance date 23 February 2010

Publication date 23 February 2010

Article URL <http://www.virologyj.com/content/7/1/48>

This peer-reviewed article was published immediately upon acceptance. It can be downloaded, printed and distributed freely for any purposes (see copyright notice below).

Articles in *Virology Journal* are listed in PubMed and archived at PubMed Central.

For information about publishing your research in *Virology Journal* or any BioMed Central journal, go to

<http://www.virologyj.com/info/instructions/>

For information about other BioMed Central publications go to

© 2010 Tiendrebeogo et al. licensee BioMed Central Ltd.
This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Molecular diversity of *Cotton leaf curl Gezira virus* isolates and their satellite DNAs associated with okra leaf curl disease in Burkina Faso

Fidèle Tiendrébéogo^{1,2*}, Pierre Lefeuvre², Murielle Hoareau², Julie Villemot², Gnissa Konaté³, Alfred S. Traoré¹, Nicolas Barro¹, Valentin S. Traoré³, Bernard Reynaud², Oumar Traoré³ & Jean-Michel Lett^{2*}

¹Laboratoire de Biochimie & Biologie Moléculaire, CRSBAN/UFR/SVT, Université de Ouagadougou 03 BP 7021 Ouagadougou 03, Burkina Faso

²CIRAD, UMR 53 PVBMT CIRAD-Université de la Réunion, Pôle de Protection des Plantes, 7 Chemin de l'IRAT, 97410 Saint Pierre, La Réunion, France

³Institut de l'Environnement et de Recherches Agricoles (INERA) 01 BP 476 Ouagadougou 01, Burkina Faso

*Corresponding authors: Dr Jean-Michel LETT (lett@cirad.fr) and Fidèle Tiendrébéogo (fidelet@gmail.com)

Email addresses:

PL: pierre.lefeuvre@cirad.fr

MH: murielle.hoareau@cirad.fr

JV: julie.villemot@cirad.fr

GK: konategnissa@yahoo.fr

AST: astraore@univ-ouaga.bf

NB: nicolas_barro@univ-ouaga.bf

VSET: traorevalentin@yahoo.fr

BR: bernard.reynaud@cirad.fr

OT: ohmar@hotmail.com

Abstract

Okra leaf curl disease (OLCD) is a major constraint on okra (*Abelmoschus esculentus*) production and is widespread in Africa. Using a large number of samples representative of the major growing regions in Burkina Faso (BF), we show that the disease is associated with a monopartite begomovirus and satellite DNA complexes. Twenty-three complete genomic sequences of *Cotton leaf curl Gezira virus* (CLCuGV) isolates associated with OLCD, sharing 95 to 99% nucleotide identity, were cloned and sequenced. Six betasatellite and four alphasatellite (DNA-1) molecules were also characterized. The six isolates of betasatellite associated with CLCuGV isolates correspond to *Cotton leaf curl Gezira betasatellite* (CLCuGB) (88 to 98% nucleotide identity). One isolate of alphasatellite is a variant of Cotton leaf curl Gezira alphasatellite (CLCuGA) (89% nucleotide identity), whereas the three others isolates appear to correspond to a new species of alphasatellite (CLCuGA most similar sequence present 52 to 60% nucleotide identity), provisionally named Okra leaf curl Burkina Faso alphasatellite (OLCBFA). Recombination analysis of the viruses demonstrated the interspecies recombinant origin of all CLCuGV isolates, with parents being close to *Hollyhock leaf crumple virus* (AY036009) and *Tomato leaf curl Diana virus* (AM701765). Combined with the presence of satellites DNA, these results highlight the complexity of begomoviruses associated with OLCD.

Findings

Okra leaf curl disease (OLCD) is commonly observed among okra (*Abelmoschus esculentus*) crops in Burkina Faso (BF) and several African countries [1,2,3,4,5]. Affected plants are severely stunted with apical leaf curl (upward or downward), distortion and thickening of the veins. In BF, okra is widely grown in both rainy and dry seasons. It is a major source of income particularly for small-scale farming. Viral diseases are important constraints in the

production of this crop [6]. Recently, it was shown that OLCB in Africa is associated with a complex of begomoviruses: *Cotton leaf curl Gezira virus* (CLCuGV; [7,4,5]), *Okra yellow crinkle virus* (OYCrV; [8]) and *Hollyhock leaf crumple virus* (HoLCrV; [9,10]).

Viruses of the genus *Begomovirus* belong to the family *Geminiviridae* and are transmitted by the whitefly vector *Bemisia tabaci* to dicotyledonous plants [11]. They have emerged as a major constraint for many vegetable and fibre crops throughout the world [12]. Begomoviruses are either bipartite with two genomic components, designated as DNA-A and DNA-B or monopartite with only DNA-A like components [13]. Some of the monopartite begomoviruses are also associated with additional circular ssDNA molecules, such as betasatellite or alphasatellite (previously known as DNA-1) that are nearly half the size of DNA-A. Betasatellites have been involved in pathogenicity but alphasatellites have no known function and are certainly not involved in symptom induction [14,15,16]. Alphasatellites have only been shown to be present in plants infected with monopartite begomoviruses in association with betasatellites [17].

The aim of our study was to characterize at the molecular level the complex of viruses involved in OLCB in BF and their relationship with other begomoviruses. In association with a single Old World begomovirus, we describe their associated satellite DNAs.

During May 2008 to April 2009, 74 leaf samples exhibiting typical OLCB symptoms were collected from okra fields in the major growing regions of BF around Tiébélé, Kampa, Pô, Kamboinsé, Bazèga and Bama (Kou valley) localities. Total DNA was extracted using DNeasy® Plant Minikit (Qiagen) before detection of begomoviruses using polymerase chain reaction (PCR) with specific primers of either the DNA-A [18] or betasatellite and alphasatellite [19,20]. Full-length viral genomes were amplified from the PCR-positive samples by rolling-circle amplification (RCA) [21]. The amplified DNAs were digested with

endonucleases *Bam*HI or *Pst*I, and the DNA fragments of the expected size (~2.8 kb for DNA-A and ~1.4 kb for satellites) were cloned into pGEM[®]-3Zf (+) vector (Promega Biotech). Cloned genome components were sequenced by Macrogen Inc. (South Korea). Contigs were assembled with the DNAMAN software (Lynnon, Quebec, Canada) and subsequently aligned using the ClustalW tool [22] implemented in MEGA 4 [23]. Sequence comparisons were performed in MEGA 4 with pairwise deletion of gaps. The optimal model of sequence evolution, defined with ModelTest [24], was used for maximum likelihood (ML) phylogenetic reconstruction using PHYML_v2.4.4 [25]. The degree of support for individual branches within the resulting phylogenetic trees was assessed with 1000 full ML bootstrap iterations. The trees were visualized using FigTree v1.1.1 software.

Recombination was analyzed using our sequences and a set of sequences representing the whole African begomovirus diversity (representing an alignment of 121 sequences). Detection of potential recombinant sequences, identification of likely parental sequences, and localization of possible recombination breakpoints was carried out using RDP [26], GENECONV [27], BOOTSCAN [28], MAXIMUM CHI SQUARE [29], CHIMAERA [28], SISTER SCAN [30] and 3Seq [31] recombination detection methods as implemented in RDP3 [32]. The analysis was performed with default settings for the different detection methods and a Bonferroni corrected *P*-value cut-off of 0.05. Only events detected with 3 methods or more were accepted.

Despite a very poor preservation of samples (high necrosis), 48 samples of the 74 were detected as being infected with begomovirus using PCR amplifications with the universal primer pair VD360-CD1266 recovering the conserved CP ORF [18]. From the positive samples, 23 begomovirus genome sequences with length between 2761 to 2773 nucleotides (nt) were successfully obtained using RCA. Pairwise sequence comparison demonstrated that

the 23 new genome sequences of monopartite begomoviruses from BF are genetically related to the same strain (94.7 to 100% identity amongst themselves). A BLAST search identify the most similar virus sequences as being *Cotton leaf curl Gezira virus* (CLCuGV) isolates, a monopartite *Begomovirus* first identified in Sudan [33]. Further pairwise sequence analyses showed that the 23 sequences shared between 94.8 to 98.8% nt identity with CLCuGV isolates from Niger (FJ469626, EU432373, EU432374), 93.7 to 96.2% with CLCuGV from Sudan (AY036007, AY036008), 92.4 to 96.1% with CLCuGV from Egypt (AY036006, AY036010) and 89.3 to 91.4% with CLCuGV from Cameroon (FM164726). According to the ICTV guidelines, these results of nucleotide identity <93% between isolates of CLCuGV suggest the existence of several strains within this begomovirus species. Similar comparisons performed with the other two *Begomovirus* species infecting *Malvaceae* in Africa showed low nucleotide sequence identity: 71.7 to 72.6% obtained with *Okra yellow crinkle virus* (DQ902715, EU024118, FM164724) and 83.4 to 84.2 with *Hollyhock leaf crumple virus* (AY036009, AF014881).

All 23 isolates of begomovirus infecting okra in BF have the typical genome organization of Old World monopartite begomoviruses. This organization consisted of the presence of six open reading frames (ORFs) on the DNA-A corresponding to V1 and V2 on the virion strand and C1, C2, C3 and C4 on the complementary strand [34]. The IR sequences located between the start codons of the C1 and V2 are 289 to 300 nt. In this region, they present a typical replication origin (↓), including an inverted repeat sequence containing the highly conserved nanonucleotide sequence TAATATT↓AC [35,5].

Based on the presently applicable species demarcation threshold of 89% for begomoviruses [36], we conclude that the 23 begomovirus isolates isolated from okra in BF belong to the species *Cotton leaf curl Gezira virus* and the Niger strain (See **Table 1** for percentage of

similarities and **Table 2** for isolates description and accession numbers). In addition, a maximum-likelihood phylogenetic tree constructed using PHYML and the GTR+I+G model of sequence evolution (ModelTest), confirms that okra begomoviruses reported here cluster with the isolates of *Cotton leaf curl Gezira virus* (CLCuGV) (**Figure 1**). A clear phylogeographic separation is observed between the diversity of CLCuGV isolates of okra: West Africa (Niger strain), Central Africa (Cameroon strain), East Africa (Sudan strain) and north-east of the Africa (Egypt strain).

Betasatellites were found associated to all isolates from BF except CLCuGV-NE[BF:Baz:Ok:09] and CLCuGV-NE[BF:Bam:Ok:09] while alphasatellites were detected only in association with the seven following isolates: CLCuGV-NE[BF:Kap:Ok7:08], CLCuGV-NE[BF:Pô:Ok1:08], CLCuGV-NE[BF:Pô:Ok2:08], CLCuGV-NE[BF:Pô:Ok4:08], CLCuGV-NE[BF:Pô:Ok5:08], CLCuGV-NE[BF:Pô:Ok6:08] and CLCuGV-NE[BF:Pô:Ok7:08]. Betasatellites associated with CLCuGV-NE[BF:Tie:Ok2:08], CLCuGV-NE[BF:Kap:Ok1:08], CLCuGV-NE[BF:Kap:Ok3:08], CLCuGV-NE[BF:Kap:Ok5:08], CLCuGV-NE[BF:Kap:Ok6:08] and CLCuGV-NE[BF:Pô:Ok6:08] consisted of 1348, 1347, 1349, 1348, 1347 and 1347 nucleotides, respectively. All betasatellites showed typical features consisting of the presence of a single ORF β C1 in the complementary-sense, a region of sequence rich in adenine (A) (nt 703-892 with 58.4 to 58.7% A residues) and a satellite conserved region (SCR) with a predicted stem-loop structure containing the geminivirus nonanucleotide sequence (TAATATTAC) [37]. The nucleotide sequence comparison showed that our sequences had nucleotide identities ranging from 88.1 to 98.7% with betasatellites from Cameroon, Egypt, Mali, Niger and Sudan. In a phylogenetic analysis based upon alignments of the complete betasatellites sequences, the BF betasatellite sequences segregated with betasatellites associated with okra begomoviruses from Africa (**Figure 2**). Based on the recently established species demarcation threshold for betasatellites (78% nucleotide

sequence identity; [38]), the betasatellites reported in this study belong to the same species *Cotton leaf curl Gezira betasatellite* (see **Table 3** for betasatellites isolates description and accession numbers). Interestingly and under our knowledge, this species represent the only known betasatellite described in Africa on malvaceous and tomato plants. Associated to the absence of betasatellites in the New World and the existence of a high diversity of betasatellites in Asia, this result confirms that the centre of diversity appears to be in southern Asia [39].

The complete nucleotide sequences of alphasatellites associated with CLCuGV-NE[BF:Kap:Ok7:08], CLCuGV-NE[BF:Pô:Ok1:08], CLCuGV-NE[BF:Pô:Ok4:08] and CLCuGV-NE[BF:Pô:Ok5:08] were determined to be 1382, 1353, 1299 and 1353 nt respectively. The alphasatellite sequence associated with CLCuGV-NE[BF:Kap:Ok7:08] display the highest level of nucleotide sequence identity (88.9%) with Cotton leaf curl Gezira alphasatellite from Mali (CLCuGA-[Mali:Bamako]; EU589450). The phylogenetic analysis showed that the alphasatellite associated with CLCuGV-NE[BF:Kap:Ok7:08] segregate with CLCuGA-[Mali:Bamako] and OLCA-[Sudan:2007] (**Figure 3**) and has an arrangement typical of characterized alphasatellites [40], containing a single ORF in the virion sense, an A-rich region with 51% adenine and a hairpin structure with the loop sequence TAGTATTAC. The alphasatellites associated with CLCuGV-NE[BF:Pô:Ok1:08], CLCuGV-NE[BF:Pô:Ok4:08] and CLCuGV-NE[BF:Pô:Ok5:08] shared between 84.8 to 100% nucleotide sequence identity amongst themselves and only 52.4 to 60.1% with the alphasatellites associated with CLCuGV-NE[BF:Kap:Ok7:08] and those characterized in Mali and Sudan (respectively, CLCuGA-[Mali:Bamako] and OLC1-[Sudan:2007]). Considering the suggested species demarcation threshold of 83% nucleotide sequence identity for alphasatellites [17], these alphasatellites represent isolates of a new species provisionally named Okra leaf curl Burkina Faso alphasatellite, clustering together in the phylogenetic tree

(Figure 3; see Table 3 for aphasatellites accession numbers). These particular aphasatellite isolates contain a single ORF in the virion sense and a predicted hairpin structure with the loop sequence CAGTATTAC.

Further to the sequence description of the viral isolates, we were interested in their possible recombinant origin. Three distinct recombination events (a, b and c) were detected within the full genome sequences of CLCuGV isolates (Figure 4), using a large sequence alignment of geminiviruses [41]. The presence or absence of these recombination events has identified four genetic groups of viruses (G1 to G4; Figures 1 and 4). Recombination event b present in all CLCuGV isolates involves a major parent being related to the HoLCrV described in north Africa (Egypt; [9]) and a minor parent related to ToLCDiaV described in the south-west Indian Ocean Islands (Madagascar; [41]). Compared to events a and c based on intra-strain recombination, event b seems to be more ancient. The recombination events a and c specific to isolates G1, G3 and G4 have been characterized in Burkina Faso and in Niger and appear to represent a specific geographic signature. The distribution of the recombination breakpoints observed here confirm the existence of recombination hot spots over the intergenic region (IR) and the centre of C1 ORF (Figure 4) as described by Lefeuvre et al. [41]. The recombination event c of isolates G3 and G4 covers the N terminus of the replication associated protein (Rep) which contains the iteron-related domain (IRD) [42]. This domain is involved in the specificity of interaction with iterated DNA motifs (iterons) of the geminivirus origin of replication (*ori*), functioning as essential elements for specific virus replication. Since the IRD domain of G3 and G4 isolates (MAPTKKFRINSKKNYFL) is different from the IRD domains of G1 and G2 isolates (MPPSKRFLINAKKNYFL or MPFGTHYLSTDILER), the biological aspects of recombination events should be investigated in the future.

In conclusion, in Burkina Faso OLCB is mainly caused by a single begomovirus species and a complex of beta and alpha satellite species, contrary to what happens in the neighbouring countries Mali and Niger (respectively, [5,4]). Taken together, the current molecular results highlight the complex aetiology of the OLCB in Africa and the need for further investigations.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

FT, VSET and OT collected samples; FT, MH, JV cloned and sequenced the viruses and satellites; FT, PL and JML analysed the data and prepared the manuscript. JML, OT, NB, GK, AST, VSET and BR secured funding for the project's execution, and provided ideas and comments during manuscript preparation. All authors have read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This study was supported by the following institutions: International Foundation for Science (IFS) fellowship N° C/4472-1 to F. Tiendrébéogo, AIRES-Sud: a programme from the French Ministry of Foreign and European Affairs implemented by the Institut de Recherche pour le Développement (IRD-DSF), CRSBAN/UFR-SVT (University of Ouagadougou), CIRAD, Conseil Régional de La Réunion, European Union (FEDER) and GIS Centre de recherche et de veille sanitaire sur les maladies émergentes dans l'océan Indien (N°PRAO/AIRD/CRVOI/08/03). The authors wish to thank the anonymous reviewer for

excellent comments and Ben Warren for revising the English version of the manuscript. FT completed this research as part of his PhD Degree.

References

1. N'Guessan KP, Fargette D, Fauquet C, Thouvenel JC: **Aspects of the epidemiology of okra leaf curl virus in Côte d'Ivoire.** *Trop Pest Manag* 1992, **38**: 122-126.
2. Konaté G, Barro N, Fargette D, Swanson MM, Harrison BD: **Occurrence of whitefly-transmitted geminiviruses in crops in Burkina Faso, and their serological detection and differentiation.** *Ann Appl Biol* 1995, **126**: 121–129.
3. Swanson MM, Harrison BD: **Serological relationships and epitope profiles of isolates of okra leaf curl geminivirus from Africa and the Middle-East.** *Biochimie* 1993, **75**: 707–711.
4. Shih SL, Kumar S, Tsai WS, Lee LM, Green SK: **Complete nucleotide sequences of okra isolates of Cotton leaf curl Gezira virus and their associated DNA- β from Niger.** *Arch Virol* 2009, **154**:369-372.
5. Kon T, Rojas MR, Abdourhamane IK, Gilbertson RL: **Roles and interactions of begomoviruses and satellite DNAs associated with okra leaf curl disease in Mali, West Africa.** *J Gen Virol* 2009, **90**: 1001–1013.
6. Ndunguru J, Rajabu AC: **Effect of okra mosaic virus disease on the above-ground morphological yield components of okra in Tanzania.** *Sci Hortic* 2004, **99**:225-235.
7. Idris AM, Brown JK: **Molecular Analysis of Cotton Leaf Curl Virus-Sudan Reveals an evolutionary history of recombination.** *Virus Genes* 2002, **24**:249-256.
8. Shih SL, Green SK, Tsai WS, Lee LM, Levasseur V: **First report of a distinct begomovirus associated with okra yellow crinkle disease in Mali.** *Plant Pathol* 2007, **56**: 718.

9. Bigarré L, Chazly M, Salah M, Ibrahim M, Padidam M, Nicole M, Peterschmitt M, Fauquet C, Thouvenel JC: **Characterization of a new begomovirus from Egypt infecting hollyhock (*Althea rosea*)**. *Eur J Plant Pathol* 2001, **107**: 701–711.
10. Idris AM, Hussein MH, Abdel-Salam AM, Brown JK: **Phylogenetic relationships for okra leaf curl- and hollyhock leaf crumple-associated begomoviruses and first report of associated satellite DNAs**. *Arab J Biotechnol* 2002, **5**: 67-82.
11. Fauquet CM, Stanley J: **Geminivirus classification and nomenclature: progress and problems**. *Ann Appl Biol* 2003, **142**: 165-189.
12. Mansoor S, Briddon RW, Bull SE, Bedford ID, Bashir A, Hussain M, Saeed M, Zafar Y, Malik KA, Fauquet C, Markham PG: **Cotton leaf curl disease is associated with multiple monopartite begomoviruses supported by single DNA β** . *Arch Virol* 2003, **148**: 1969-1986.
13. Lazarowitz SG: **Geminiviruses: genome structure and gene function**. *Crit Rev Plant Sci* 1992, **11**: 327–349.
14. Mansoor S, Khan SH, Bashir A, Saeed M, Zafar Y, Malik KA, Briddon R, Stanley J, Markham PG: **Identification of a novel circular single stranded DNA associated with cotton leaf lurl disease in Pakistan**. *Virology* 1999, **259**: 190-199.
15. Briddon RW, Stanley J: **Sub-viral agents associated with plant-infecting single-stranded DNA viruses**. *Virology* 2006, **344**: 198-210.
16. Saunders K, Briddon RW, Stanley J: **Replication promiscuity of DNA β satellites associated with monopartite begomoviruses: deletion mutagenesis of the *Ageratum* yellow vein virus DNA β satellite localises sequences involved in replication**. *J Gen Virol* 2008, **89**: 3165-3172.

17. Mubin M, Briddon RW, Mansoor S: **Complete nucleotide sequence of chili leaf curl virus and its associated satellites naturally infecting potato in Pakistan.** *Arch Virol* 2009, **154**: 365-368.
18. Delatte H, Martin DP, Naze F, Golbach RW, Reynaud B, Peterschmitt M, Lett JM: **South West Indian Ocean islands tomato begomovirus populations represent a new major monopartite begomovirus group.** *J Gen Virol* 2005, **86**:1533–1542.
19. Briddon RW, Bull SE, Mansoor S, Amin I, Markham PG: **Universal primers for the PCR-mediated amplification of DNA β : a molecule associated with some monopartite begomoviruses.** *Mol Biotechnol* 2002, **20**:315–318.
20. Bull SE, Briddon RW, Markham PG: **Universal primers for the PCR-mediated amplification of DNA 1: a satellite-like molecule associated with begomovirus-DNA β complexes.** *Mol Biotechnol* 2003, **23**:83–86.
21. Inoue-Nagata AK, Albuquerque LC, Rocha WB, Nagata T: **A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage ϕ 29 DNA polymerase.** *J Virol Methods* 2004, **116**:209–211.
22. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ: **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.** *Nucleic Acids Res* 1994, **22**:4673-4680.
23. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S: **MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0.** *Mol Biol Evol* 2007, **24**:1596-1599.
24. Posada D: **ModelTest Server: a web-based tool for the statistical selection of models of nucleotide substitution online.** *Nucleic Acids Res* 2006, **34**:W700-3.

25. Guindon S, Lethiec F, Duroux P, Gascuel O: **PHYML Online-a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference.** *Nucleic Acids Res* 2005, **33**:557-559.
26. Martin D, Rybicki E: **RDP: detection of recombination amongst aligned sequences.** *Bioinformatics* 2000, **16**:562-563.
27. Padidam M, Sawyer S, Fauquet CM: **Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination.** *Virology* 1999, **265**: 218-225.
28. Martin DP, Posada D, Crandall KA, Williamson C: **A modified bootscan algorithm for automated identification of recombinant sequences and recombination breakpoints.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 2005, **21**:98-102.
29. Maynard SJ: **Analyzing the mosaic structure of genes.** *J Mol Evol* 1992, **34**:126-129.
30. Gibbs MJ, Armstrong JS, Gibbs AJ: **Sister-Scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences.** *Bioinformatics* 2000, **16**:573-582.
31. Boni MF, Posada D, Feldman MW: **An Exact Nonparametric Method for Inferring Mosaic Structure in Sequence Triplets.** *Genetics* 2007, **176**:1035-1047.
32. Martin DP, Williamson C, Posada D: **RDP2: recombination detection and analysis from sequence alignments.** *Bioinformatics* 2005, **21**:260-262.
33. Idris AM, Brown JK: **Identification of a new, monopartite begomovirus associated with leaf curl disease of cotton in Gezira, Sudan.** *Plant Dis* 2000, **84**:809.
34. Rojas MR, Hagen C, Lucas WJ, Gilbertson RL: **Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses.** *Annu Rev Phytopathol* 2005, **43**: 361–394.
35. Zhou YC, Noussourou M, Kon T, Rojas M, Jiang H, Chen LF, Gamby K, Foster R, Gilbertson RL: **Evidence of local evolution of tomato-infecting begomovirus species in West Africa: characterization of tomato leaf curl Mali virus and tomato yellow leaf crumple virus from Mali.** *Arch Virol* 2008, **153**:693–706.

36. Fauquet CM, Briddon RW, Brown JK, Moriones E, Stanley J, Zerbini M, Zhou X: **Geminivirus strain demarcation and nomenclature.** *Arch Virol* 2008, **153**:783–821.
37. Briddon RW, Bull SE, Amin I, Idris AM, Mansoor S, Bedford ID, Dhawan P, Rishi N, Siwatch SS, Abdel-Salam AM, Brown JK, Zafar Y, Markham PG: **Diversity of DNA β : a satellite molecule associated with some monopartite begomoviruses.** *Virology* 2003, **312**:106–121.
38. Briddon RW, Brown JK, Moriones E, Stanley J, Zerbini M, Zhou X, Fauquet CM: **Recommendations for the classification and nomenclature of the DNA- β satellites of begomoviruses.** *Arch Virol* 2008, **153**:763–781.
39. Mansoor S, Zafar Y, Briddon RW: **Geminivirus disease complexes: the threat is spreading.** *Trends Plant Sci* 2006, **11**: 209-212.
40. Briddon RW, Bull SE, Amin I, Mansoor S, Bedford ID, Rishi N, Siwatch SS, Zafar Y, Abdel-Salam AM, Markham PG: **Diversity of DNA β : a satellite-like molecule associated with monopartite begomovirus-DNA beta complexes.** *Virology* 2004, **324**:462–474.
41. Lefeuvre P, Martin DP, Hoareau M, Naze F, Delatte H, Thierry M, Varsani A, Becker N, Reynaud B, Lett JM: **Begomovirus 'melting pot' in the south-west Indian Ocean islands: molecular diversity and evolution through recombination.** *J Gen Virol* 2007, **88**:3458-3468.
42. Argüello-Astorga GR, Ruiz-Medrano R: **An iteron-related domain is associated to motif 1 in the replication proteins of geminiviruses: identification of potential interacting amino acid-base pairs by a comparative approach.** *Arch Virol* 2001, **146**: 1465-1485.

Figure legends

Figure 1: Maximum likelihood tree based on the complete DNA-A sequences of twenty-three *Cotton leaf curl Gezira virus* isolates from Burkina Faso (in bold; see **Table 2** for isolates name and acronyms), plus additional sequences from African and Asian monopartite and bipartite begomoviruses. *Begomovirus* acronyms used are *Cotton leaf curl Gezira virus* (CLCuGV), *Hollyhock leaf crumple virus* (HoLCrV), *Cotton leaf curl Bangalore virus* (CLCuBV), *Okra yellow vein mosaic virus* (OYVMV), *Tomato leaf curl Togo virus* (ToLCTGV), *Tomato leaf curl Ghana virus* (ToLCGHV), *Tomato leaf curl Nigeria virus* (ToLCNGV), *South African cassava mosaic virus* (SACMV), *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV), *Tomato leaf curl Sudan virus* (ToLCSDV), *Tomato yellow leaf curl Mali virus* (TYLCMLV), *Tomato yellow leaf curl virus-Mild* (TYLCV-Mld), *Pepper yellow vein Mali virus* (PepYVMV), *Tomato curly stunt virus* (ToCSV), *Tobacco leaf curl Zimbabwe virus* (TbLCZV), *Tomato leaf curl Mali virus* (ToLCMV), *Okra yellow crinkle virus* (OYCrV) and *Malvastrum leaf curl virus* (MaLCV). For the complete description of isolate descriptors refer to Fauquet et al. (2008). Four genetic groups (G1 to G4) have been defined on the presence or absence of recombination events (Figure 4), and are represented here.

Figure 2: Maximum likelihood tree based upon alignments of selected begomovirus genome betasatellite sequence. The betasatellite acronyms used are as described by Briddon et al. [40]: *Cotton leaf curl Gezira betasatellite* (CLCuGB), *Papaya leaf curl betasatellite* (PaLCuB), *Ageratum yellow vein Sri Lanka betasatellite* (AYVSLB), *Sida yellow mosaic China betasatellite* (SiYMCNB), *Malvastrum yellow vein betasatellite* (MaYVB), *Cotton leaf curl Multan betasatellite* (CLCuMB) and *Cotton leaf curl alphasatellite* (CLCuA-[PK:1:99]) (Outgroup).

Figure 3: Maximum likelihood tree based on selected alphasatellite sequences. Acronyms used are as described by Mubin et al. [17]: Malvastrum yellow mosaic alphasatellite (MaYMA), Sida leaf curl alphasatellite (SiLCuA), Gossypium darwinii symptomless alphasatellite (GDSA), Okra leaf curl alphasatellite (OLCA), Cotton leaf curl Rajasthan alphasatellite (CLCuRA), Tomato yellow leaf curl China alphasatellite (TYLCCNA), Tobacco curly shoot alphasatellite (TbCSA), Sida yellow vein Vietnam alphasatellite (SiYVVNA), Okra leaf curl alphasatellite (OLCA), Okra leaf curl Cameroon alphasatellite (OLCCMA) and *Cotton leaf curl Gezira betasatellite* (CLCuGB) (outgroup).

Figure 4: Recombinant regions (a, b and c) detected within the African isolates of CLCuGV sequences using RDP3. Four genetic groups (G1 to G4) have been defined on the presence or absence of recombination events. The genome at the top of the figure corresponds to the schematic representation of sequences below. Region coordinates are nucleotide positions of detected recombination breakpoints in the multiple sequence alignment used to detect recombination. Wherever possible, parental sequences are identified. “Major” and “Minor” parents are sequences that were used, along with the indicated recombinant sequence, to identify recombination. Whereas for each identified event the minor parent is apparently the contributor of the sequence within the indicated region, the major parent is the apparent contributor of the rest of the sequence. Note that the identified “parental sequences” are not the actual parents but are simply those sequences most similar to the actual parents in the analysed dataset. Recombinant regions and parental viruses were identified using the RDP (R), GENECONV (G), BOOTSCAN (B), MAXIMUM CHI SQUARE (M), CHIMAERA (C), SISTER SCAN (S) and 3Seq (T) methods. Whereas upper case letters imply a method detected recombination with a multiple comparison corrected P-value <0.01, lower case

letters imply the method detected recombination with a multiple comparison corrected P-value <0.05 but ≥ 0.01 .

Table 1: Matrix of pairwise identity percentages between the complete DNA-A nucleotide sequences of the twenty-three isolates of okra-infecting *Cotton leaf curl Gezira virus* (CLCuGV) isolates from Burkina Faso and representatives of some begomoviruses infecting okra in Africa.

	CLCuGV-NE [NE:Sad: NG1:07]*	CLCuGV-NE [NE:Sad: AF1:07]*	CLCuGV-NE [NE:Sad: NG2:07]*	CLCuGV-EG [EG:Cai: Ok]*	CLCuGV-SD [SD:Sha: Ok]*	CLCuGV-SD [SD:Gez: Sij]	CLCuGV-SD [SD:Gez: Ok]*	CLCuGV-CM [CM:Lys: Ok:08]*	OYCV- [ML:06]*	OYCV- [CM:Njo: Ok:08]*	OYCV- [ML:01: 05]*	HoLCrV- [BG:Cai:97]	HoLCrV- [EG:Giz]
NE [BF:Tie:Ok1:08]*	96.3	96.8	98.7	93.3	95	94.6	94.8	89.6	72.4	72.6	72.4	84.1	83.9
NE [BF:Tie:Ok2:08]*	96.3	96.8	98.7	93.3	95	94.6	94.8	89.6	72.4	72.4	72.4	84.1	83.9
NE [BF:Kap:Ok1:08]*	97.3	96.8	96.8	94.4	96.1	95.9	96.0	91.4	72.0	72.4	72.0	83.7	83.7
NE [BF:Kap:Ok2:08]*	96.4	96.4	98.8	93.3	94.9	94.6	94.8	89.3	72.2	72.3	72.2	83.9	83.7
NE [BF:Kap:Ok3:08]*	96.8	97.1	96.7	94.4	96.2	95.9	96.0	91.4	72.1	72.6	72.0	84.1	84.1
NE [BF:Kap:Ok4:08]*	96.3	96.8	98.7	93.3	95.0	94.7	94.8	89.6	72.4	72.6	72.4	84	83.8
NE [BF:Kap:Ok5:08]*	96.6	96.2	96.8	94.2	96.1	95.9	96.1	91.2	72	72.3	71.9	83.5	83.5
NE [BF:Kap:Ok6:08]*	95.9	96.2	96.2	94.6	96.2	95.8	96.1	91.5	71.7	72.4	71.7	84.0	84.1
NE [BF:Kap:Ok7:08]*	96.3	96.8	98.6	93.2	95	94.6	94.8	89.6	72.3	72.5	72.3	83.9	83.7
NE [BF:Kap:Ok8:08]*	96.8	96.4	96.7	94.3	96.1	95.9	96.0	91.3	72.0	72.4	71.9	83.8	83.7
NE [BF:Kap:Ok9:08]*	96.3	96.8	98.7	93.3	95.0	94.6	94.8	89.6	72.4	72.6	72.3	83.9	83.8
NE [BF:Kap:Ok10:08]*	95.0	94.8	97.3	93.2	94.8	94.6	94.7	89.3	72.2	72.0	72.2	83.6	83.4
NE [BF:P6:Ok1:08]*	95.4	95.1	95.9	94.0	95.7	95.4	95.6	90.7	71.9	72.3	71.9	83.4	83.4
NE [BF:P6:Ok2:08]*	95.3	95.1	95.8	94.0	95.7	95.4	95.6	90.6	71.9	72.3	71.9	83.4	83.4
NE [BF:P6:Ok3:08]*	96.6	96.5	96.5	94.4	95.9	95.7	95.8	91.1	72	72.3	71.9	83.8	83.8
NE [BF:P6:Ok4:08]*	96.6	96.5	96.5	94.4	95.9	95.7	95.8	91.1	72	72.3	71.9	83.8	83.8
NE [BF:P6:Ok5:08]*	96.6	96.5	96.5	94.4	95.9	95.7	95.8	91.1	72	72.3	71.9	83.8	83.8
NE [BF:P6:Ok6:08]*	96.6	96.5	96.5	94.4	95.9	95.7	95.8	91.1	72	72.3	71.9	83.8	83.8
NE [BF:P6:Ok7:08]*	96.6	96.5	96.5	94.4	95.9	95.7	95.8	91.1	72	72.3	71.9	83.8	83.8
NE [BF:Kab:Ok1:08]*	96.6	96.5	96.5	94.4	95.9	95.7	95.8	91.1	72	72.3	71.9	83.8	83.8
NE [BF:Kab:Ok2:08]*	96.6	96.5	96.5	94.4	95.9	95.7	95.8	91.1	72	72.3	71.9	83.8	83.8
NE [BF:Baz:Ok:09]*	96.4	96.7	98.8	93.4	95.1	94.7	95	89.6	72.4	72.4	72.4	83.9	83.7
NE [BF:Bam:Ok:09]*	98.7	98.2	95.9	92.4	93.9	93.7	93.8	89.3	72.4	72.7	72.3	84.2	84.0

*Begomovirus DNA-A isolated on Okra (*Abelmoschus esculentus*) from Burkina Faso

Acronyms: Niger: NE; Burkina Faso : BF ; Tiébélé: Tie; Kampala: Kap; Kamboinsé: Kab; Bazéga: Baz; Bama: Bam

Percentages of identity over the 89% taxonomic threshold of begomovirus are presented in bold

Table 2: Name, acronym and accession numbers of begomovirus reported in this study.

Virus name	Acronym	Isolates groups	DNA-A length (nt)	Accession numbers
Cotton leaf curl Gezira virus-Niger [Burkina Faso: Tiébélé: Okra1:2008]	CLCuGV-NE [BF:Tie:Ok1:08]	G1	2762	FN554519
Cotton leaf curl Gezira virus-Niger [Burkina Faso: Tiébélé: Okra2:2008]	CLCuGV-NE [BF:Tie:Ok2:08]	G1	2762	FN554520
Cotton leaf curl Gezira virus-Niger [Burkina Faso: Kampala: Okra1:2008]	CLCuGV-NE [BF:Kap:Ok1:08]	G1	2761	FN554521
Cotton leaf curl Gezira virus-Niger [Burkina Faso: Kampala: Okra2:2008]	CLCuGV-NE [BF:Kap:Ok2:08]	G1	2762	FN554522
Cotton leaf curl Gezira virus- Niger [Burkina Faso: Kampala: Okra3:2008]	CLCuGV-NE [BF:Kap:Ok3:08]	G2	2763	FN554523
Cotton leaf curl Gezira virus-Niger [Burkina Faso: Kampala: Okra4:2008]	CLCuGV-NE [BF:Kap:Ok4:08]	G1	2762	FN554524
Cotton leaf curl Gezira virus-Niger [Burkina Faso: Kampala: Okra5:2008]	CLCuGV-NE [BF:Kap:Ok5:08]	G2	2762	FN554525
Cotton leaf curl Gezira virus-Niger [Burkina Faso: Kampala: Okra6:2008]	CLCuGV-NE [BF:Kap:Ok6:08]	G2	2763	FN554526
Cotton leaf curl Gezira virus-Niger [Burkina Faso: Kampala: Okra7:2008]	CLCuGV-NE [BF:Kap:Ok7:08]	G1	2762	FN554527
Cotton leaf curl Gezira virus-Niger [Burkina Faso: Kampala: Okra8:2008]	CLCuGV-NE [BF:Kap:Ok8:08]	G2	2762	FN554528
Cotton leaf curl Gezira virus-Niger [Burkina Faso: Kampala: Okra9:2008]	CLCuGV-NE [BF:Kap:Ok9:08]	G1	2765	FN554529
Cotton leaf curl Gezira virus-Niger [Burkina Faso: Kampala: Okra10:2008]	CLCuGV-NE [BF:Kap:Ok10:08]	G2	2773	FN554530
Cotton leaf curl Gezira virus-Niger [Burkina Faso: Pô: Okra1:2008]	CLCuGV-NE [BF:Pô:Ok1:08]	G2	2770	FN554531
Cotton leaf curl Gezira virus-Niger [Burkina Faso: Pô: Okra2:2008]	CLCuGV-NE [BF:Pô:Ok2:08]	G2	2770	FN554532
Cotton leaf curl Gezira virus-Niger [Burkina Faso: Pô: Okra3:2008]	CLCuGV-NE [BF:Pô:Ok3:08]	G2	2761	FN554533
Cotton leaf curl Gezira virus-Niger [Burkina Faso: Pô: Okra4:2008]	CLCuGV-NE [BF:Pô:Ok4:08]	G2	2761	FN554534
Cotton leaf curl Gezira virus-Niger [Burkina Faso: Pô: Okra5:2008]	CLCuGV-NE [BF:Pô:Ok5:08]	G2	2761	FN554535
Cotton leaf curl Gezira virus-Niger [Burkina Faso: Pô: Okra6:2008]	CLCuGV-NE [BF:Pô:Ok6:08]	G2	2761	FN554536
Cotton leaf curl Gezira virus-Niger [Burkina Faso: Pô: Okra7:2008]	CLCuGV-NE [BF:Pô:Ok7:08]	G2	2761	FN554537
Cotton leaf curl Gezira virus-Niger [Burkina Faso: Kamboinsé: Okra1:2008]	CLCuGV-NE [BF:Kab:Ok1:08]	G2	2761	FN554538
Cotton leaf curl Gezira virus-Niger [Burkina Faso: Kamboinsé: Okra2:2008]	CLCuGV-NE [BF:Kab:Ok2:08]	G2	2761	FN554539
Cotton leaf curl Gezira virus-Niger [Burkina Faso: Baze ga: Okra:2009]	CLCuGV-NE [BF:Baz:Ok:09]	G1	2762	FN554540
Cotton leaf curl Gezira virus-Niger [Burkina Faso: Bama: Okra:2009]	CLCuGV-NE [BF:Bam:Ok:09]	G3	2771	FN554541

*GenBank-EMBL-DDBJ data bases

Table 3: Betasatellites and alphasatellites characterized in this study.

Betasatellite and alphasatellite names	Acronym	DNA molecule and size (nt)		Accession numbers
		Betasatellite	Alphasatellite	
<i>Corson leaf curl Gezira betasatellite</i> - [Burkina Faso :Tiébélé:Okra2:2008]	CLCuGB- [BF:Te:Ok2:08]	1348		FN554573
<i>Corson leaf curl Gezira betasatellite</i> - [Burkina Faso :Kampala:Okra1-1:2008]	CLCuGB- [BF:Kap:Ok1-1:08]	1347		FN554574
<i>Corson leaf curl Gezira betasatellite</i> - [Burkina Faso :Kampala:Okra1-2:2008]	CLCuGB- [BF:Kap:Ok1-2:08]	1347		FN554575
<i>Corson leaf curl Gezira betasatellite</i> - [Burkina Faso :Kampala:Okra3:2008]	CLCuGB- [BF:Kap:Ok3:08]	1349		FN554576
<i>Corson leaf curl Gezira betasatellite</i> - [Burkina Faso :Kampala:Okra5:2008]	CLCuGB- [BF:Kap:Ok5:08]	1348		FN554577
<i>Corson leaf curl Gezira betasatellite</i> - [Burkina Faso :Kampala:Okra6:2008]	CLCuGB- [BF:Kap:Ok6:08]	1347		FN554578
<i>Corson leaf curl Gezira betasatellite</i> - [Burkina Faso:P6:Okra6:2008]	CLCuGB- [BF:P6:Ok6:08]	1347		FN554579
<i>Corson leaf curl Gezira alphasatellite</i> - [Burkina Faso:Kampala:Okra7:2008]	CLCuGA- [BF:Kap:Ok7:08]		1387	FN554580
Okra leaf curl Burkina Faso alphasatellite- [Burkina Faso :P6:Okra1:2008]	OLCBFA- [BF:P6:Ok1:08]		1353	FN554581
Okra leaf curl Burkina Faso alphasatellite- [Burkina Faso:P6:Okra4:2008]	OLCBFA- [BF:P6:Ok4:08]		1299	FN554582
Okra leaf curl Burkina Faso alphasatellite- [Burkina Faso:P6:Okra5:2008]	OLCBFA- [BF:P6:Ok5:08]		1353	FN554583

*GenBank-EMBL-DDBJ data bases

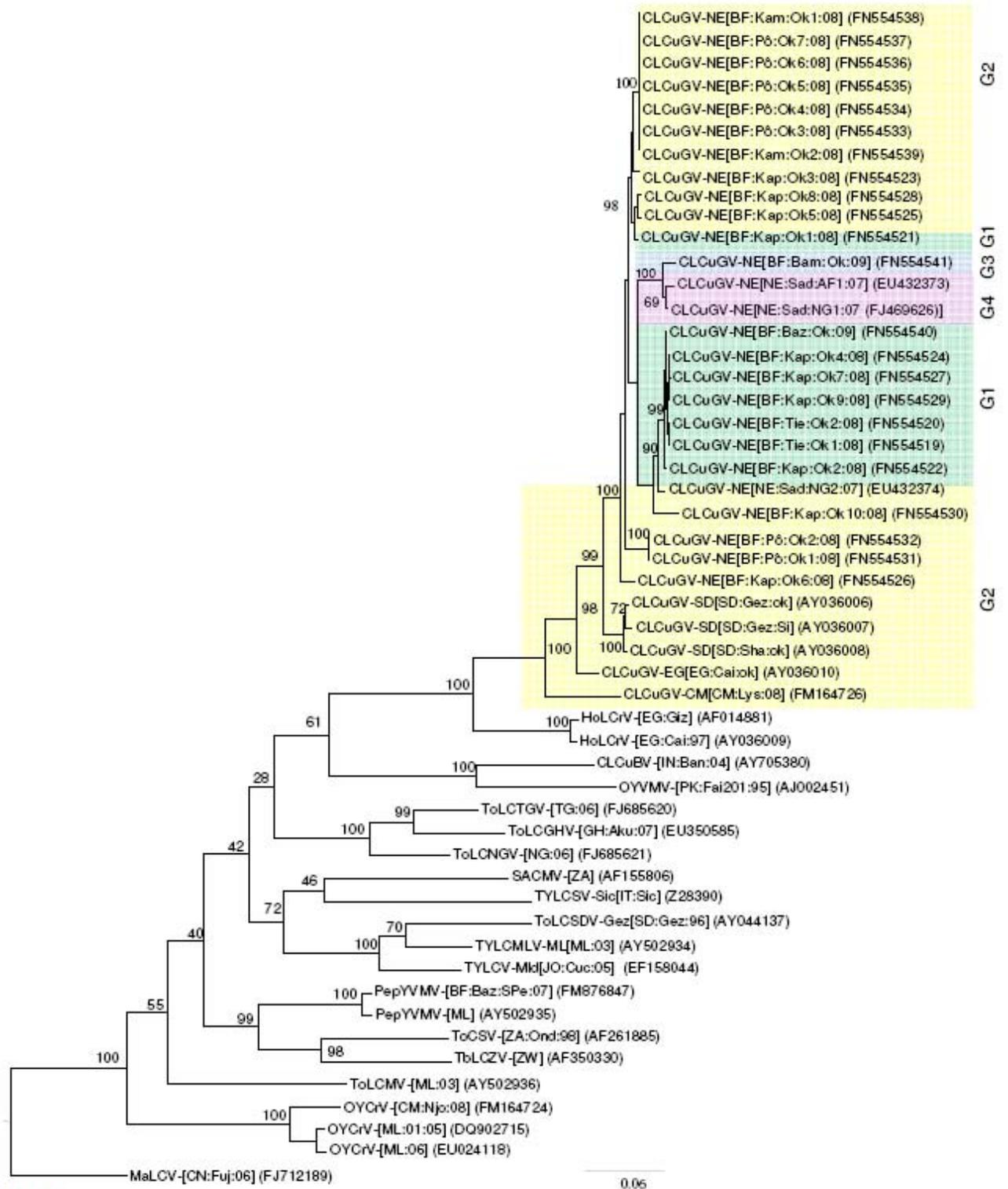


Figure 1

Figure 2

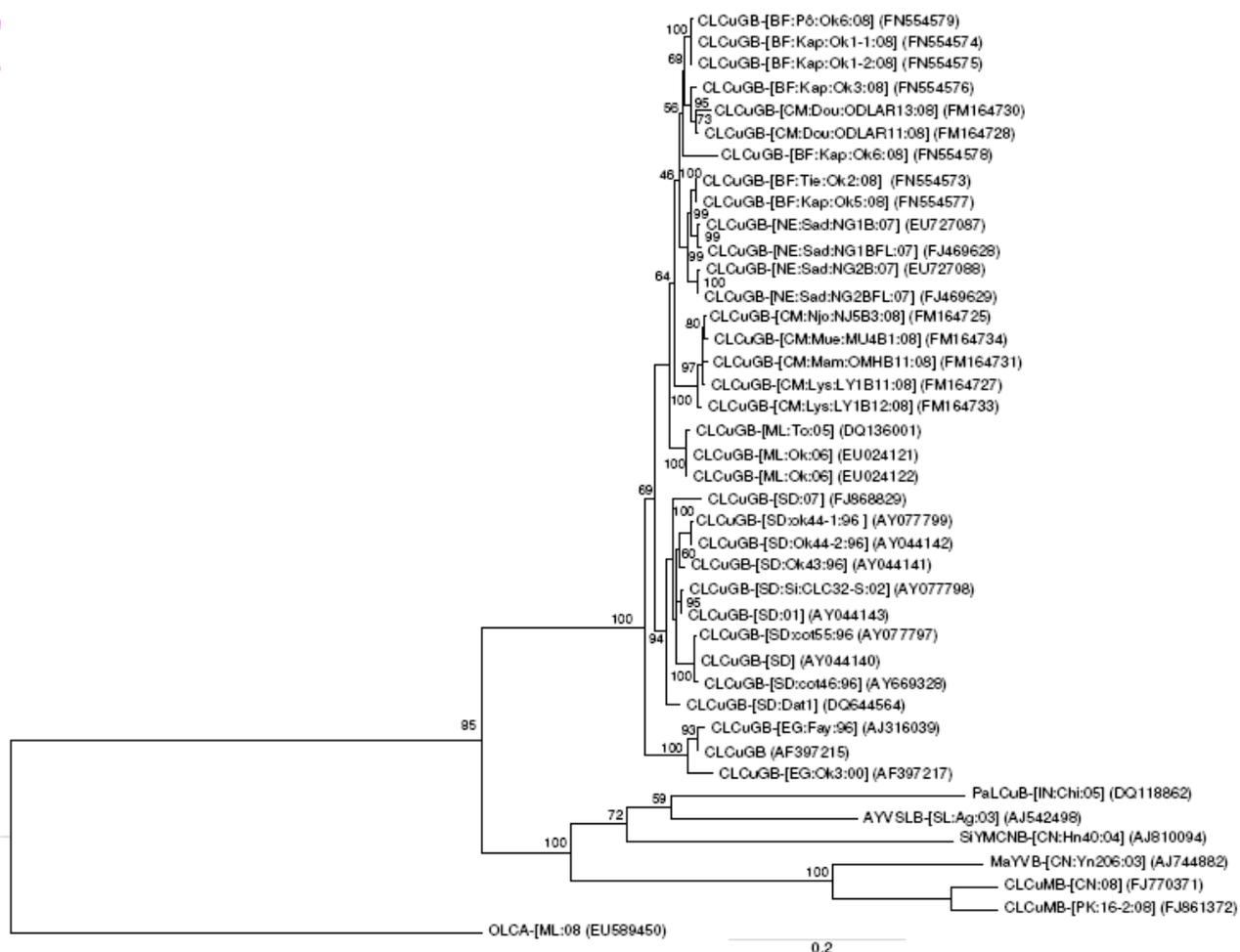
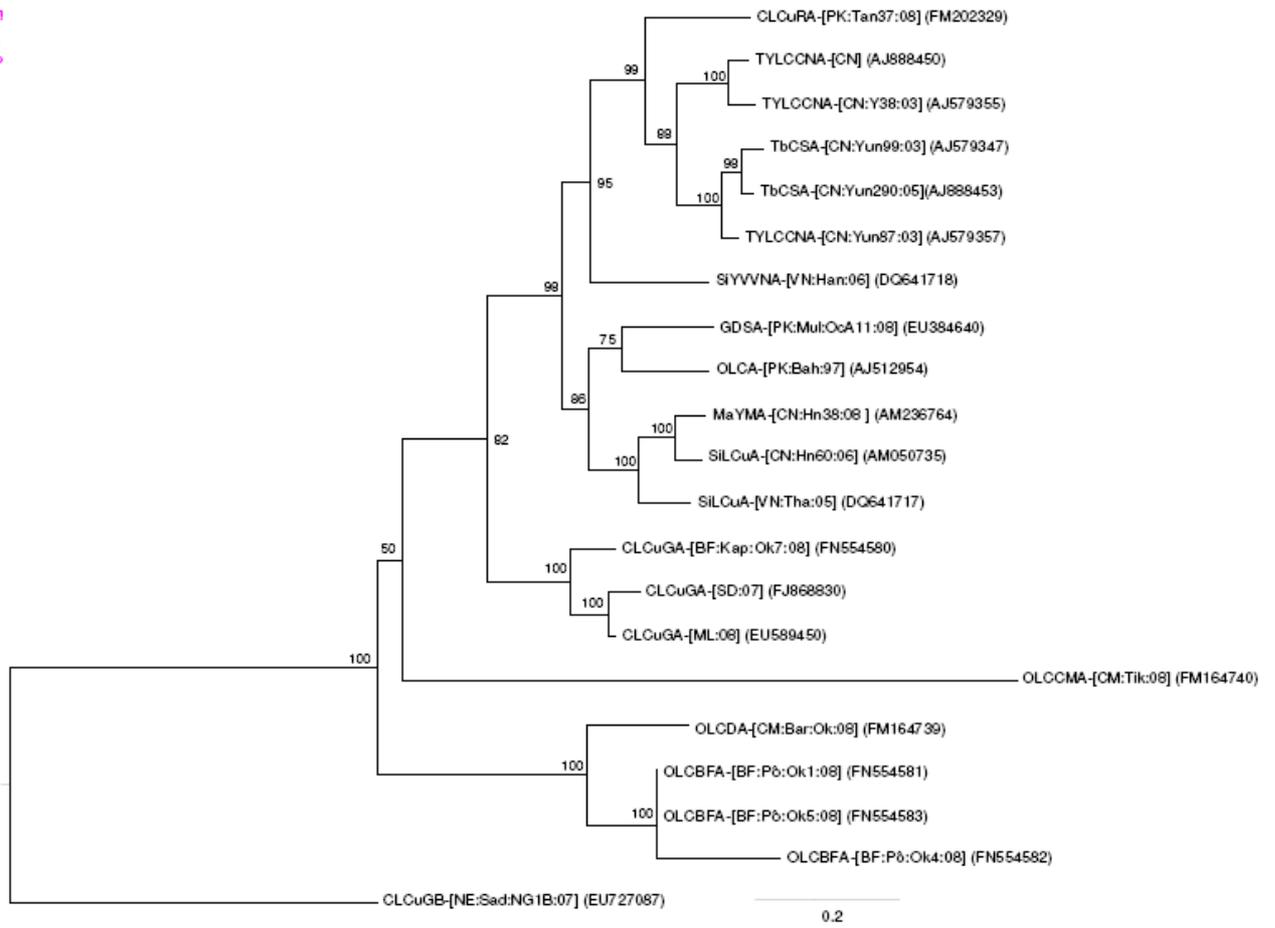
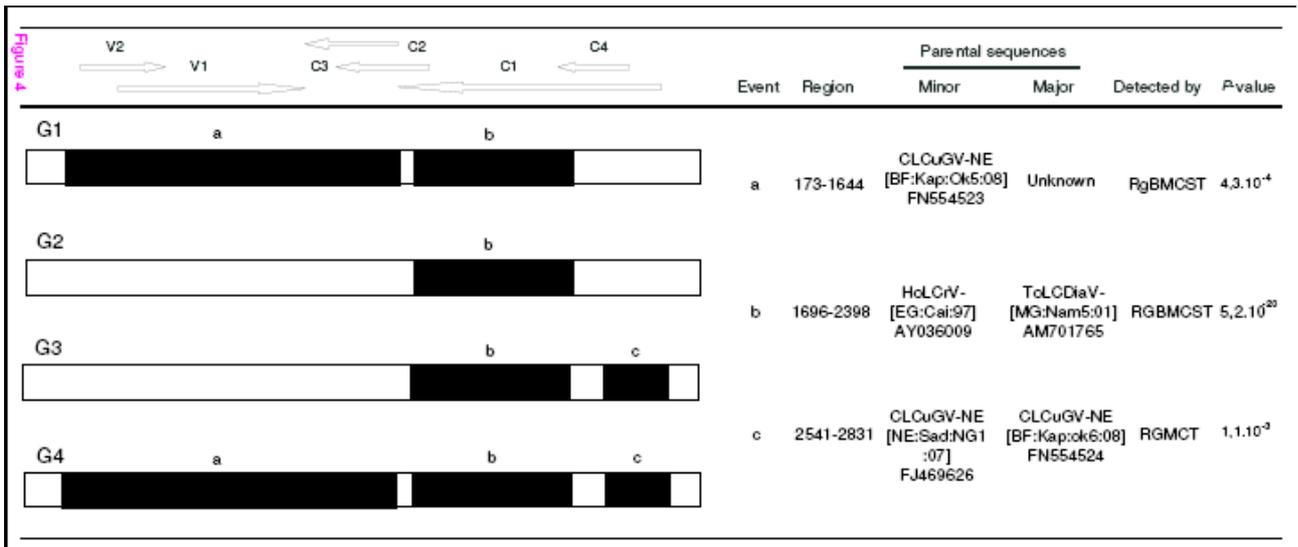


Figure 3





**Les pertes de récoltes causées par les
Begomovirus infectant le gombo (*Abelmoschus
esculentus*)**

1. Introduction

La maladie causant les symptômes de repliements foliaires observés sur le gombo (*Abelmoschus esculentus*), constitue une contrainte majeure pour la production de ce légume dans les régions tropicales. L'impact de la maladie sur quatre provenances de la variété locale "Man Yanga" et quatre variétés commerciales (Clemson spineless, Indiana, Lima et Volta) a été évalué en champ dans des conditions d'expérimentation naturelles. Les essais ont été implantés à Kombissiri et à Kamboinsé pendant les saisons pluvieuses (juin à octobre) de 2007 et 2008.

L'incidence de la maladie était très élevée chez les différentes provenances de la variété locale et variait de 68,5% à 72,5% tandis que chez les variétés commerciales, elle se situait seulement entre 8,7 et 16,2%. La réduction de taille observée sur les plants malades était de l'ordre de 58% sur la variété locale et de 39,6% sur les variétés commerciales. En vue d'évaluer les pertes causées par les *Begomovirus* sur le gombo, les paramètres suivants ont été mesurés: le nombre de fruits par plante, la longueur des fruits, le diamètre des fruits et le poids des fruits. Une comparaison de ces données entre les plantes malades et saines a été faite. Ainsi, Les réductions suivantes ont été observées: 26 à 61% sur le nombre de fruits, de 19 à 64% sur la longueur des fruits, de 6 à 42% sur le diamètre des fruits, et de 23 à 63% sur le poids des fruits. La perte de rendement globale est significativement élevée sur les 4 provenances de la variété locale (26-55%) alors qu'elle n'est que de 4,4 à 9,6% chez les variétés commerciales. La perte économique moyenne par hectare a été estimée à 11100 dollar US (soit 5,5 millions de Francs CFA) pour les cultivars locaux et à 1950 dollar US (soit environ 1 million de Francs CFA) pour les variétés commerciales.

Ces résultats suggèrent un besoin urgent de contrôle des maladies bégomovirales sur le gombo au profit des petits producteurs. L'article ci-dessous rapporte les détails expérimentaux et les résultats majeurs de l'impact de la maladie sur la morphologie et les pertes de rendements du gombo.

2. Article 5: Impact of okra leaf curl disease on morphology and yield of okra
(*Crop protection in press*).



Contents lists available at ScienceDirect

Crop Protection

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cropro



Impact of okra leaf curl disease on morphology and yield of okra

Fidèle Tiendrébéogo^a, V.S. Edgar Traoré^b, Jean-Michel Lett^c, Nicolas Barro^a, Gnissa Konaté^b, Alfred S. Traoré^a, Oumar Traoré^{b,*}

^aLaboratoire de Biochimie & Biologie Moléculaire, CRSBAN/UFR/SVT, Université de Ouagadougou, Burkina Faso

^bInstitut de l'Environnement et de Recherches Agricoles (INERA), 01 BP 476, Ouagadougou 01, Burkina Faso

^cCIRAD, UMR 53 FVBMT CIRAD-Université de la Réunion, Pôle de Protection des Plantes, 7 Chemin de l'IRAT, 97410 Saint Pierre, La Réunion, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 April 2009

Received in revised form

5 February 2010

Accepted 10 February 2010

Keywords:

Okra

Leaf curl disease

Incidence

Yield losses

ABSTRACT

The impact of okra leaf curl disease on four accessions of a local okra cultivar and four commercial okra cultivars was assessed in field conditions from June to October in 2007 and 2008. Disease incidence varied from 68.5% to 72.5% among accessions of the local cultivar while commercial cultivars were much less infected (8.7–16.2%). Diseased plants of the local cultivar suffered more reduced growth (58% reduction) than those of the commercial cultivars (39.6%). The number of marketable fruits per plant, the fruit length, fruit diameter and fruit weight which were subject to reductions of 26–61%, 19–64%, 6–42% and 23–63%, respectively. The overall yield losses were significantly higher in accessions of the local cultivar (26–55%) than in the commercial ones (4.4–9.6%). The average economic losses for one hectare of crop were estimated at of 11,100 USD and 1950 USD, respectively for the local and the commercial cultivars.

© 2010 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench, previously *Hibiscus esculentus* L.) is a vegetable plant belonging to the family of the Malvaceae. It is an important crop which is widely cultivated in different parts of the world mostly for human consumption and also for industrial use as fibre (Alegbejo et al., 2008). India is the world's largest producer with around 3.5 million tonnes according to Food and Agriculture Organisation statistics. The leading producer countries in Africa are Nigeria (735,000 t), Sudan, Côte d'Ivoire, Ghana and Egypt (around 100,000 t for each country). Despite these high figures, okra yields are very variable ranging from 1.7 t/ha to 19 t/ha. Pests and diseases are the most damaging factors for okra production. Indeed, okra is susceptible to at least 19 plant viruses (Brunt et al., 1990; Swanson and Harrison, 1993). These viruses severely affect okra production in terms of yield and fruit quality. In several parts of Africa, okra leaf curl disease (OLCD) is considered as the most serious disease threatening okra production (Fauquet and Thouvenel, 1987; N'Guessan et al., 1992; Swanson and Harrison, 1993; Bigarré et al., 2001). OLCD is

characterized by either upward or downward leaf curling, mostly associated with plant stunting (Konaté et al., 1995; Brunt et al., 1996; Harrison and Robinson, 1999). Recently, it was evidenced that OLCD is associated in Africa with a complex of begomoviruses: *Cotton leaf curl Gezira virus* (CLCuGV) (Idris and Brown, 2002; Shih et al., 2009), *Okra yellow crinkle virus* (OYCrV) (Shih et al., 2007) and *Hollyhock leaf crumple virus* (HoLCrV) (Bigarré et al., 2001; Idris et al., 2002) and DNA beta satellites (Idris et al., 2002; Kon et al., 2009). Viruses of the genus *Begomovirus* belong to the family Geminiviridae and are transmitted by the whitefly vector *Bemisia tabaci* (Genn.) (Fauquet and Stanley, 2003). Since the last decade, begomoviruses have become a major constraint to vegetable production in Africa and more widely in the world. Difficulties controlling populations of whiteflies arose because *B. tabaci* developed resistance to insecticides (Otoidobiga et al., 2003).

In Burkina Faso, okra is widely grown in both rainy and dry seasons. It is a major source of income particularly for small-scale farming women who represent c.80% of okra producers. According to the Food and Agriculture Organisation (www.faostat.org), 26,000 t were produced annually during the last five years, which is worth c.7 million USD. Although official figures are unavailable, most okra is locally consumed and only a small fraction is exported. Previously, okra was mainly cultivated in rural areas but in recent years, the crop is produced in many urban and peri-urban areas to fit the needs of the growing urban population and to alleviate poverty. Since OLCD was reported in the country in 1995 (Konaté

* Corresponding author. Laboratoire de Virologie et de Biotechnologies Végétales INERA/CNRST, 01 BP 476, Ouagadougou 01, Burkina Faso. Tel.: +226 50319208; fax: +226 50340271.

E-mail addresses: kourouda@gmail.com, ohmar@hotmail.com (O. Traoré).

et al., 1995), the status of disease has changed notably. Increased okra cultivation along with the occurrence of uncontrolled populations of whitefly vectors led to higher disease incidence and severity but no serious steps have been taken to manage the disease. This paper aimed at assessing okra leaf curl disease incidence and effects on yield losses in the central region of Burkina Faso, a main okra producing area in the country. The availability of such information should play a more critical role in making decisions on the necessity of controlling the disease.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Four accessions of a local okra cultivar named 'Man Yanga' and four improved commercial cultivars were used in this study. 'Man Yanga' is a widely grown okra cultivar, especially in the centre and the north of the country. Accessions of this local cultivar (referred to as MY1, MY2, MY3 and MY4) were obtained from farmer saved seeds at different locations. Seed lots of commercial cultivars (Clemson spineless, Indiana, Lima and Volta) were obtained from Technisem (France). Clemson spineless produces smooth fruits which are very suitable for export and Indiana, the only hybrid, is reported by the seed company to be resistant to *Okra yellow vein mosaic virus*. The cultivar Lima is tolerant to cold and its fruits are straight and easy to pack for transportation. Volta has been bred for local markets and is well suited to the cool season with a stable and high yielding potential.

2.2. Field experiments

Experiments were done in two fields located at Kombissiri (12°1'22"N; 1°21'47.44"W) and Kamboinsé (12°27'37"N; 1°33'16"W), respectively. Both localities are part of the Sudan–Sahel zone and major okra producing areas which benefit from small-scale irrigation schemes. Trials were conducted from June to October, in 2007 for Kombissiri and in 2008 for Kamboinsé. Okra plants were grown singly in rows spaced 85 cm apart. The spacing between the rows was 45 cm. Fields Randomised complete block designs were used whereby every cultivar was grown in three replicates each of 100 plants. NPK (45–60–70 kg ha⁻¹) fertilizer was first applied at planting. Supplementary N was applied 20 and 40 days after sowing at rates of 25 and 45 kg ha⁻¹, respectively. All plots were weeded at three-week intervals. Plants were monitored for OLCD symptoms under natural field contamination and 16 leaf samples (two samples/cultivar) were taken randomly from each field for virus detection. All diseased plants were tagged before harvest. When the fruits had optimal marketing quality, plant growth and yield parameters were recorded from both diseased and healthy plants.

2.3. PCR tests for virus detection

A pair of primers (Okra-F318: 5'-AATTATGTCGAAGCCACCAG-3' and Okra-R1004: 5'-GCATTCTCCGTATGATTCTC-3') were designed for begomovirus detection in field samples. The two primers were designed to amplify a fragment of the core region of the coat protein gene between nucleotide positions 318 and 1004 (Position 1 corresponding to the nicking site of replication initiation). Sequence alignments from the following leaf curl inducing begomoviruses were used for primer design: CLCuGV (accessions numbers: AY036010, AF155064, EU432373) and OYCrV (DQ902715, DQ875879 and EU024118). Each PCR reaction was carried out in a final volume of 25 µl in the presence of 20 pmol of each primer, 20 mM of each deoxynucleoside triphosphate, 1.5 mM MgCl₂. The amplification programme was as followed: a cycle of 5 min at 94 °C,

then 30 cycles at 94 °C for 1 min, 60 °C for 30 s, 72 °C for 1 min 30 s, and a final cycle at 72 °C for 5 min. Amplifications were checked by loading 10 µl of PCR products onto 1% agarose gels for electrophoresis. The gels were subsequently stained with ethidium bromide and viewed under UV transillumination.

2.4. Statistical analyses

Means of plant growth measurements and yield parameters for diseased and healthy plants were compared using analysis of variance (ANOVA) in STATISTICA (version 6.0) statistical computer software. Percent data on disease incidence (proportion of symptomatic plants) were transformed before analyses using the arcsine square root transformation (Zar, 1999).

3. Results

3.1. Evidence of begomoviral infections

In both Kombissiri and Kamboinsé localities, leaf-curling symptoms were of three types. In the first type, diseased plants showed upward leaf curling whereas in the second type, the leaves were curled downwards. Lastly, the third type of symptoms was a severe leaf rolling from the margins where no upward or downward leaf curling could be clearly noticed. All three types of symptoms were observed in all okra cultivars but downward leaf curling was more frequent in accessions of the local cultivar. No symptoms that could be attributed to other okra diseases were obvious. In PCR tests, fragments of approximately 700 bp were successfully amplified from all symptomatic samples collected (see materials and methods), regardless of the type of symptoms. No fragment could be amplified from the symptomless plant samples used as negative controls. Therefore, the results indicated that begomoviral infections were responsible for the leaf curling or leaf rolling symptoms in okra plants. Moreover, in preliminary experiments on the identity of infecting begomoviruses, more than twenty virus samples were fully sequenced and only *Cotton leaf curl Gezira virus* (CLCuGV) was found.

3.2. Incidence of okra leaf curl disease

The two-way ANOVA indicated a very highly significant cultivar effect of OLCD incidence in both localities ($F_{7,32} = 680.7$, $df = 7$, $P < 0.0001$; Table 1, Fig. 1). By contrast, there was no effect of locality ($F_{1,32} = 0.5$, $df = 1$, $P = 0.49$) or cultivar × locality interaction ($F_{7,32} = 1.5$, $df = 1$, $P = 0.21$), indicating that disease incidence was consistent between years. There was a clear split between accessions of the local okra cultivar 'Man yanga' and the commercial cultivars ($F_{7,32} = 680.7$; $P < 0.0001$). Disease incidence

Table 1
Average okra leaf curl disease incidence (%) at Kombissiri and Kamboinsé.

Okra cultivar	Locality			
	Kombissiri		Kamboinsé	
	%	Arcsin (%)	%	Arcsin (%)
MY1	71.8	58.0	69.1	56.2
MY2	68.5	55.9	72.6	58.5
MY3	70.9	57.4	69.9	56.8
MY4	69.1	56.2	71.3	57.6
Indiana	8.7	17.1	11.3	19.6
Clemson spineless	12.1	20.4	10.7	19.0
Lima	13.7	21.7	15.3	23.0
Volta	16.2	23.7	14.6	22.5
FPROB (P)	<0.0001		<0.0001	
SED (32 df)	1.60		1.36	

Please cite this article in press as: Tiendrébogo, et al., Impact of okra leaf curl disease on morphology and yield of okra, Crop Protection (2010), doi:10.1016/j.cropro.2010.02.007

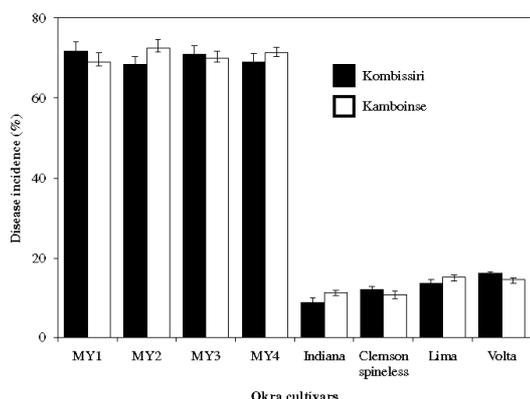


Fig. 1. Okra leaf curl disease incidence in 2007 at Kombissiri and in 2008 at Kamboinsé. Bars represent the standard error of the means. Standard errors of the difference of means (SED) = 1.05, $df = 32$.

was high in the local cultivar (up to 70% on average) but it was less than 20% in all of the commercial cultivars. Accessions of the local cultivar did not differ from each other. Similarly, disease incidence did not differ significantly between most commercial cultivars. However, a lower incidence was recorded at Kombissiri in cultivar Indiana (8.7%) compared to Volta (16.2%).

3.3. Effect of disease on plant height

Comparisons between healthy and diseased plants of the local cultivar indicated very highly significant growth reduction for all four accessions (MY1: $F_{1,48} = 217.4$, $P = 0.001$; MY2: $F_{1,38} = 213.8$, $P = 0.001$; MY3: $F_{1,42} = 115.6$, $P < 0.001$; MY4: $F_{1,38} = 340.9$, $P < 0.001$; Fig. 2). On average, diseased plants of MY1, MY2, MY3 and MY4 showed 66.3%, 71.4%, 62.0% and 32.4% growth reduction, respectively. The growth of diseased plants of all commercial cultivars was also affected in a very highly significant way (Indiana: $F_{1,38} = 40.4$, $P < 0.001$; Clemson spineless: $F_{1,38} = 143.4$, $P < 0.001$; Lima: $F_{1,38} = 35.5$, $P < 0.001$; Volta: $F_{1,38} = 56.6$, $P < 0.001$). The decrease in plant height averaged 29.4%, 52.2%, 36.8% and 39.8%,

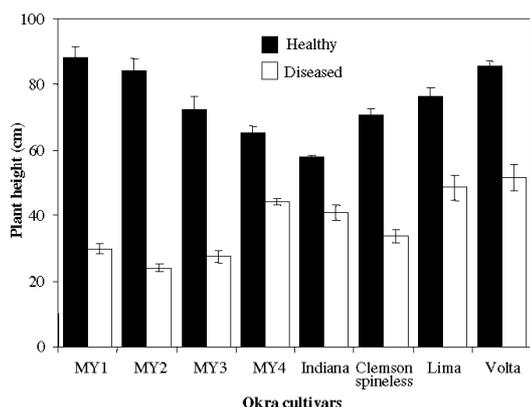


Fig. 2. Plant height reduction in okra leaf curl diseased plants of local and commercial okra cultivars. MY1, MY2, MY3 and MY4 are accessions of the local cultivar 'Man Yanga'. SED = 1.33, $df = 318$.

respectively for cultivars Indiana, Clemson spineless, Lima and Volta. Consequently, growth reductions were generally lesser in commercial cultivars than in the accessions of the local cultivar. Among non-commercial cultivars, plants of the accession MY4 showed the smallest growth reduction.

3.4. Decrease in the number of fruits

Fig. 3 illustrates the effect of OLCD on the number of marketable fruits. The number of fruits produced per diseased plant decreased significantly in all four accessions of the local cultivar: MY1 ($F_{1,48} = 39.4$, $P < 0.001$), MY2 ($F_{1,38} = 16.2$, $P = 0.0003$), MY3 ($F_{1,42} = 7.0$, $P = 0.011$) and MY4 ($F_{1,38} = 6.3$, $P < 0.017$). The reduction in the number of fruit averaged 36.3% over the four local accessions. MY1 (50.5% reduction) and MY2 (40%) were the worst affected. MY3 and MY4 performed better and showed less than 30% reduction. Commercial okra cultivars showed an overall greater reduction (50.1%) in the number of fruit number, compared to local accessions. Diseased plants produced significantly fewer fruits in Indiana ($F_{1,38} = 32.9$, $P < 0.0001$), Clemson spineless ($F_{1,38} = 40.7$, $P = 0.0$), Lima ($F_{1,38} = 22.5$, $P = 0.00003$) and Volta ($F_{1,38} = 24.9$, $P < 0.0001$). Clemson spineless produced the lowest number of fruits (60.7% reduction) whereas the best performance (41.4% reduction) was recorded with Volta. Both Indiana and Lima cultivars lost half of the fruits due to the impact of the disease.

3.5. Effect of disease on fruit quality

As shown in Fig. 4, data of three fruit quality parameters (length, diameter and weight) indicated lower performance of diseased plants regardless of the cultivar or the parameter. Fruit length particularly decreased in cultivar Clemson spineless ($F_{1,81} = 86.1$, $P < 0.0001$) by up to 64% (Fig. 4a). The reduction in fruit length was more moderate but very highly significant in MY4 ($F_{1,86} = 81.1$, $P < 0.0001$), Indiana ($F_{1,95} = 128.3$, $P < 0.001$), MY1 ($F_{1,144} = 141.6$, $P < 0.001$) and MY2 ($F_{1,83} = 42.7$, $P < 0.0001$). Diseased plants of these cultivars produced fruits that were shorter by 47.8%, 46%, 40.5% and 32.6%, respectively, compared to fruits of healthy plants. The lowest, yet significant reductions in fruit lengths were recorded with cultivars MY3 ($F_{1,101} = 38.0$, $P < 0.0001$), Volta ($F_{1,81} = 27.8$, $P < 0.001$) and Lima ($F_{1,107} = 8.3$, $P = 0.005$).

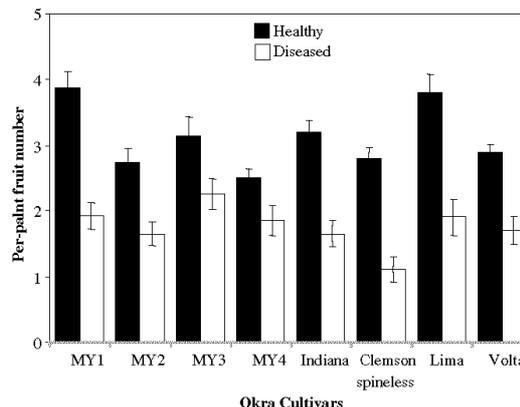


Fig. 3. Effect of okra leaf-curl disease on the number of marketable fruits produced by local and commercial okra cultivars. MY1, MY2, MY3 and MY4 are accessions of the local cultivar 'Man Yanga'. SED = 0.11, $df = 318$.

Please cite this article in press as: Tiendrébéogo, et al., Impact of okra leaf curl disease on morphology and yield of okra, Crop Protection (2010), doi:10.1016/j.cropro.2010.02.007

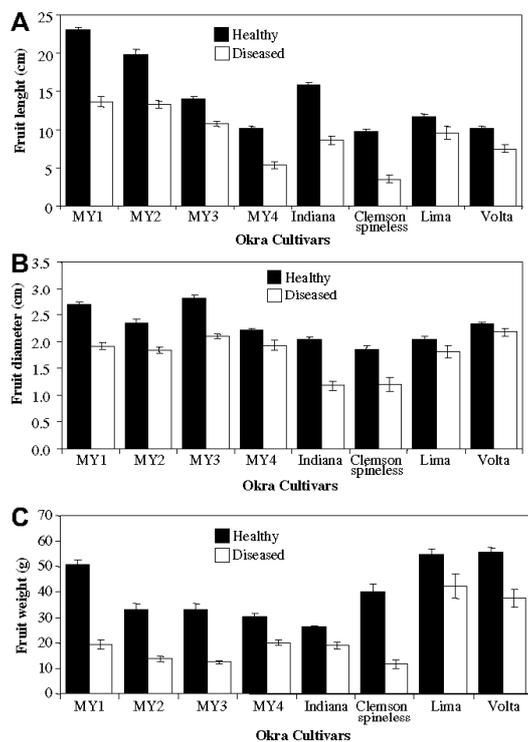


Fig. 4. Effect of okra leaf curl disease on three yield-contributing parameters in local and commercial okra cultivars. A: Fruit length, SED = 0.25, df = 778; B: Fruit diameter, SED = 0.03, df = 762; C: Average fruit weight, SED = 1.10, df = 751. MY1, MY2, MY3 and MY4 are accessions of the local cultivar 'Man Yanga'.

In all cultivars, diseased plants produced thinner fruits (Fig. 4b). Analyses of the reduction in fruit diameter yielded statistics of $F_{1,83} = 26.0$, $F_{1,101} = 84.4$, $F_{1,95} = 89.5$, and $F_{1,81} = 23.0$, respectively for cultivars MY2, MY3, Indiana and Clemson spineless ($P < 0.00001$). Less significant decrease in fruit diameter were recorded in MY1 ($F_{1,131} = 108.4$, $P = 0.001$), MY4 ($F_{1,83} = 8.2$, $P = 0.005$), Lima ($F_{1,107} = 5.7$, $P = 0.02$) and Volta ($F_{1,81} = 5.3$, $P = 0.024$). Accordingly, the lowest reduction occurred in Volta fruits (6.4%) whereas the highest was recorded in fruits of Indiana (42.2%).

As expected, reduction in both fruit length and diameter was reflected in fruit weight (Fig. 4c). Accordingly per-fruit weight loss was very highly significant ($P \leq 0.001$) for all cultivars: MY1 ($F_{1,131} = 147.0$), MY2 ($F_{1,83} = 53.5$), MY3 ($F_{1,101} = 105.4$), MY4 ($F_{1,79} = 30.6$), Indiana ($F_{1,95} = 27.5$), Clemson spineless ($F_{1,74} = 49.4$), Lima ($F_{1,107} = 6.4$) and Volta ($F_{1,81} = 22.7$). Indeed the decrease in fruit weight reached 70% in Clemson spineless, 60% in most accessions of the local okra cultivar but was much lower (<30%) in Indiana and Lima.

3.6. Estimation of yield losses

Per-plant yield was very significantly lower for diseased plants in all okra cultivars (Fig. 5): MY1 ($F_{1,46} = 100.0$, $P < 0.0001$), MY2 ($F_{1,35} = 71.7$, $P < 0.0001$), MY3 ($F_{1,38} = 64.1$, $P < 0.0001$), MY4 ($F_{1,34} = 21.1$, $P < 0.0001$), Indiana ($F_{1,30} = 16.0$, $P = 0.0004$), Clemson spineless ($F_{1,28} = 27.7$, $P < 0.0001$), Lima ($F_{1,30} = 5.8$,

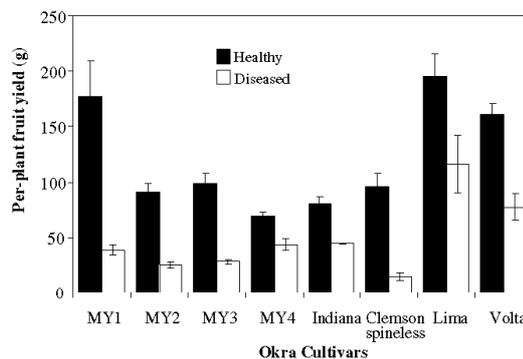


Fig. 5. Per-plant yield of healthy and okra leaf curl diseased plants of local and commercial okra cultivars. MY1, MY2, MY3 and MY4 are accessions of the local cultivar 'Man Yanga'. SED = 5.25, df = 271.

$P = 0.02$) and Volta ($F_{1,30} = 28.3$, $P < 0.0001$). Three accessions (MY1, MY2 and MY3) of the local cultivar suffered from per-plant yield losses between 70% and 80%. By contrast, per-plant yield loss in MY4 was only 37.2%. In commercial okra cultivars, the highest per-plant yield loss was recorded in Clemson spineless (84.4%). Yield losses in other commercial cultivars were nevertheless quite high (between 40% and 51%) but much lower than in Clemson spineless. Altogether, these data underlined the high potential of OLCD to reduced okra yields. By taking disease incidence in the different plots into account, the overall OLCD-associated yield losses were estimated at 4.1 t/ha, 1.97 t/ha, 2.07 t/ha and 0.8 t/ha, respectively for MY1, MY2, MY3 and MY4. Thus, the respective reductions in total crop produced were 55%, 51.3%, 50.2% and 26.1%. Due to low disease incidence, significantly lower yield losses per hectare were recorded in the commercial cultivars Indiana (0.15 t/ha), Clemson spineless (0.4 t/ha), Lima (0.5 t/ha) and Volta (0.53 t/ha). In these cultivars yields were reduced by 4.4%, 9.62%, 5.9% and 7.96%, respectively.

4. Discussion

Serological methods including the well-known enzyme-linked immunosorbent assay have been widely used in plant virus diagnosis (Bar-Joseph and Garnsey, 1981). These methods are still useful tools but they are not suitable for the diagnosis of some viruses. Begomoviruses are such of an example because of difficulties in preparing high-titre antisera which in addition often lack sufficient specificity (Wyatt and Brown, 1996). Our study has developed a PCR diagnostic tool capable of detecting both CLCuGV and OYCrV involved in OLCD in Africa. PCR was successfully applied for begomoviral detection in okra field samples showing different types of leaf curling symptoms.

In this study, yield and yield-contributing parameters decreased dramatically in diseased plants of all okra cultivars. Although the effect of the disease was even worse in diseased plants of some commercial cultivars than in the accessions of the local cultivar, disease incidence was particularly lower in commercial okra cultivars which therefore showed some resistance to infection. In screening tests for resistance to OLCD, only horizontal resistance was found in a few okra cultivars while most cultivars were susceptible to the disease (Atiri and Fayoyin, 1989; Rakesh et al., 2006). Consequently, it is unlikely that the lower disease incidence observed in the commercial cultivars resulted from plant resistance to virus infection *per se*. Possibly, the lower disease incidence could

be related to plant resistance to the whitefly vector *Bemisia tabaci*. Such resistance was reported in cotton by several authors (Bellotti and Arias, 2001; Walker and Natwick, 2006; Jindala et al., 2007).

Significant differences in plant height reduction or in the decrease of some yield-contributing parameters were found between the four accessions of the local 'Man Yanga' okra cultivar. Differences in plant height between accessions were also apparent in healthy plants (Fig. 2). Since these accessions were obtained from different farmers, one or more of them could actually represent misspelled cultivars distinct from 'Man Yanga'. The presence of genetic diversity within the local cultivar(s) and a different behaviour against OLCF opens the opportunity to search for resistance to the virus and or the vector in a varietal improvement program.

Assessment of the overall yield loss in marketable fruits allowed okra cultivars to be arranged into two groups. Accessions of the local cultivar suffered from high yield losses (between 26.12% and 55%). By contrast, all commercial cultivars performed quite well, as yield losses were below 10%. The average local market rate for okra was estimated at 5 USD/kg (Sawadogo et al., 2006). Therefore, the economic losses per hectare from which the local okra cultivars suffered due to OLCF were evaluated at 20,443 USD (MY1), 9854 USD (MY2), 10,380 USD (MY3) and 3814 USD (MY4). Economic losses per hectare in commercial okra cultivars were 737 USD, 1949 USD, 2411 USD and 2698 USD, respectively for cultivars Indiana, Clemson spineless, Lima and Volta. Although disease severity was not taken into account for yield loss assessment in this study, the data on economic losses confirmed the importance of OLCF for okra production. They also provide more meaningful appraisal of crop damage than disease incidence assessment alone. Altogether, our study confirms the necessity of the establishment of urgent control measures against this disease in Africa and the need to take this disease into account in breeding programmes.

Acknowledgments

This study was supported by the following institutions: International Foundation for Science (IFS) fellowship N° C/4472-1 to F. Tiendrébéogo, Aires-Sud, a programme from the French Ministry of Foreign and European Affairs implemented by the Institut de Recherche pour le Développement (IRD-DSF), CRSBAN/UFR-SVT (University of Ouagadougou), CIRAD and the Conseil Régional de La Réunion. The technical assistance of Mr Zerbo Doumacé is gratefully appreciated. FT completed this research as part of his PhD Degree.

References

Alegbejo, M., Ogunlana, M., Banwo, O., 2008. Survey for incidence of Okra mosaic virus in northern Nigeria and evidence for its transmission by beetles. *Span. J. Agric. Res.* 6, 408–411.

Atiri, G.I., Fayoyin, G.A., 1989. Horizontal resistance to okra leaf curl virus in okra germplasm. *Ann. Appl. Biol.* 114, 152–153.

Bar-Joseph, M., Garnsey, S.M., 1981. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): principles and applications for diagnosis of plant viruses. In: Maramorosch, K., Harris, K.F. (Eds.), *Plant Diseases and Vectors: Ecology and Epidemiology*. Academic Press, New York, pp. 35–59.

Bellotti, A.C., Arias, B., 2001. Host plant resistance to whiteflies with emphasis on cassava as a case study. *Crop Prot.* 20, 813–823.

Bigarré, L., Chazly, M., Salah, M., Ibrahim, M., Padidam, M., Nicole, M., Peterschmitt, M., Fauquet, C., Thouvenel, J.C., 2001. Characterization of a new begomovirus from Egypt infecting hollyhock (*Althea rosea*). *Eur. J. Plant Pathol.* 107, 701–711.

Brunt, A., Crabtree, K., Dallwitz, M., Gibbs, A., Watson, L., 1996. *Viruses of Plants: Descriptions and Lists from the VIDE Database*. CAB International, Wallingford, UK.

Brunt, A., Crabtree, K., Gibbs, A., 1990. *Viruses of Tropical Plants*. CAB International, Wallingford, UK.

Fauquet, C., Thouvenel, J.C., 1987. *Plant Viral Diseases in the Ivory Coast*. Editions de l'ORSTOM, Paris, France.

Fauquet, C.M., Stanley, J., 2003. Geminivirus classification and nomenclature: progress and problems. *Ann. Appl. Biol.* 142, 165–189.

Harrison, B.D., Robinson, D.J., 1999. Natural genomic and antigenic variation in whitefly transmitted geminiviruses (begomoviruses). *Annu. Rev. Phytopathol.* 37, 369–398.

Idris, A.M., Hussein, M.H., Abdel-Salam, A.M., Brown, J.K., 2002. Phylogenetic relationships for okra leaf curl- and hollyhock leaf crumple-associated begomoviruses and first report of associated satellite DNAs. *Arab J. Biotechnol.* 5, 67–82.

Idris, A.M., Brown, J.K., 2002. Molecular analysis of cotton leaf curl virus-Sudan reveals an evolutionary history of recombination. *Virus Genes* 24, 249–256.

Jindala, V., Dhaliwala, G.S., Dhawana, A.K., 2007. Mechanisms of resistance in cotton to whitefly *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae): antibiosis. *Int. J. Trop. Insect Sci.* 27, 216–222.

Kon, T., Rojas, M.R., Abdourhamane, I.K., Gilbertson, R.L., 2009. Roles and interactions of begomoviruses and satellite DNAs associated with okra leaf curl disease in Mali, west Africa. *J. Gen. Virol.* 90, 1001–1013.

Konaté, G., Barro, N., Fargette, D., Swanson, M.M., Harrison, B.D., 1995. Occurrence of whitefly-transmitted geminiviruses in crops in Burkina Faso, and their serological detection and differentiation. *Ann. Appl. Biol.* 126, 121–129.

N'Guessan, K.P., Fargette, D., Fauquet, C., Thouvenel, J.C., 1992. Aspects of the epidemiology of okra leaf curl virus in Côte d'Ivoire. *Trop. Pest Manag.* 38, 122–126.

Otoidobiga, L.C., Vincent, C., Stewart, R.K., 2003. Susceptibility of field populations of adult *Bemisia tabaci* Gennadius (Homoptera: Aleyrodidae) and *Eretmocerus* sp. (Hymenoptera: Aphelinidae) to cotton insecticides in Burkina Faso (West Africa). *Pest Manag. Sci.* 59, 97–106.

Rakesh, M., Poonam, D., Vinod, B., 2006. Evaluation of okra varieties against viral diseases. *Indian J. Virol.* 17, 109–161.

Sawadogo, M., Zombre, G., Balma, D., 2006. Behaviour of different ecotypes of okra (*Abelmoschus esculentus* L.) under water deficit during budding and flowering phases. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 10, 43–54.

Shih, S.L., Green, S.K., Tsai, W.S., Lee, L.M., Levesseur, V., 2007. First report of a distinct begomovirus associated with okra yellow crinkle disease in Mali. *Plant Pathol.* 56, 718.

Shih, S.L., Kumar, S., Tsai, W.S., Lee, L.M., Green, S.K., 2009. Complete nucleotide sequences of okra isolates of cotton leaf curl Gezira virus and their associated DNA-β from Niger. *Arch. Virol.* 154, 369–372.

Swanson, M.M., Harrison, B.D., 1993. Serological relationships and epitope profiles of isolates of okra leaf curl geminivirus from Africa and the Middle-East. *Biochimie* 75, 707–711.

Walker, G.P., Natwick, E.T., 2006. Resistance to silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii* (Hem., Aleyrodidae), in *Gossypium thurberi*, a wild cotton species. *J. Appl. Entomol.* 130, 429–436.

Wyatt, S.D., Brown, J.K., 1996. Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. *Phytopathology* 86, 1288–1293.

Zar, J.H., 1999. *Biostatistical Analysis*, fourth ed. Prentice Hall, New Jersey.

**Caractérisation des *Begomovirus* infectant le
manioc (*Manihot esculenta* Crantz) au
Burkina Faso**

1. Introduction

Les travaux antérieurs menés pour la caractérisation des virus des plantes maraîchères avaient signalé que la présence de la mosaïque jaune sur le manioc était causé par le virus de la mosaïque africaine du manioc ou "*African cassava mosaic virus*" (ACMV) (Barro, 1994; Konaté *et al.*, 1995).

Les investigations menées sur les aspects moléculaires du virus responsable de cette mosaïque du manioc ont permis de confirmer la présence de l'ACMV et l'étonnante découverte de l'existence d'une nouvelle espèce l'*East African cassava mosaic virus-Uganda* (EACMV-UG). En effet, les analyses moléculaires en vue de l'établissement de la taxonomie définitive du virus ont conduit au clonage et au séquençage de l'ADN-A provenant de deux échantillons de manioc malade. Une des séquences (EMBL-Genbank-DDBJ Accession N° FM877473) a présenté une identité de séquence nucléotidique de plus de 97% avec ACMV-[Ivory Coast:1999] (AF259894) et ACMV-[Nigeria:Ogoroco:1990] (AJ427910). La seconde séquence (FM877474) a présenté plus de 98% d'identité nucléotidique avec l'EACMV-UG[Uganda:Severe 2:1997] (AF126806). La reconstruction phylogénétique a été faite en utilisant les isolats du Burkina Faso et tous les *Begomovirus* associés à la mosaïque du manioc en Afrique ou CMGs (Cassava Mosaic Geminiviruses). Cela a permis de générer un arbre phylogénétique qui montre bien l'appartenance de l'isolat ACMV-[BF:Kam:08] (FM877473) au groupe de l'ACMV et l'isolat EACMV-UG[BF:Kou:08] (FM877474) au groupe de l'EACMV-UG.

Les résultats de ces expériences ont montré que les deux espèces ACMV et EACMV-UG sont bien présentes au Burkina Faso. Cela suggère un potentiel risque d'émergence d'une pandémie sévère de la mosaïque africaine du manioc comme en Afrique de l'Est. A notre connaissance, c'est la première fois que le variant Ougandais de l'EACMV est signalé en Afrique de l'Ouest d'où la publication des résultats sous forme de "New disease report" dans la revue *Plant Pathology*.

2. Article 6: Occurrence of *East African cassava mosaic virus-Uganda* (EACMV-UG) in Burkina Faso. [*Plant Pathology* 58: 783, 2009].

Occurrence of East African cassava mosaic virus-Uganda (EACMV-UG) in Burkina Faso

F. Tiendrébéogo^{a,b}, P. Lefeuvre^b, M. Hoareau^b, V. S. E. Traoré^c, N. Barro^a, B. Reynaud^b, A. S. Traoré^a, G. Konaté^c, O. Traoré^c and J.-M. Lett^{b*}

^aLaboratoire de Biochimie & Biologie Moléculaire, CRSBAN/UFR/SVT, Université de Ouagadougou 03 BP 7131 Ouagadougou 03, Burkina Faso; ^bCIRAD, UMR 53 PVBM CIRAD-Université de la Réunion, Pôle de Protection des Plantes, 7 Chemin de l'IRAT, 97410 Saint Pierre, La Réunion, France; and ^cInstitut de l'Environnement et de Recherches Agricoles (INERA), 01 BP 476 Ouagadougou 01, Burkina Faso

Cassava (*Manihot esculenta*) is a major staple food crop cultivated throughout Africa, and is affected most severely by cassava mosaic disease (CMD) occurring at high incidence throughout the continent. CMD is caused by cassava mosaic geminiviruses (CMGs) belonging to the genus *Begomovirus* (family *Geminiviridae*). The complex of CMGs include seven African species; the three main species are: *African cassava mosaic virus* (ACMV), *East African cassava mosaic virus* (EACMV) and *South African cassava mosaic virus* (SACMV) (Bull *et al.*, 2006). In Uganda, an extremely severe epidemic of CMD has developed since the 1990s and has progressed since then in Uganda's neighbouring countries and Central Africa. The severe CMD phenotype is caused by the synergistic interaction between ACMV and a distinct recombinant strain EACMV-UG, commonly known as the Uganda variant. CMD is reported to be widespread in Burkina Faso (Konaté *et al.*, 1995), but the molecular features of the causal agent have never been investigated.

In August/September 2008, leaves were collected from cultivars of local cassava presenting moderate to severe CMD symptoms from the central region around Ouagadougou. Ten leaf samples were tested and found to be positive for the presence of begomoviruses by PCR, using degenerate primers VD360 and CD1266 (Delatte *et al.*, 2005). For two of these samples, complete DNA-A genomes were cloned using the Phi29 DNA polymerase-based rolling circle amplification strategy (Inoue-Nagata *et al.*, 2004) and sequenced by Macrogen Inc. (Korea). One sequence (EMBL-GenBank-DBJ Accession No. FM877473) showed 97% highest nucleotide identity with ACMV-[Ivory Coast:1999] (AF259894) and ACMV-[Nigeria:Ogoroco:1990] (AJ427910). The second sequence (FM877474) showed 98% nucleotide identity with EACMV-UG [Uganda:Severe2:1997] (AF126806).

This is the first report of the Uganda variant in West Africa. These results show that both species ACMV and EACMV-UG affect cassava plantings in Burkina Faso, and suggest a potential risk of the occurrence of a severe epidemic of CMD as in East Africa.

Acknowledgements

This research was funded by the following institutions: CRSBAN/UFR-SVT (University of Ouagadougou), INERA (CNRST, Burkina Faso), Conseil Régional de La Réunion, CIRAD, European Union (FEDER) and GIS Centre de recherche et de veille sanitaire sur les maladies émergentes dans l'Océan Indien (N°PRAO/AIRD/CRV01/08/03).

References

- Bull SE, Briddon RW, Sserubombwe WS, Ngugi K, Markham PG, Stanley J, 2006. Genetic diversity and phylogeography of cassava mosaic viruses in Kenya. *Journal of General Virology* 87, 3053–65.
- Delatte H, Martin DP, Naz F *et al.*, 2005. South West Indian Ocean islands tomato begomovirus populations represent a new major monopartite begomovirus group. *Journal of General Virology* 86, 1533–42.
- Inoue-Nagata AK, Albuquerque LC, Rocha WB, Nagata T, 2004. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage ϕ 29 DNA polymerase. *Journal of Virological Methods* 116, 209–11.
- Konaté G, Barro N, Fargette D, Swanson MM, Harrison BD, 1995. Occurrence of whitefly-transmitted geminiviruses in crops in Burkina Faso and their serological detection and differentiation. *Annals of Applied Biology* 126, 121–9.

*E-mail: lett@cirad.fr. Accepted 25 March 2009 at www.bspp.org.uk/ndr where figures relating to this paper can be viewed.



Figure 1: symptoms observed on cassava infected by EACMV-UG in Koubri, Burkina Faso

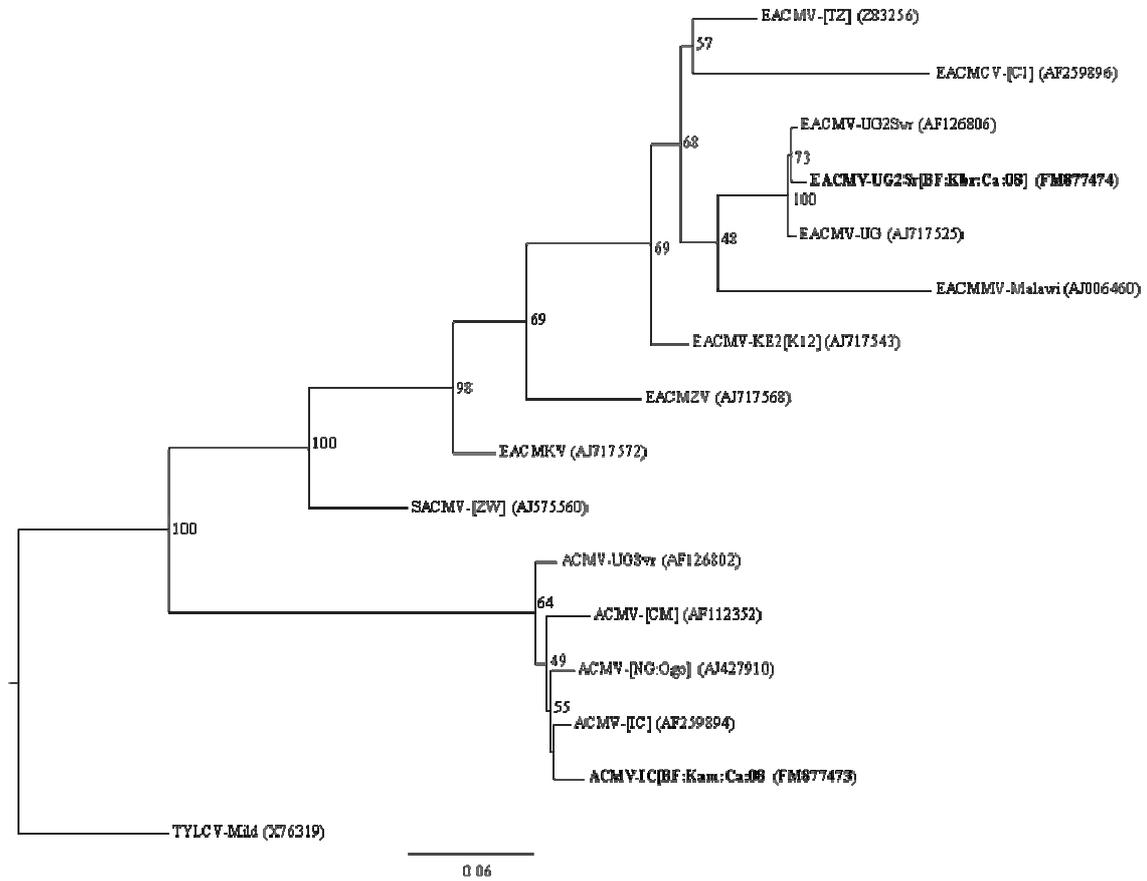


Figure 2: Maximum likelihood tree based on the complete DNA-A sequences of isolates of the *African cassava mosaic virus-IC* and *East African cassava mosaic virus-UG* reported here (in bold), plus additional sequences from African CMGs and an outgroup monopartite begomovirus (TYLC-Mild). Sequences were aligned using ClustalW alignment tool implemented in MEGA4 and the tree constructed with PHYML. The tree Numbers associated with the nodes indicate the percentage support (1000 bootstrap replicates). The database accession numbers are indicated in parentheses.

**Identification de quelques plantes sauvages
hôtes de *Begomovirus* au Burkina Faso**

1. Introduction

En vue de mieux comprendre l'épidémiologie des *Begomovirus*, des investigations ont été menées sur les mauvaises herbes. Ces investigations ont permis la caractérisation de l'ACMV sur l'espèce sauvage du manioc (*Manihot glaziovii*) et l'identification de *Begomovirus* sur *Sida acuta*, *Ageratum conyzoides* et sur la plante ornementale *Erythrina indica* var *picta*.

En effet, des symptômes de mosaïque jaune ont été observés sur les feuilles de *Manihot glaziovii*. Les analyses moléculaires ont permis d'obtenir une séquence complète d'ADN-A de 2782 bp (Inoue-Nagata *et al.*, 2004; Delatte *et al.*, 2005). Cette séquence avec 96,84% d'identité nucléotidique avec l'ACMV-[BF:Kam:08] (FM877473) suggère que *Manihot glaziovii* est infecté par l'ACMV.

Aussi, l'utilisation du test immunoenzymatique ELISA a permis de mettre en évidence la présence de *Begomovirus* dans des échantillons de *Sida acuta*, *Ageratum conyzoides* et *Erythrina indica* var *picta*. Cette présence a été par la suite confirmée par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) (Delatte *et al.*, 2005). *Sida acuta* est connu en Afrique comme hôte du CLCuGV (Fauquet *et al.*, 2008). Cette herbe est très résistante à la sécheresse et pourrait bien maintenir le virus pendant la saison sèche en attendant les cultures de gombo en saison pluvieuse.

Les mauvaises herbes peuvent donc servir d'hôtes réservoirs ou alternatifs aux *Begomovirus* rencontrés sur les plantes cultivées. Les travaux se poursuivent alors pour la recherche des espèces bégomovirales identifiées sur *Sida acuta*, *Ageratum conyzoides* et *Erythrina indica* var *picta*.

2. Fiches techniques proposées en annexes sur ce chapitre

Annexe 4: L'espèce sauvage du manioc (*Manihot glaziovii*) hôte de l'ACMV au Burkina Faso.

Annexe 5: Identification sérologique et moléculaire de *Begomovirus* sur deux herbes sauvages (*Sida acuta* et *Ageratum conyzoides*) et une plante ornementale (*Erythrina indica* var *picta*) au Burkina Faso.

CHAPITRE 4:
DISCUSSION GENERALE

1. Les virus infectant les plantes maraîchères au Burkina Faso: diversité et identité des espèces virales encore largement sous estimées

Nos premiers travaux de caractérisations biologique et sérologique des virus des plantes maraîchères ont permis de relier les symptômes observés à cinq groupes de virus (*Tymovirus*, *Potyvirus*, *Tobamovirus*, *Potexvirus* et *Begomovirus*) et à un viroïde (Barro *et al.*, 2007). Ces groupes sévissent dans les zones de productions maraîchères à travers tout le pays avec une forte présence dans la région du Sud-Ouest où les conditions climatiques sont assez favorables. Les incidences des maladies rencontrées sont souvent très élevées, plus de 80% et sont similaires à celles observées pour les mêmes viroses en Ouganda et en Tanzanie (Nono-Womdim *et al.*, 1996; Ndunguru et Rajabu, 2004; Ssekyewa, 2006).

Les espèces virales associées à ces groupes ont été décrites sur la base des symptômes observés, la détection sérologique par l'utilisation du test ELISA (Van Regenmortel et Burckard, 1980) et les tests biologiques de transmission pour certains. Les symptômes observés sur les plantes constituent souvent de bons indicateurs pour suspecter les différents groupes de virus. En effet, les symptômes de mosaïque, de jaunissement, d'enroulement foliaire, d'épaississement et de sinuosités nervaires observées sont imputables aux *Begomovirus* (Barro, 1994; Harrison et Robinson, 1999). Ces symptômes se distinguent nettement de ceux causés par d'autres virus comme les *Tymovirus* et les *Potyvirus* sur les mêmes espèces végétales (Barro, 1994; Barro et Konaté, 1994; Konaté et Traoré, 1999). Pour la confirmation des infections, le diagnostic sérologique reste efficace au regard du pouvoir immunogène de la plupart des virus des plantes (Van Regenmortel et Burckard, 1980; Konaté *et al.*, 1995; Swanson *et al.*, 1998, Konaté et Traoré, 1999; Wang *et al.*, 2004; Tiendrébéogo, 2006). Il permet sans ambiguïté de relier une infection virale à un groupe de virus (genre) donné.

Parmi les virus détectés sur les cultures maraîchères, ceux appartenant au groupe des *Begomovirus* (50%) sont les plus nombreux (Tiendrébéogo, 2006; Barro *et al.*, 2007). Plusieurs *Begomovirus* ont d'ailleurs été signalés comme nuisibles pour les cultures dans différentes régions à travers le monde (Jones,

2003). Dans ce groupe, les relations sérologiques existantes entre les espèces sont très fortes; il est donc très difficile de distinguer les espèces virales par l'utilisation des anticorps monoclonaux (Brown *et al.*, 2001). Néanmoins, ces données sérologiques contribuent énormément à la taxonomie provisoire dans ce groupe des *Begomovirus* (Fauquet *et al.*, 2008). En effet, le comité international de taxonomie virale (CITV) préconise qu'en plus de la caractérisation moléculaire du gène gouvernant la synthèse de la protéine de capsid (CP), il faut une exploration des propriétés sérologiques pour définir une espèce bégomovirale (Fauquet *et al.*, 2008). Ainsi, la taxonomie virale prend en compte, les données biologique, sérologique et moléculaire.

A côté de ce groupe important, des espèces virales des groupes de *Tymovirus*, *Potyvirus*, *Tobamovirus* et *Potexvirus* ont été identifiées sur les espèces maraîchères sur l'ensemble des sites maraîchers du Burkina Faso. Ces données nous suggèrent que ces groupes de virus sont bien présents au Burkina Faso, et semblent très bien adaptés par leur présence continue (Barro, 1994). Il apparaît donc clairement que ces virus phytopathogènes constituent une menace pour la production agricole. Thottappilly (1992) avait déjà signalé cette situation en faisant le point sur les virus menaçant la production agricole en Afrique.

2. Les *Begomovirus* du Burkina Faso et leur organisation génomique

En vue de mieux connaître les virus infectant les plantes maraîchères au Burkina Faso, nous nous sommes intéressés au groupe des *Begomovirus* sévissant sur les espèces cultivées. Ce groupe est le plus répandu sur les cultures maraîchères et constitue à l'heure actuelle le plus dommageable économiquement (Harrison et Robinson, 1999). Notre étude a permis d'obtenir dix (10) séquences complètes de *Tomato yellow leaf crumple virus* (ToYLCrV) sur les piments et poivrons et vingt trois (23) séquences de *Cotton leaf curl Gezira virus* (CLCuGV) sur le gombo. La recherche des ADN satellites a permis d'obtenir avec succès sept (7) séquences d'ADN Beta et quatre (4) séquences d'ADN-1 (ADN alpha) associés au CLCuGV. Ces données montrent la diversité génétique et l'organisation génomique dans ce groupe. L'obtention de ces séquences a été facilitée par l'avènement de la polymérase *phi29* du phage *phi29* de *Bacillus subtilis* pour l'amplification de l'ADN circulaire des *Begomovirus* (Inoue-Nagata *et*

al., 2004), associée à la baisse des coûts du séquençage (Lefeuvre, 2008). Le génome complet permet d'établir la taxonomie définitive des *Begomovirus* (Fauquet *et al.*, 2008). Ces deux virus (ToYLCrV et CLCuGV) sont des *Begomovirus* monopartites avec des organisations génomiques conformes à l'organisation des *Begomovirus* monopartites africains (Rojas *et al.*, 2005). En effet, ces *Begomovirus* contrairement à ceux du nouveau monde comportent tous six gènes (V1, V2, C1, C2, C3, C4). Les gènes V1 et V2 sont situés sur le brin viral et les gènes C1, C2, C3, C4 sur le brin complémentaire.

Les symptômes de jaunissement des nervures ont été observés sur les piments au début des années 2000. L'agent causal a été signalé pour la première fois au Mali sur le piment et a été nommé Pepper yellow vein Mali virus sur la base des symptômes observés sur le piment en plein champ (Zhou *et al.*, 2008; Tiendrébéogo *et al.*, 2008). Sur la base de l'infectivité du clone agroinfectieux, généré à partir du virus, Zhou *et al.* (2008) ont conclu que ce virus est plus infectieux sur *Nicotiana benthamiana* et sur la tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Glamour) que sur le piment (*Capsicum annuum* cv. Cayenne Long et cv. Carolina).

En vue de vérifier l'infectivité du virus sur les piments couramment cultivés au Burkina Faso (cvs. JBF, RBF et Yollo Wonder), le clone agroinfectieux que nous avons construit n'a pas produit de symptôme sur les piments testés. Par contre, il s'est révélé particulièrement infectieux sur *Nicotiana benthamiana* et la tomate (cv. Farmer). Nous aboutissons à la même conclusion que Zhou *et al.* (2008). En conséquence, le *Begomovirus* caractérisé sur les piments a été renommé, *Tomato yellow leaf crumple virus* (ToYLCrV) (Zhou *et al.*, 2008). Au Burkina Faso, comme l'indique nos travaux, ce virus est inféodé aux piments (Tiendrébéogo *et al.*, 2008). Cependant la vérification du postulat de Koch avec la construction du clone agroinfectieux suggère que les symptômes sévères observés sur les piments ne sont pas causés par le seul *Begomovirus* (ToYLCrV) ni par un effet variétal. Il pourrait s'agir de l'action conjuguée de plusieurs virus (*Begomovirus*, *Potyvirus*) et même de l'environnement ou des interactions avec le vecteur (*Bemisia tabaci*).

Les symptômes de repliements foliaires observés sur le gombo ont été signalés au Burkina Faso et les travaux de caractérisation sérologique ont

conduit à l'identification de l'agent causal comme étant le Okra leaf curl virus (OLCV) (Barro, 1994; Konaté *et al.*, 1995). Les travaux de caractérisation moléculaire entrepris ont permis de montrer que le virus associé à ces symptômes est le *Cotton leaf curl Gezira virus* (CLCuGV). Ce virus a été décrit pour la première fois sur le coton au Soudan (Idris et Brown, 2000). Il a été rapporté dans plusieurs pays africains (Egypte, Niger, Mali, Cameroun) sur des espèces végétales de la famille des *Malvaceae* particulièrement le gombo (*Abelmoschus esculentus*) et des plantes sauvages comme *Sida acuta* et *Sida alba* (Bigarré *et al.*, 2001; Idris *et al.*, 2005; Shih *et al.*, 2009 et Kon *et al.*, 2009). Le CLCuGV comme la plupart des *Begomovirus* monopartites de l'ancien monde est associé à des ADNs satellites simple brin circulaire appelés ADN-1 et ADN Beta (Briddon *et al.*, 2008). L'ADN-1 ou ADN alpha est similaire à la composante d'un autre groupe de virus à ADN simple brin; les *Nanovirus* (Mansoor *et al.*, 1999; Saunders et Stanley, 1999). Cependant, le rôle de l'ADN-1 dans l'infectivité et l'expression des symptômes du virus n'est pas clairement élucidé. Quant à l'ADN Beta, il est requis pour une infection efficiente de certains hôtes (Briddon *et al.*, 2001; Kon *et al.*, 2009). Au Burkina Faso, la plupart des isolats du CLCuGV caractérisés sont en association avec ces ADNs satellites. Une seule espèce d'ADN Beta a été trouvée; il s'agit du *Cotton leaf curl Guezira betasatellite* (Briddon *et al.*, 2008). Pour les ADN-1, deux espèces ont été caractérisées; une espèce déjà connue le *Cotton leaf curl Gezira alphasatellite* et une nouvelle espèce que nous avons provisoirement nommée Okra leaf curl Burkina Faso alphasatellite (OLCBFA). La maladie des repliements foliaires du gombo au Burkina Faso est vraisemblablement causée par la seule espèce de *Begomovirus* avec un complexe d'ADN Beta et d'ADN alpha contrairement aux cas du Niger et du Mali (Kon *et al.*, 2009; Shih *et al.*, 2009).

L'évènement majeur de recombinaison a été détecté sur les isolats du CLCuGV du Burkina Faso au niveau du gène C1 (Rep). Cette région avait été aussi décrite comme région se prêtant plus aux évènements de recombinaison par Lefeuvre *et al.* (2007) en travaillant sur des *Begomovirus* des îles du Sud Ouest de l'Océan indien. Cet évènement de recombinaison entre un *Begomovirus* issu d'une mauvaise herbe (*Althea rosea*) et un autre caractérisé sur une plante cultivée (tomate) relance la question des plantes non cultivées dans

l'épidémiologie des *Begomovirus*, notamment le maintien et la propagation des espèces virales. En effet, le rôle de ces plantes non cultivées est mal connu. Mais de plus en plus les mauvaises herbes et les plantes ornementales sont signalées comme hôtes de *Begomovirus* (Huang et Zhou, 2006; Guo et Zhou, 2006; Raj *et al.*, 2007). Au Burkina Faso, *Manihot glaziovii*, *Sida acuta*, *Ageratum conyzoides* et *Erythrina indica* sont des hôtes de *Begomovirus*. Toute méthode ou stratégie de lutte efficace contre les *Begomovirus* passe à l'heure actuelle par la connaissance des hôtes alternatifs et/ou réservoirs.

L'EACMV-UG Svr au cœur du Sahel: inquiétudes et questionnements

La maladie de la mosaïque du manioc est l'une des plus anciennes maladies virales décrites en Afrique (Warburg, 1894). Cette maladie est causée par plusieurs espèces de *Begomovirus*. A l'heure actuelle, six espèces sont connues, ce sont: le *African cassava mosaic virus* (ACMV), le *East African cassava mosaic virus* (EACMV), le *East African cassava mosaic Cameroon virus* (EACMCV), le *East African cassava mosaic Malawi virus* (EACMMV), le *East African cassava mosaic Zanzibar virus* (EACMZV) et le *South African cassava mosaic virus* (SACMV) (Stanley *et al.*, 2005). Ces virus causent d'énormes dégâts sur les cultures du manioc avec des pertes de récoltes très élevées.

Au Burkina Faso, la mosaïque africaine du manioc avait été signalée sur les périmètres maraîchers par Barro (1994) et Konaté *et al.* (1995). Les données sérologiques avaient permis de conclure que le virus responsable était l'ACMV (Konaté *et al.*, 1995). Les travaux récents de caractérisation moléculaire ont confirmé la présence de l'ACMV et signalé la présence du variant Ougandais de l'EACMV (EACMV-UG). L'EACMV-UG a été à l'origine de la pandémie sévère de la mosaïque du manioc survenue en Ouganda entre 1992 et 1997 avec des pertes de plus de 60 millions de dollar par an (Zhou *et al.*, 1997; Deng *et al.*, 1997; Fargette *et al.*, 2006). La description de ce variant pour la première fois en Afrique de l'Ouest et notamment dans un pays où la production du manioc n'est pas très importante soulève des questions sur l'origine et les voies de propagation de ce virus. Comment ce virus est-il apparu au Burkina Faso? Résulte-t-il de la recombinaison entre l'ACMV et EACMV sur place? Ou bien serait-il

accidentellement introduit au Burkina Faso par des personnes ayant ramené des boutures de manioc d'Afrique de l'Est?

En effet, ce virus qui a été signalé en Afrique de l'Est semblait être circonscrit à cette région (Fargette *et al.*, 2006). Le fait qu'il soit apparu au Burkina Faso en plein Sahel soulève des questions sur son origine et constitue aussi une menace pour un pays qui commence à peine à promouvoir la culture du manioc.

3. Pertes causées par les *Begomovirus* infectant le gombo

La plupart des pays africains ont un climat propice à la pratique de l'agriculture maraîchère tout au long de l'année. Cependant, la productivité demeure parmi les plus faibles au monde (Nono-Womdim, 2001). Cette faible productivité est due en partie aux ravageurs et aussi aux maladies virales. Très peu de travaux existent sur les pertes de rendement liées directement aux *Begomovirus*. Nos travaux sur les pertes causées par le CLCuGV sur le gombo ont montré que toutes les variétés testées sont affectées par la maladie. La variété locale (*Man Yanga*) est la plus répandue au centre du Burkina Faso sans doute pour son cycle de production assez court mais aussi pour le fait qu'elle est beaucoup appréciée des productrices et des consommateurs. Cette variété est cependant très affectée par la maladie au regard des incidences élevées dans les parcelles de production et la réduction drastique des paramètres (taille des plantes, nombre de fruits, longueur des fruits, poids des fruits) mesurées.

Pour les variétés commerciales (Indiana, Clemson spineless, F1 Lima et Volta), les incidences des maladies sont assez faibles par contre, les plantes malades sont sévèrement affectées par la maladie. Cela suggère que le vecteur (*Bemisia tabaci*) n'est pas bien adapté à ces variétés moins répandues. Cette forme de résistance a été décrite par plusieurs auteurs sur le coton (Bellotti et Arias, 2001; Walker et Natwick, 2006; Jindala *et al.*, 2007). Dans tous les cas, les pertes économiques moyennes sont estimées à 11100 USD (soit plus de 5 millions de FCFA) et 1950 USD (soit environ 1 million de FCFA) respectivement pour les variétés locales et commerciales. Cela confirme l'impact économique de cette maladie sur la production du gombo et la nécessité de prendre des mesures de lutte contre la maladie.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Conclusion générale et perspectives

Au terme de cette étude il apparaît que les maladies virales sévissant sur les cultures maraîchères et les plantes à tubercules sont nombreuses et variées au Burkina Faso. Ces virus appartiennent aux genres suivants: *Tymovirus*, *Potyvirus*, *Tobamovirus*, *Potexvirus* et *Begomovirus*. Parmi ces virus, les *Begomovirus* sont les plus nombreux et les plus répandus avec des incidences très élevées.

Les virus appartenant aux groupes des *Tymovirus*, *Potyvirus*, *Tobamovirus* et *Potexvirus* ont été identifiés par des tests biologiques et sérologiques (ELISA). Ces tests ont permis de relier sans ambiguïté les symptômes observés à ces groupes de virus.

Quant aux espèces de *Begomovirus*, les travaux de caractérisation ont été plus poussés. Ces travaux ont permis d'établir la taxonomie définitive de quatre *Begomovirus*, de détecter des *Begomovirus* sur deux plantes sauvages (*Sida acuta* et *Ageratum conyzoides*) et sur une plante ornementale (*Erythrina indica*).

Les quatre *Begomovirus* caractérisés sur le plan moléculaire sont le *Tomato yellow leaf crumple virus* (ToYLCrV) sur les piments et poivrons, le *Cotton leaf curl Guezira virus* (CLCuGV) sur le gombo, l'*African cassava mosaic virus* (ACMV) sur le manioc cultivé et le manioc sauvage et l'*East African cassava mosaic virus-Uganda* (EACMV-UG) sur le manioc cultivé. Les virus caractérisés constituent une contrainte pour la production maraîchère et l'agriculture au regard des incidences des maladies qu'ils causent.

L'évaluation de l'impact du CLCuGV sur la production du gombo a permis de savoir que ce virus cause des pertes sur toutes les variétés couramment cultivées. Les variétés locales sont les plus affectées avec une perte moyenne à l'hectare se chiffrant à environ 11100 dollar US soit plus de 5 millions de FCFA. Les variétés commerciales, Indiana, Clemson spineless, Lima et Volta ne sont pas épargnées par le virus. Les pertes moyennes se situent autour de 1950 dollar US à l'hectare soit environ 1 million de FCFA. Ce virus constitue un énorme danger pour la production du gombo qui entre dans l'alimentation de la plupart des habitants des villes et des campagnes.

La mosaïque africaine du manioc a été observée partout dans les périmètres maraîchers où l'on rencontre des petits champs de manioc ou quelques plants autour des champs. Sur le manioc, la présence de l'EACMV-UG, une première en Afrique de l'Ouest, constitue une menace très sérieuse pour la production massive de ce tubercule au Burkina Faso.

Les plantes sauvages serviraient d'hôtes réservoirs à partir desquels *Bemisia tabaci* pourrait propager la maladie. Cette mouche est très importante et répandue au Burkina Faso et sa polyphagie joue un rôle très important dans la propagation des *Begomovirus*.

Les infections virales rapportées dans ce travail sont incurrables. Cependant, les méthodes de lutte préventive contre ces viroses sont efficaces et peuvent permettre de réduire considérablement leur effet sur les rendements agricoles. L'appropriation de ces méthodes de lutte par les producteurs serait au profit de meilleurs rendements agricoles.

Le travail réalisé dans le cadre de cette thèse est loin d'être exhaustif. Il sera poursuivi et étendu à d'autres *Begomovirus* notamment ceux infectant les plantes fruitières et les mauvaises herbes. Des travaux pour mieux comprendre l'épidémiologie des différentes maladies virales et les pertes engendrées doivent être menés. Tous ces travaux permettront sans doute d'obtenir des informations scientifiques à l'attention des producteurs et des décideurs politiques pour une agriculture plus rentable.

REFERENCES

BIBIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Abouzid A.M., Freitas-Astua J., Purcifull D.E., Polston J.E., Beckham K.A., Crowford W.E., Petersen M.A., Peyser B., Patte B., Hiebert E. (2002).** Serological studies using polyclonal antisera prepared against the viral coat protein of four begomoviruses expressed in *Escherichia coli*. *Plant Diseases* **86**: 1109-1114.
- Accotto G.P., Navas-Castillo J., Noris E., Moriones E., Louro D. (2000).** Typing of tomato leaf curl viruses in Europe. *European Journal of Plant Pathology* **106**: 179-186.
- Adams M.J., Antoniw J.F., Bar-Joseph M., Brunt A.A., Candresse T., Foster G.D., Martelli G.P., Milne R.G., Zavriev S.K., Fauquet C.M. (2004).** The new plant virus family Flexiviridae and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Archives of Virology* **149**: 1045–1060.
- Agrios N.G. (1988).** Plant diseases caused by virus, “In”: Plant pathology, troisième édition. *Academic Press*, California, 622-695 pp.
- Antignus E.Y., Cohen S. (1994).** Complete nucleotide sequence of an infectious clone of a mild isolate of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV). *Phytopathology* **84**:707-712.
- Astier S., Albouy J., Maury Y., Lecoq H. (2001).** Principes de virologie végétale : génome, pouvoir pathogène, écologie des virus. *INRA ed.* Versailles, France 444 p.
- Attique M.R., Rafiq M., Ghaffar A., Ahmad Z., Mohyuddin A.I. (2003).** Hosts of *Bemisia tabaci* (Genn.) (Homoptera; Aleyrodidae) in cotton areas of Punjab, Pakistan. *Crop Protection* **22**: 715–720.
- Atzmon G., Van Oss H., Czosnek H. (1998).** PCR amplification of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) DNA from squashes of plants and whitefly vectors: Application to the study of TYLCV acquisition and transmission. *European Journal of Plant Pathology* **104**: 189-194.

- AVRDC (2004).** AVRDC Publication Number 07-691. Shanhua, Taiwan: AVRDC-The World Vegetable Center. 158 pp.
- Azzam O., Frazer J., De-La-Rosa D., Beaver J.S., Ahlquist P., Maxwell D.P. (1994).** Whitefly transmission and efficient ssDNA accumulation of bean golden mosaic geminivirus require functional coat protein. *Virology* **204**: 289-296.
- Barro N. (1994).** Caractérisation sérologique, biologique et aspects écologiques de quelques virus infectant les plantes maraîchères au Burkina Faso. *Thèse de doctorat de l'université de Ouagadougou*, Burkina Faso, 171p.
- Barro N., Konaté G. (1994).** Caractérisation biologique d'un isolat du virus de la mosaïque du gombo et aspects écologiques de la maladie au Burkina Faso. *Sciences et Techniques, série sciences naturelles* **21 (1)**: 6-18.
- Barro N., Konaté G. (1998).** Le virus X de la pomme de terre au Burkina Faso : Reconnaissance sérologique et biologique. *Sciences et Technique, serie sciences naturelles* **23 (1)** : 101-106.
- Barro N., Tiendrébéogo F., Traoré A.S., Konaté G. (2007).** Principales viroses des plantes maraîchères au Burkina Faso : symptômes et quelques aspects écologiques. *Annal de Botanique d'Afrique de l'Ouest* **4**:1-12.
- Beachy R.N. (1997).** Mechanisms and applications of pathogen derived resistance in transgenic plants. *Current opinion in Biotechnology* **8 (2)**: 215 – 220.
- Bellotti A.C., Arias B. (2001).** Host plant resistance to whiteflies with emphasis on cassava as a case study. *Crop Protection* **20**, 813-823.
- Bigarré L., Chazly M., Salah M., Ibrahim M., Padidam M., Nicole M., Peterschmitt M., Fauquet C., Thouvenel J.C. (2001).** Characterization of a new begomovirus from Egypt infecting hollyhock (*Althea rosea*). *European Journal of Plant Pathology* **107**: 701–711.
- Boyd R.F. (1988).** General Microbiology. Second Edition. *Times Mirror/Mosby College Publishing*. 863p

- Briddon R.W., Bedford I.D., Tsai J.H., Markham P.G. (1996).** Analysis of the nucleotide sequence of the treehopper-transmitted geminivirus, tomato pseudo-curly top virus, suggests a recombinant origin. *Virology* **219**: 387-394.
- Briddon R.W., Brown J.K., Moriones E., Stanley J., Zerbini M., Zhou X., Fauquet C.M. (2008).** Recommendations for the classification and nomenclature of the DNA- β satellites of begomoviruses. *Archives of Virology* **153**: 763–781.
- Briddon R.W., Bull S.E., Amin I., Idris A.M., Mansoor S., Bedford I.D., Dhawan P., Rishi N., Siwatch S.S., Abdel-Salam A.M., Brown J.K., Zafar Y., Markham P. G. (2003).** Diversity of DNA- β , a satellite molecule associated with some monopartite begomoviruses. *Virology* **312**: 106–121.
- Briddon R.W., Bull S.E., Mansoor S., Amin I., Markham P.G. (2002).** Universal primers for the PCR- mediated amplification of DNA-B: A molecule associated with monopartite begomoviruses. *Molecular Biology Technology* **20**: 315-318.
- Briddon R.W., Mansoor S., Bedford I.D., Pinner M.S., Saunders K., Stanley J., Zafar Y., Malik K.A., Markham P.G. (2001).** Identification of DNA component required for induction of cotton leaf curl disease. *Virology* **285**: 234-243.
- Briddon R.W., Stanley J. (2006).** Subviral agents associated with Plant single-stranded DNA viruses. *Virology* **344**: 198-210.
- Brown J.K. (1994).** The status of *Bemisia tabaci* (Genn.) as a pest and vector in world agroecosystems. *FAO Plant Protection Bulletin* **42**: 3–32.
- Brown J.K. (1997).** The Biology and Molecular Epidemiology of the *Geminiviridae* Subgroup III. pp 125 – 133, in Stacey, G. and Keen, N. T. 1997. *Plant-Microbe Interactions*. Vol. **2**. 220 pp.
- Brown J.K., Bird J. (1992).** Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and Caribbean Basin. *Plant Disease* **76**: 220–225.

- Brown J.K., Idris A.M., Torres-Jerez I., Banks G.K., Wyatt S.D. (2001).** The core region of the coat protein gene is highly useful for establishing the provisional identification and classification of begomoviruses. *Archives of virology* **146**: 1581-1598.
- Brunt A.A., Crabtree K., Gibbs A. (1990).** Viruses of tropical plants. C.A.B. International, Oxon UK, 707p.
- Bull S.E., Briddon R.W., Markham P.G. (2003).** Universal primers for the PCR-mediated amplification of DNA1: a satellite-like molecule associated with begomovirus-DNA complexes. *Molecular Biotechnology* **23**: 83–86.
- Chakraborty S., Pandel P.K., Banerjee M.K., Kalloo G., Fauquet C.M. (2003).** *Tomato leaf curl Gujarat virus*, a new begomovirus species causing a severe leaf curl disease of tomato in Varanasi, India. *Virology* **93**: 1485–1495.
- Chatenet M. (1989).** Enquêtes sur les principales viroses des cultures maraîchères au Burkina Faso, rapport de mission au Burkina Faso du 11 au 18 Avril 1989, IRAT, 9 p.
- CSLP (2004).** Cadre stratégique de lutte contre la pauvreté. Ministère de l'économie et du développement du Burkina Faso. Ouagadougou, Burkina Faso, 139p.
- De Castro A.P. (2005).** Evaluation of breeding tomato lines partially resistant to *Tomato yellow leaf curl virus* - Sardinia and *Tomato yellow leaf curl virus* derived from *Lycopersicon chilense*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **27**: 268-275.
- Delatte H. (2005).** Study of the pathosystem *Begomovirus/Bemisia tabaci*/Tomato on the south west islands of the Indian Ocean. *Ph.D thesis Wageningen university*, the Netherlands, 160p.
- Delatte H., Duyck P.F., Triboire A., David P., Becker N., Bonato O., Reynaud B. (2007).** Differential invasion success among biotypes: case of *Bemisia tabaci*. *Biological Invasions* **11**: 1059-1070.
- Delatte H., Martin D.P., Naze F., Golbach R.W., Reynaud B., Peterschmitt M., Lett J. M. (2005).** South West Indian Ocean islands tomato begomovirus

populations represent a new major monopartite begomovirus group. *Journal of General Virology* **86**: 1533–1542.

- Deng D., Otim-Nape G., Sangare A., Ogwal S., Beachy R., Fauquet C. (1997).** Presence of a new virus closely associated with cassava mosaic outbreak in Uganda. *African Journal of Root Tuber Crops* **2**: 23–28.
- Diener T.O. (1971).** Potato spindle tuber “virus” a plant virus with properties of free nucleic acid. III. Subcellular location of PSTV-RNA and the question of whether virion exist in extracts or in situ. *Virology* **43**: 75-89.
- Diener T.O., Smith D.R. (1973).** Potato spindle tuber viroid. IX. Molecular weight determination by gel electrophoresis of formylated RNA. *Virology* **53**: 359-365.
- Ditta G., Stanfield S., Corbin D., Helsinki D.R. (1980).** Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **77**, 7347–7351.
- Doyle J.J., Doyle J.L. (1987).** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* **19**: 11-15.
- Drake J.W., Charlesworth B., Charlesworth D., Crow J.F. (1998).** Rates of spontaneous mutation. *Genetics* **148**: 1667-1686.
- Dry I.B., Krake L.R., Rigden J.E., Rezaian M.A. (1997).** A novel subviral agent associated with a geminivirus: the first report of a DNA satellite. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 7088-7093.
- Duffus J.E. (1995).** Whitefly-borne viruses in *Bemisia*: In: Taxonomy, Biology, Damage, Control and Management, D. Gerling, R.T.Mayer (Eds), Intercept Ltd., UK, pp.257-258.
- Duffus J.E. (1997).** Whitefly transmission in plant viruses. In: current Topics in vector of squash leaf curl virus (SqLCV). Research, Vol.4 K.F.Harris (Ed.), Springer Verlag, New York, pp.73-91.

- Duffy S., Holmes E.C. (2008).** Phylogenetic evidence for rapid rates of molecular evolution in the single-stranded DNA begomovirus tomato yellow leaf curl virus. *Journal of Virology* **82**, 957-965.
- Duncan J. M., Torrance L. (1992).** Techniques for the Rapid Detection of Plant Pathogens. Blackwell Scientific Publications. FAO, 1989, Production Year Book, Vol. 43.
- FAO (2009).** Food and Agriculture Organisation statistic. December 2009. Rome, Italy.
- Fargette D. (1987).** Epidémiologie de la mosaïque africaine du manioc en Côte d'Ivoire. Etudes et Thèses, ORSTOM, 203p.
- Fargette D., Konaté G., Fauquet C., Muller E., Peterschmitt M., Thresh J. M. (2006).** Molecular ecology and emergence of tropical plant viruses. *Annual Review of Phytopathology* 44: 235-260.
- Fargette D., Thouvenel J.C., Fauquet C. (1987).** Virus content of cassava infected by African cassava mosaic virus. *Annals of Applied Biology* **110**: 65-73.
- Faria J.C., Gilbertson R.L., Hanson S.F., Morales F.J., Ahlquist P., Loniello A.O., Maxwell D.P. (1994).** Bean golden mosaic geminivirus type II isolate from Dominican Republic and Guatemala: nucleotide sequences infectious pseudorecombinants and phylogenetic relationships. *Phytopathology* **84**(3): 321-329.
- Fauquet C.M., Bisaro D.M., Briddon R.W., Brown J.K., Harrison B.D., Ribicki E.P., Stenger D.C., Stanley J. (2003).** Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family Geminiviridae, and an updated list of begomovirus species. *Archives of Virology* **148**: 405-421.
- Fauquet C.M., Briddon R.W., Brown J.K., Moriones E., Stanley J., Zerbini M., Zhou X. (2008).** Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Archives of Virology* **153**: 783-821.
- Fauquet C.M., Maxwell D.P., Gronenborn B., Stanley J. (2000).** Revised proposal for naming geminiviruses. *Archives of Virology* **145**: 1743-1761.

- Flores R., Randles J.W., Bar-Joseph M., Diener T.O. (1998).** A proposed scheme for viroid classification and nomenclature. *Archives of virology* **143**: 623-629.
- Francki R.B.I., Milne R.G., Hatta T. (1985).** Atlas of plant viruses 2. CRC press, Boca Raton FL. 284p.
- Garrido-Ramirez E.R., Sudarshana M.R., Gilbertson R.L. (2000).** Bean golden yellow mosaic virus from Chiapas, Mexico: Characterization, pseudorecombination with other bean-infecting geminiviruses and germplasm screening. *Phytopathology* **90**: 1224–1232.
- Ge L., Zhang J., Zhou X., Li H. (2007).** Genetic structure and population variability of Tomato Yellow Leaf Curl China Virus. *Journal of Virology* **81**: 2902-2907.
- Ghanim M., Czonesk H. (2000).** Tomato yellow leaf curl geminivirus (TYLCV-Is) is transmitted among whiteflyies (*Bemisia tabaci*) in a sex related manner. *Journal of Virology* **74**:4738-4745.
- Gibbs A.J. (1977).** Tobamovirus group. *CMI/AAB Description of plant viruses* n° 184.
- Greathead A.H. (1986).** Host plants. In: *Bemisia tabaci*-A literature Survey.M.J.W.Cock(Ed.), CAB International Institute of Biological Control, Silwood Park, Ascot, Berks., UK, pp.17-25.
- Green S.K. (1991).** Guidelines for diagnostic work in plant Virology. *AVRDC Technology Bulletin* No. 15. 63 pp.
- Guindon S., Lethiec F., Duroux P., Gascuel O. (2005).** PHYML Online-a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Research* **33**: 557-559
- Guo X., Zhou X. (2006).** Molecular characterization of a new *Begomovirus* infecting *Sida cordifolia* and its associated satellite DNA molecules. *Virus Genes* **33**: 279-285.
- Hall J.J. (1980).** Resistance at the TM - 2 loci in the tomato, to *Tomato mosaic virus*. *Euphytica* (Netherlands) **29**: 189 - 197.

- Hanley-Bowdoin L., Settlege S.B., Orozco B.M., Nagar S., Robertson D. (2000).** Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **35**: 105-140.
- Harrison B.D., Finch J.T., Gibbs A.J., Hollings M., Shepherd R.J., Valenta V., Wetter C. (1971).** Sixteen groups of plants viruses. *Virology* **45**: 353-356.
- Harrison B.D., Robinson D.J. (1999).** Natural genomic and antigenic variation in whitefly transmitted geminiviruses (begomoviruses). *Annual Review of Phytopathology* **37**:369-398.
- Harrison B.D., Robinson D.J. (2002).** Green shoots of geminivirology. *Physiology and Molecular Plant Pathology* **60**: 215-218.
- Harrison B.D., Wilson T.M.A. (1999).** Tobacco mosaic virus: Pioneering research for a century. *Phil Transact Roy Soc London B* **354**: 517-685
- Hirth L., Givord L. (1988).** *Tymovirus*. "In": The plant viruses 3: the polyhedral plant viruses. (ed. R. Koenig) Plenum press, New York, pp. 163-212.
- Huang J.F., Zhou X.P. (2006).** Molecular characterization of two distinct Begomovirus from *Ageratum conyzoides* and *Malvastrum coromandelianum* in China. *Journal of Phytopathology* **154**: 648-653.
- Idris A.M., Briddon R.W., Bull S.E., Brown J.K. (2005).** Cotton leaf curl Gezira virus-satellite DNAs represent a divergent, geographically isolated Nile Basin lineage: predictive identification of a satDNA REP-binding motif. *Virus Research* **109**: 19-32.
- Idris A.M., Brown J.K. (2000).** Identification of a new, monopartite begomovirus associated with leaf curl disease of cotton in Gezira, Sudan. *Plant Disease* **84**:809.
- Idris A.M., Hiebert E., Bird J., Brown J.K. (2003).** Two newly described begomoviruses of *Macroptilium lathyroides* and common bean. *Phytopathology* **93**: 774-783.

- Inoue-Nagata A.K., Albuquerque LC, Rocha WB, Nagata T (2004).** A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage ϕ 29 DNA polymerase. *Journal of Virological Methods* **116**:209–211.
- Isnard M., Granier M., Frutos R., Reynaud B., Peterschmitt M. (1998).** Quasispecies nature of three maize streak virus isolates obtained through different modes of selection from a population used to assess response to infection of maize cultivars. *Journal of General Virology* **79**: 3091–3099.
- Jenkins G.M., Rambaut A., Pybus O.G., Holmes E.C. (2002).** Rates of molecular evolution in RNA viruses: A quantitative phylogenetic analysis. *Journal of Molecular Evolution* **54**, 156-165.
- Jeske H., Lutgemeier M., Preiss W. (2001).** Distinct DNA forms indicate rolling circle and recombination-dependent replication of Abutilon mosaic geminivirus. *EMBO J.* **20**: 6158–6167.
- Jindala V., Dhaliwala G.S., Dhawana A.K (2007).** Mechanisms of resistance in cotton to whitefly *Bemisia tabaci* (Homoptera: *Aleyrodidae*): antibiosis. *International Journal of Tropical Insect Science* **27**: 216-222.
- Jones R.D. (2003).** Plant viruses transmitted by whiteflies. *European Journal of plant Pathology* **109**: 195-219.
- Koenig R., Lesemann D-E. (1978).** Potexvirus group. CMI/AAB *Description of Plant viruses* n°200.
- Kon T., Rojas M.R., Abdourhamane I.K., Gilbertson R.L. (2009).** Roles and interactions of begomoviruses and satellite DNAs associated with okra leaf curl disease in Mali, West Africa. *Journal of General Virology* **90**: 1001–1013.
- Konaté G., Barro N., Fargette D., Swanson M.M., Harrison B.D. (1995).** Occurrence of whitefly-transmitted geminiviruses in crops in Burkina Faso, and their serological detection and differentiation. *Annals of Applied Biology* **126**: 121-129.
- Konaté G., Traoré O. (1999).** Characterization and distribution of pepper vein mottle virus in West Africa. *Cahiers Agricultures* **8**: 129-131.

- Laufs J., Schumcher S., Geisler N., Jupin I., Gronenborn B. (1995).** Identification of the nicking tyrosine of geminivirus Rep protein. *FEBS letter* **18**:258-262.
- Lazarowitz S.G. (1992).** Geminiviruses: Genome structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Sciences* **11**:327-349.
- Lefeuvre P. (2008).** Recombinaison et émergence virale: Le modèle des *Begomovirus*. *Thèse de doctorat, Université de La Réunion, Ile de La Réunion, France*, 93 p.
- Lefeuvre P., Martin D.P., Hoareau M., Naze F., Delatte H., Thierry M., Varsani A., Becker N., Reynaud B., Lett J.-M. (2007).** Begomovirus 'melting pot' in the south-west Indian Ocean islands: molecular diversity and evolution through recombination. *Journal of General Virology* **88**: 3458-3468.
- Lesemann D-E., Koenig R. (1977).** Potexvirus (Potato virus X) group. "In": Atlas of insect and plant viruses (ed. K. Maramorosch). Academic press, New York. pp. 331-345.
- Lewandowski D.J. (2001).** Genus Tobamovirus. In: van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB (eds), Virus taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruse. Academic Press, San Diego, pp889-894
- Lewin B. (1997).** Genes VI. Oxford University Press. 1259 pp.
- Mansoor S., Briddon R.W., Bull S. E., Bedford I. D., Bashir A., Hussain M., Saeed M., Zafar Y., Malik K. A., Fauquet C., Markham P. G. (2003a).** Cotton leaf curl disease is associated with multiple monopartite begomoviruses supported by single DNA β . *Archives of Virology* **148**: 1969-1986.
- Mansoor S., Briddon R.W., Zafar Y., Stanley J. (2003b).** Geminivirus disease complexes: an emerging threat. *TRENDS in Plant science* **8**: 128-134.
- Mansoor S., Khan S.H., Bashir A., Saeed M., Zafar Y., Malik K.A., Briddon R.W., Stanley J., Markham P.G. (1999).** Identification of a novel circular

single-stranded DNA associated with cotton leaf curl disease in Pakistan. *Virology* **259**:190–199

Martelli G.P., Sabanadzovic S., Abou-Ghanem Sabanadzovic N., Edwards M.C., Dreher T. (2002). The family *Tymoviridae*. *Archives of Virology* **147**: 1837-1846.

Martin D.P., Posada D., Crandall K.A., Williamson C. (2005). A modified bootscan algorithm for automated identification of recombinant sequences and recombination breakpoints. *AIDS Res Hum Retroviruses* 21: 98-102.

Mason G., Rancati M., Bosco D. (2000). The effect of thiamethoxam, a second generation neonicotinoid insecticide, in preventing transmission of tomato yellow leaf curl geminivirus (TYLCV) by the whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius). *Crop Protection* **19**: 473-479.

Matthews R.E.F. (1991). Transmission, movement and host range. In: *Plant Virology*. Third Edition, Academic Press, Inc. Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, pp. 339-343.

McGovern R.J., Polston J.E., Danyluk G.M., Hiebert E., Abouزيد A.M., Stanley P.A. (1994). Identification of a natural weed host of tomato mottle geminivirus in Florida. *Plant Diseases* **78**: 1102-1106.

Messiaen C.M., Blancard D., Rouxel F., Lafon R. (1991). Maladies des plantes maraichères. Troisième édition. *INERA* Paris, France. 552p.

Monci F., Sanchez-Campos S., Navas-Castillo J., Moriones E. (2002). A natural recombinant between the geminiviruses *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish population. *Virology* **303**: 317–326.

Morales F.J., Anderson P.K. (2001). The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of Virology* **146**:415-441.

- Moriones E., Navas-Castillo J. (2000).** Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Research* **71**:123-134.
- Mosig G. (1998).** Recombination and recombination-dependent DNA replication in bacteriophage T4. *Annual Review of Genetic* **32**: 379-413.
- Mosig G., Gewin J., Luder A., Colowick N., Vo D. (2001).** Two recombination dependent DNA replication pathways of bacteriophage T4, and their roles in mutagenesis and horizontal gene transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **98**: 8306-8311.
- Mubin M., Briddon R.W., Mansoor S. (2009).** Complete nucleotide sequence of chili leaf curl virus and its associated satellites naturally infecting potato in Pakistan. *Archives of Virology* **154**: 365-368.
- Navot N., Pihersky E., Zeidan M., Amir D., Czosneck. H. (1991).** Tomato yellow leaf curl virus; a whitefly-transmitted geminivirus with a single genomic component. *Virology* **185**: 151-161.
- Ndunguru J., Rajabu A.C. (2004).** Effect of okra mosaic virus disease on the above-ground morphological yield components of okra in Tanzania. *Scientia Horticulturae* **99**: 225-235.
- Nono-womdim R. (2001).** An overview of major virus diseases of vegetable crops in Africa and some aspects of their control. *Plant virology in sub Saharan Africa*, 213-230.
- Nono-Womdim R., Swai I.S., Green S.K., Gebre-Selassie K., Laterrot H., Marchoux G., Opena R.T. (1996).** Tomato viruses in Tanzania: identification, distribution and disease incidence. *Journal of Southern African Society for Horticultural Sciences*: 41-44.
- Oliveira M.R.V., Henneberry T.J., Anderson P. (2001).** History, current status and collaborative research projects for *Bemisia tabaci*. *Crop protection* **20**: 709-723.
- Ooi K., Oshita S., Izumi I., Yahara T. (1997).** Molecular phylogeny of geminivirus infecting wild plants in Japan. *Journal of Plant Research* **110**: 247-257.

- Osborne L.S. (1988).** The not so sweet sweetpotato whitefly. *Florida Foliage*. May, 8-15.
- Otoïobiga L.C. (2003).** Biology and Control Strategies for Whitefly (*Bemisia tabaci* Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae) Populations in Burkina Faso (West Africa). Thèse de PhD, Campus McDonald, Université McGill, Quebec, Canada.
- Otoïobiga L.C., Vincent C., Stewart R.K. (2003).** Susceptibility of Field Populations of Adult *Bemisia tabaci* Gennadius (Homoptera: Aleyrodidae) and *Eretmocerus* sp. (Hymenoptera: Aphelinidae) to Cotton Insecticides in Burkina Faso (West Africa). *Pest Management Science* **59**: 97– 06.
- Padidam M., Beachy R.N., Fauquet C.M. (1995).** Tomato leaf curl geminivirus from India has a bipartite genome and coat protein is not essential for infectivity. *Journal of general virology* **76**: 25-35.
- Padidam M., Sawyer S., Fauquet C.M. (1999).** Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* **265**:218-225.
- Palumbo J.C., Horowitz A.R., Prabhaker N. (2001).** Insecticidal control and resistance management for *Bemisia tabaci*. *Crop Protection* **20**: 739 – 765.
- Paximadis M., Idris A.M., Torrez-Jerez I., Villarreal A., Rey M.E., Brown J.K. (1999).** Characterization of tobacco geminiviruses in the old and new world. *Archives of Virology* **144**: 703-717.
- Perring T.M., Cooper A.D., Rodriguez R.J., Farrar C.A., Billows T.S. (1991).** Identification of a whitefly species by genomic and behavioural studies. *Science* **259**: 74-77.
- Pico B., Diez M.J., Nuez F. (1996).** Viral disease causing the greatest economic losses to the tomato crop. II. The Tomato yellow leaf curl virus—a review. *Scientia Horticulturae* **67**: 151–196.
- Pita J.S., Fondong V.N., Sangare A., Otim-Nape W., Ogwal S., Fauquet C.M. (2001).** Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda. *Journal of General Virology* **82**: 655-665.

- Polston J.E., Anderson P.L. (1997).** The emergence of whitefly transmitted geminiviruses in tomato in the Western Hemisphere. *Plant Disease* **81**: 1358–1369.
- Posada D. (2006).** ModelTest Server: a web-based tool for the statistical selection of models of nucleotide substitution online. *Nucleic Acids Research* **34**: W700-3
- Preiss W., Jeske H. (2003).** Multitasking in replication is common among geminiviruses. *Journal of Virology* **77**: 2972–2980.
- Pringle C.R. (1999).** Virus taxonomy at the XIth International Congress of Virology. *Archives of Virology* **144**: 2065-2070.
- Raj S.K., Khan M.S., Snehi S.K., Kumar S., Khan A.A. (2007).** Natural occurrence of a *Begomovirus* on *Dimorphoteca sinuata* in India. *Australasian Plant Disease Notes* **2**: 25-26.
- Ramos P.L., Guevara-Gonzalez R.G., Peral R., Ascencio-Ibanez J.T., Polston J.E., Argüello-Astorga G.R., Vega-Arreguin J.C., Rivera-Bustamante R.F. (2003).** *Tomato mottle Taino virus* pseudorecombines with PYMV but not with ToMoV: Implications for the delimitation of *cis*- and *trans*-acting replication specificity determinants. *Archives of Virology* **148**: 1697–1712.
- Rice R.P., Rice, L.W., Tindall H.D. (1987).** Fruit and Vegetable Production in Africa. Macmillan Publishers, U.K. 371 pp.
- Rochow W.F., Ross A.F. (1955).** Virus multiplication in plants doubly infected by Potato viruses X and Y. *Virology* **1**:10–27.
- Rojas M.R., Hagen C., Lucas W.J., Gilbertson R.L. (2005).** Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Annual Review of Phytopathology* **43**: 361–394.
- Saikia A.K., Muniyappa V. (1989).** Epidemiology and control of tomato leaf curl virus in Southern India. *Tropical Agriculture* **66**: 350–354.
- Sanz A.I., Fraile A., Gallego J.M., Malpica J.M., Garcia-Arenal F. (1999).** Genetic variability of natural populations of cotton leaf curl geminivirus, a single-stranded DNA virus. *Journal of Molecular Evolution* **49**: 672–681.

- Sanz A.I., Fraile A., Garcia-Arenal F., Zhou X., Robinson D.J., Khalid S., Butt T., Harrison B.D. (2000).** Multiple infection, recombination and genome relationships among begomovirus isolates in cotton and other plants in Pakistan. *Journal of General Virology* **81**: 1839-1849.
- Saunders K., Bedford I.D., Stanley J. (2001).** Pathogenicity of a natural recombinant associated with ageratum yellow vein disease: Implications for begomovirus evolution and disease aetiology. *Virology* **282**: 38–47.
- Saunders K., Salim N., Mali V.R., Malathi V.G., Briddon R., Markham P.G., Stanley J. (2002).** Characterization of Sri Lanka cassava mosaic virus and Indian cassava mosaic virus: evidence for acquisition of a DNA B component by a monopartite begomovirus. *Virology* **293**: 63-74.
- Saunders K., Stanley J. (1999).** A nanovirus-like component associated with yellow vein disease of *Ageratum conyzoides*: evidence for interfamilial recombination between plant DNA viruses. *Virology* **264**:142–152.
- Seal S.E., vandenBosch F., Jeger M.J. (2006).** Factors Influencing *Begomovirus* Evolution and Their Increasing Global Significance: Implications for Sustainable Control. *Critical Reviews in Plant Sciences* **25**:23–46.
- Servin R., Martinez Carrillo J.L., Hiraes L. (1999).** Weeds and cultivated hosts of the silverleaf whitefly *Bemisia argentifollii* Bellows and Perring in Baja California Sur Mexico. *Southwestern Entomologist* **24**:31-36.
- Shih S.L., Kumar S., Tsai W.S., Lee L.M., Green S.K. (2009).** Complete nucleotide sequences of okra isolates of Cotton leaf curl Gezira virus and their associated DNA- β from Niger. *Archives of Virology* **154**: 369-372.
- Smith K.M. (1973).** A textbook of plant virus diseases, troisième édition, Academic press, New York. 684 p.
- Ssekyewa C. (2006).** Incidence, distribution and characteristics of major Tomato leaf curl and mosaic diseases in Uganda. PhD-thesis. Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University, Ghent, Belgium. 233 p.
- Stanley J. (1995).** Analysis of African cassava mosaic virus recombinants suggests strand nicking occurs within the conserved nonanucleotide motif during the initiation of rolling circle DNA replication. *Virology* **206** :707-712.

- Stanley J., Bisaro D.M., Briddon R.W., Brown J.K., Fauquet C.M., Harrison B.D., Rybicki E.P., Stenger D.C (2005).** Geminiviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (eds), Virus taxonomy, VIIIth Report of the ICTV. Elsevier/Academic Press, London, pp 301–326.
- Stanley J., Saunders K., Pinner M.S., Wong S.M. (1997).** Novel defective interfering DNAs associated with ageratum yellow vein geminivirus infection of *Ageratum conyzoides*. *Virology* **239**: 87-96.
- Stenger D.C., Revington G.N., Stevenson M.C., Bisaro D.M. (1991).** Replication release of geminivirus genomes from tandemly repeated copies: evidence for rolling- circle replication of a plant viral DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **88**: 8029-8033.
- Sunter G., Bisaro D.M. (1991).** Transactivation in a geminivirus: AL2 gene product is needed for coat protein expression. *Virology* **180**: 416-419.
- Swanson M.M., Valand G.B., Muniyappa V., Harrison B.D. (1998).** Serological detection and antigenic variation of two whitefly-transmitted geminiviruses tobacco leaf curl and croton yellow vein mosaic viruses. *Annals of Applied Biology* **132**: 427-435.
- Swofford D.L. (2000).** PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other Methods). Version 4.0b4a Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. (2007).** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**: 1596-1599.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**: 4673-80
- Thottappilly G. (1992).** Plant virus diseases of importance to African agriculture. *Journal of Phytopathology* **134**: 265-288.

- Thresh J.M., Otim-Nape G.W. (1994).** Strategies for controlling African cassava mosaic geminivirus. *Adv. Dis. Vector Res.* **10**: 215–236.
- Thresh J.M., Otim-Nape G.W., Thankappan M., Muniyappa V. (1998).** The mosaic disease of cassava in Africa and India caused by whitefly-borne geminiviruses. *Review of Plant Pathology* **77**: 935-945.
- Tiendrébéogo F. (2006).** Identification sérologique et moléculaire de Begomovirus au Burkina Faso. *Mémoire de DEA, Université de Ouagadougou, Burkina Faso*, 54 p.
- Tiendrébéogo F., Traoré V.S.E., Barro N., Traoré A.S., Konaté G., Traoré O. (2008).** Characterization of Pepper yellow vein mali virus in Capsicum sp. in Burkina Faso. *Plant Pathology* **7**: 155-161.
- Traoré E.V.S. (2002).** Contrôle de la qualité sanitaire des tubercules de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) utilisés semenceaux au Burkina Faso : détection des virus X et Y de la pomme de terre. *Rapport de stage de fin d'étude de DUT. Université de Ouagadougou UFR-SVT, Ouagadougou (Burkina Faso)*, 30 p.
- Traoré O. (1993).** Epidémiologie de la striure du maïs en zone soudano-sahélienne: cas du Burkina Faso. Thèse de doctorat 3 ème cycle, Université de Ouagadougou, Burkina Faso.
- Van Regenmortel M.H.V., Burckard J. (1980).** Detection of a wide spectrum of tobacco mosaic virus strains by indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Journal of General Virology* **34**: 449-457.
- Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carstens E., Estes M.K., Lemon S., Maniloff J., Mayo M.A., McGeoch D.J., Pringle C.R., Wickener R., (2000).** Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. *VIIth report of the International Committee of Taxonomy of Viruses.* Academic Press, San Diego, 1160p.
- Van Wezel R., Liu H., Tien P., Stanley J., Hong Y. (2001).** Gene C2 of the monopartite geminivirus tomato yellow leaf curl virus-China encodes a

- pathogenicity determinant that is localized in the nucleus. *Molecular Plant Microbe Interact* **14**: 1125-8.
- Vance V.B. (1991).** Replication of Potato virus X RNA is altered in coinfections with Potato virus Y. *Virology* **182**: 486-494.
- Vance V.B., Berger P.H., Carrington J.C., Hunt A.G., Shi X.M. (1995).** 5' proximal potyviral sequences mediate Potato virus X / potyviral synergistic disease in transgenic tobacco. *Virology* **206**:583-590.
- Vanderschuren H., Stupak M., Futterer J., Gruissem W., Zhang P. (2007).** Engineering resistance to geminiviruses--review and perspectives. *Plant Biotechnology Journal* **5**: 207-220.
- Vanitharani R., Chellappan P., Fauquet C. M. (2005).** Geminiviruses and RNA silencing. *Trends Plant Science* **10**: 144-51.
- Varela A. M. (1995).** Major Pests of Tomatoes in Eastern and Southern Africa: Compilation of Past Research Work and Identification of IPM opportunities. GTZ- IPM Horticulture Project Consultancy Report, Nairobi, Kenya.
- Varma A., Malathi V. G. (2003).** Emerging geminivirus problems. A serious threat to crop production. *Annals of Applied Biology* **142**: 145-164.
- Walker, G.P., Natwick, E.T. (2006).** Resistance to silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii* (Hem., *Aleyrodidae*), in *Gossypium thurberi*, a wild cotton species. *Journal of Applied Entomology* **130**: 429-436.
- Wang X., Xie Y., Xhou X. (2004).** Molecular characterization of two distinct Begomoviruses from papaya in China. *Virus Genes* **29** (3): 303-309.
- Warburg O (1894).** Die kulturpflanzen usambaras. Mitt. Dtsch. Schtzgeb 7, 131. *Annals of Applied Biology* **25**: 790-806.
- Ward C.W., Shukla D.D. (1991).** Taxonomy of potyviruses: current problems and some solutions. *Intervirology* **32**: 269-296.
- Wartig L., Kheyr-Pour A., Noris E., De Kouchkovsky F., Jouanneau F., Gronenborn B., Jupin I. (1997).** Genetic analysis of the monopartite tomato

- yellow leaf curl geminivirus: roles of V1, V2 and C2 ORFs in viral pathogenesis. *Virology* **228**: 132-140.
- Wyatt S.D., Brown J.K. (1996).** Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. *Phytopathology* **86**: 1288-1293.
- Xie Q., Sanz-Burgos A.P., Guo H., Garcia J.A., Gutierrez C. (1999).** GRAB proteins, novel members of the NAC domain family, isolated by their interaction with geminivirus protein. *Plant Molecular Biology* **39**:647-656.
- Yang Y., Sherwood T. A., Patte C. P., Hiebert E., Polston J E. (2004).** Use of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) rep gene sequences to engineer TYLCV resistance in tomato. *Phytopathology* **94**: 490-496.
- Yassin A.M., Nour M.A. (1965).** Tomato leaf curl disease, its effect on yield and varietal susceptibility. *Sudan Agricultural Journal* **1**: 3.
- Zar J.H. (1999).** Biostatistical Analysis. 4th Edn. Prentice Hall, New Jersey.
- Zeidan M., Czosnek H. (1991).** Acquisition of tomato yellow leaf curl virus by the whitefly *Bemisia tabaci*. *Journal of General Virology* **72**:2607-2614.
- Zhou X., Liu Y., Calvert L., Munoz D., Otim-Nape G.W., Robinson D.J., Harrison B. D. (1997).** Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. *Journal of General Virology* **78**: 2101–2111.
- Zhou X., Robinson D.J., Harrison B.D. (1998).** Types of variation in DNA-A among isolates of East African cassava mosaic virus from Kenya, Malawi and Tanzania. *Journal of General Virology* **79**:2835-2840.
- Zhou YC, Noussourou M, Kon T, Rojas MR, Jiang H, Chen LF, Gamby K, Foster R, Gilbertson R L (2008).** Evidence of local evolution of tomato-infecting begomovirus species in West Africa: characterization of tomato leaf curl Mali virus and tomato yellow leaf crumple virus from Mali. *Archives of Virology* **153**: 693–706.

Zinga I. (1999). Détection et distribution géographique des geminivirus transmis par la mouche blanche (*Bemisia tabaci*) au Burkina Faso. *Mémoire de DEA Université de Ouagadougou*, 48p.

ANNEXES 1 à 7

ANNEXE 1

Fiche technique 1: Le virus de l'enroulement du poivron : une nouvelle menace pour les cultures de piments au Burkina Faso.



Le virus de l'enroulement du poivron : une nouvelle menace pour les cultures de piments au Burkina Faso

Tiendrébéogo F.¹, Barro N.¹, Traoré O.², Traoré E.V.S.²

¹UFR/SVT, Université de Ouagadougou, 03 BP 7021 Ouagadougou 03

²INERA 01 BP 476 Ouagadougou 01, Burkina Faso

Introduction

Les piments (piment doux ou poivron et piments piquants) occupent une grande place parmi les cultures maraîchères au Burkina Faso. Selon la FAO, leur production a été évaluée à 7000 tonnes en 2005. La culture des piments est surtout réalisée dans les zones périurbaines et constitue une importante source de revenus pour les acteurs du secteur maraîcher.

Deux agents pathogènes d'origine virale ont été signalés chez les piments au Burkina Faso (D'Arondel de Hayes, 1995). Il s'agit du virus de la mosaïque du tabac (VMT) et du virus de la panachure verte du poivron ou PVMV (Barro, 1994). Le PVMV a longtemps été considéré comme étant le principal virus infectant les piments dans le pays. Au cours de ces dernières années, des symptômes de type nouveau différents de ceux causés par le PVMV ont été observés dans de nombreux périmètres maraîchers.

Ce travail a pour objectif de faire le point sur les travaux de caractérisation de l'agent pathogène responsable des symptômes observés et la répartition géographique de la maladie qu'il cause.

Les symptômes

Les symptômes ont surtout été observés chez le piment (variété Jaune du Burkina). Les formes les plus sévères sont une forte déformation des feuilles (feuilles torsadées) accompagnée parfois de la mosaïque sur les cloques formées. Les plants infectés sont en général très rabougris. Dans les champs, la maladie est observée sur quelques plants facilement reconnaissables par leurs petites tailles. Elle se propage ensuite rapidement pour affecter 80 à 100% des plants. Les mouches blanches (*Bemisia tabaci*) ont toujours été trouvées en grand nombre dans les champs infestés. Des symptômes causés par le virus de la panachure verte du poivron sont

aussi parfois associés donnant ainsi des infections mixtes. Bien que les pertes de récolte ne soient pas encore évaluées, le rabougrissement des plants malades entraîne une grande diminution du nombre de fruits produits.

Déformations sévères des feuilles de piments avec présence de cloques et de mosaïque.



Symptômes sévères d'enroulement des feuilles de piment en forme de cuillère.



Symptômes de panachure verte du poivron causés par le PVMV sur piment



Diagnostic biologique de l'agent pathogène

L'implication des mouches blanches et les symptômes de déformations foliaires sont deux indications sérieuses sur l'appartenance de l'agent pathogène au genre *Begomovirus*. Les virus de ce groupe sont tous transmis par la mouche blanche *B. tabaci*. Des tests de transmission par *B. tabaci* ont alors été réalisés à partir de plants de piment "jaune du Burkina" dont les feuilles présentaient de fortes déformations foliaires.

Diagnostic sérologique de l'agent pathogène

Les plants malades ont aussi été testés en sérologie. La méthode immunoenzymatique ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) a été utilisée. Tous les bégomovirus ont des relations sérologiques entre eux (Harrison et Robinson, 1999). C'est pourquoi un anticorps polyclonal dirigé contre le virus de la mosaïque africaine du manioc (*African cassava mosaic virus*, ACMV) a été utilisé. L'ACMV est l'un des bégomovirus les plus connus en Afrique. Des anticorps monoclonaux dirigés contre l'ACMV et un autre bégomovirus (le virus de l'enroulement du gombo ou *Okra leaf curl virus*, OLCV) ont été aussi utilisés (Tiendrébéogo, 2006).

L'agent pathogène est le virus de l'enroulement du poivron

Les tests de transmission par mouches blanches ont permis de reproduire les symptômes chez des plantules de poivron (variété Yolo Wonder) avec un taux de succès de 100%. Par ailleurs, les extraits de feuilles de piment ou de poivron infecté ont clairement réagi avec l'anticorps polyclonal anti-ACMV. Ces réactions positives ont été confirmées par l'utilisation des anticorps monoclonaux. Comme l'indique le tableau 1, l'agent pathogène réagit fortement avec SCR₁₂ mais pas avec SCR₂₅. Il se distingue ainsi de l'OLCV et de l'ACMV.

Tableau 1. Détection de l'agent pathogène responsable de l'enroulement des feuilles de piment à l'aide d'anticorps monoclonaux.

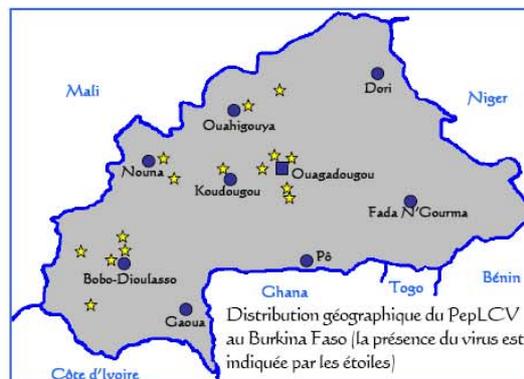
Extraits de feuilles malades	Anticorps monoclonaux			
	SCR ₁₂	SCR ₂₅	B ₃	C ₅
Piment	5	0	5	1
Manioc (ACMV)	5	3	5	1
Gombo (OLCV)	2	0	5	0

Les réactions ont été notées de 0 (absence de réaction) à 5 (forte réaction).

Les tests sérologiques et de transmission par *B. tabaci* montrent que l'agent pathogène responsable des symptômes de déformations sévères des feuilles du poivron appartient au genre *Begomovirus*. Ses propriétés biologiques et sérologiques indiquent qu'il s'agit du *Pepper leaf curl virus* (PepLCV) ou virus de l'enroulement du poivron déjà rapporté chez cette plante au Bangladesh et en Malaisie (Fauquet *et al.*, 2003).

Le virus de l'enroulement du poivron est très répandu au Burkina Faso.

Les symptômes causés par le PepLCV ont été observés dans la plupart des zones de production maraîchère. Les prospections doivent se poursuivre pour compléter la carte de distribution du virus.



Recommandations pour la gestion de la maladie

Les connaissances actuellement disponibles sur le PepLCV ne permettent pas d'envisager des méthodes de lutte adaptées au cas de ce virus. Les efforts devraient se poursuivre selon les principaux axes suivants :

- caractérisation plus poussée du virus
- recherche de plantes refuges pour le virus
- évaluation des pertes de récolte
- recherche de sources de résistances

Des mesures prophylactiques de lutte appliquées au cas d'autres virus peuvent néanmoins permettre de réduire l'impact du PepLCV sur les cultures de piments et de poivron :

- ✓ Contrôle de la population de mouches blanches par des traitements insecticides appropriés
- ✓ Élimination des vieux plants infectés au cours des cultures précédentes et pouvant servir de sources de propagation.
- ✓ Protection des pépinières contre les mouches blanches afin que les plantules ne soient pas infectées de façon précoce

Références bibliographiques

- D'Arondel de Hayes J (1995). Compendium. Pages 54-69 in : Guide de gestion phytosanitaire des cultures du Burkina Faso. MARA/MESSRS/Projet Canado-Burkinabé de protection des végétaux, Ouagadougou, Burkina.
- Barro N (1994). Caractérisation sérologique, biologique et aspects écologiques de quelques virus infectant les plantes maraîchères au Burkina Faso. Thèse de doctorat, Université de Ouagadougou, Burkina Faso.
- Fauquet CM, Bisaro DM, Bridden RW, Brown J, Harrison BD, Rybicki EP, Stenger DC and Stanley J (2003). Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the *Geminiviridae* family, and a new updated list of begomovirus species. *Archives of Virology* 148 : 405-421.
- Harrison BD, Robinson D (1999). Natural genomic and antigenic variation in whitefly transmitted geminiviruses (begomoviruses). *Annual Review of Phytopathology* 37: 369-398.
- Tiendrébéogo F (2006). Identification sérologique et moléculaire de bégomovirus au Burkina Faso. Mémoire de DEA, Université de Ouagadougou, Burkina Faso.

ANNEXE 2

Fiche technique 2 : Le virus de l'enroulement du gombo en zone soudano-sahélienne.



Le virus de l'enroulement du gombo en zone soudano-sahélienne

Traoré E.V.S.¹, Tiendrébéogo F.², Barro N.², Allarangaye M.D.³, Traoré O.¹, Konaté G.¹

¹INERA 01 BP 476 Ouagadougou 01, Burkina Faso

²UFR/SVT, Université de Ouagadougou, 03 BP 7021 Ouagadougou 03

³ITRAD, BP 5400 N'Djaména, Tchad

Introduction

Le gombo est une plante légumière appartenant à la famille des *Malvaceae*. Trois espèces sont cultivées. La plus répandue est *Abelmoschus esculentus* (synonyme: *Hibiscus esculentus*). Les deux autres espèces sont *A. manihot* et *A. moschatus*. Toutes les trois espèces sont présentes en Afrique de l'ouest. Le gombo est riche en vitamines, en fibres et en sels minéraux. Il est utilisé dans l'industrie du sucre et dans l'industrie pharmaceutique.

Les virus constituent des contraintes majeures pour la culture du gombo. En Afrique de l'ouest, deux virus infectant le gombo ont été signalés: le virus de la mosaïque du gombo et le virus de l'enroulement des feuilles du gombo (Fauquet et Thouvenel, 1987; Barro, 1994). Cependant, peu de travaux ont été menés pour obtenir les informations nécessaires à un contrôle satisfaisant de ces virus. Au cours de ces dernières années, une recrudescence de l'enroulement du gombo a été observée menaçant ainsi la production de gombo (Tiendrébéogo, 2006).

Ce travail résume les principales connaissances acquises sur l'enroulement du gombo et son virus dans plusieurs pays d'Afrique de l'ouest et du centre.

Le virus de l'enroulement des feuilles du gombo

Le virus de l'enroulement des feuilles du gombo a pour nom officiel *Okra leaf curl virus* (OLCV). Il s'agit du nom taxonomique officiellement reconnu par le Comité International de Taxonomie des Virus (ICTV). L'OLCV est classé dans le genre *Begomovirus* et dans la famille des *Geminiviridae*. C'est un virus isométrique (forme presque



Particules d'OLCV observées au microscope électronique

circulaire) avec un diamètre de 20 nanomètres. Les particules virales sont souvent associées par paires. Le nom de la famille à laquelle appartient le virus a d'ailleurs été donné au regard de cette disposition des particules (Gemini=jumeaux).

Symptômes causés par l'OLCV

L'OLCV induit des symptômes très caractéristiques qui vont d'une déformation des feuilles du gombo en forme de cuillère à un enroulement des feuilles sur elles-mêmes. Dans certains cas, les feuilles sont recourbées vers le bas. Les nervures s'épaississent et deviennent saillantes. Lorsque la maladie est bien installée, les plants subissent un rabougrissement et les feuilles qui se forment sont de petites tailles. La plupart des fleurs avortent entraînant ainsi une faible production de fruits qui sont de surcroît de petites tailles. Des différences entre variétés de gombo ont été observées dans l'expression des symptômes. En général, les champs sont infestés à 100%.



Symptômes de déformations et d'enroulement des feuilles de gombo causés par l'*Okra leaf curl virus* (OLCV). On voit les nervures épaissies devenues saillantes (photo en bas à gauche).

Transmission de l'OLCV

Le virus de l'enroulement du gombo est transmis par les mouches blanches de l'espèce *Bemisia tabaci*. C'est l'une des propriétés qui a permis de ranger l'OLCV dans le genre *Begomovirus*. C'est en se nourrissant de la sève des plants de gombo que les mouches blanches transportent le virus d'un plant malade à un plant sain. Aussi, les fortes pressions de mouches blanches sur les champs de gombo conduisent-elles souvent à des situations d'épidémies.



La mouche blanche (*Bemisia tabaci*)

Diagnostic de l'enroulement du gombo

En plus des symptômes caractéristiques, le diagnostic de l'enroulement du gombo utilise la transmission spécifique par *B. tabaci* et la détection sérologique de l'OLCV. Le diagnostic sérologique le plus courant repose sur le test immunoenzymatique ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). Comme pour la plupart des bégomovirus, les anticorps utilisés sont ceux préparés contre le virus de la mosaïque africaine du manioc (ACMV). Il a été montré que les bégomovirus sont tous sérologiquement reliés (Harrison et Robinson, 1999). Des anticorps monoclonaux plus spécifiques ont été préparés contre l'OLCV et l'ACMV. Ils permettent d'identifier les variants sérologiques de l'OLCV et des autres bégomovirus. La variation sérologique de l'OLCV n'a pas été suffisamment étudiée. Néanmoins, quatre variants ont été identifiés au Burkina Faso (Konaté *et al.*, 1995).

Variants	Anticorps monoclonaux			
	SCR11	SCR12	SCR22	SCR25
I	■	■	□	■
II	□	■	□	■
III	□	■	■	■
IV	□	■	□	□

Figure 1. Profils sérologiques des variants d'OLCV au Burkina Faso. ■ Réaction positive □ absence de réaction

Répartition géographique de l'OLCV

L'enroulement du gombo reste une maladie insuffisamment étudiée en Afrique soudano-sahélienne. L'OLCV n'a été rapporté que dans six

pays en Afrique de l'ouest et du centre (voir carte ci-dessous).



Distribution géographique de l'OLCV en zone soudano-sahélienne.

Méthodes de lutte contre l'enroulement du gombo

Bien que l'enroulement du gombo soit endémique en Afrique de l'ouest, l'insuffisance des travaux sur la maladie n'a pas permis la mise en place de méthodes de lutte appropriées. Cependant, l'OLCV étant transmis par les mouches blanches, le contrôle des populations de ce vecteur devrait permettre de réduire l'incidence de la maladie au champ. Des travaux de criblage du germplasm de gombo sont à entreprendre afin d'identifier des sources de résistance au virus. Il est aussi indispensable d'acquérir des informations plus approfondies sur l'épidémiologie de l'enroulement du gombo dans l'optique de la mise au point de méthodes de lutte basées sur les bonnes pratiques culturales.

Références bibliographiques

- Barro N (1994). Caractérisation sérologique, biologique et aspects écologiques de quelques virus infectant les plantes maraîchères au Burkina Faso. Thèse de doctorat, Université de Ouagadougou, Burkina Faso.
- Fauquet C, Thouvenel JC (1987). Maladies virales des plantes en Côte d'Ivoire. Editions de l'Orstom, collection Initiations-Documents Techniques n°46, Paris, France, 243 p.
- Harrison BD, Robinson DJ (1999). Natural genomic and antigenic variation in whitefly transmitted geminiviruses (bégomoviruses). *Annual Review of Phytopathology* 37: 369-398.
- Konaté G, Barro N, Fargette D, Swanson MM, Harrison BD (1995). Occurrence of whitefly-transmitted geminiviruses in crops in Burkina Faso, and their serological detection and differentiation. *Annals of Applied Biology* 126:121-129.
- Tiendrébéogo F (2006). Identification sérologique et moléculaire de bégomovirus au Burkina Faso. Mémoire de DEA, Université de Ouagadougou, Burkina Faso.

(Financement partiel PRBC)



ANNEXE 3

Fiche technique 3 : Apparition du Papaya leaf curl virus chez le papayer au Burkina Faso.



Apparition du *Papaya leaf curl virus* chez le papayer au Burkina Faso

Barro N.¹, Traoré E.V.S.², Traoré O.², Tiendrébéogo F.¹.

¹UFR/SVT, Université de Ouagadougou, 03 BP 7021 Ouagadougou 03

²INERA 01 BP 476 Ouagadougou 01, Burkina Faso

Introduction

Le papayer (nom scientifique *Carica papaya*) est l'une des plus importantes plantes fruitières dans les pays tropicaux. Il occupe une place de choix dans la politique de relance de la production fruitière au Burkina Faso. Le papayer est cultivé essentiellement pour son fruit dont la pulpe est riche en sucres et en vitamines A, B et C. Le papayer a aussi de multiples utilisations notamment en médecine et dans l'agro-industrie.

Les virus sont parmi les ennemis les plus devastateurs du papayer. Deux virus du papayer ont souvent été cités : le virus de mosaïque du papayer et le virus des taches annulaires du papayer. Au cours de la dernière décennie, un autre virus important du papayer a été signalé au Nigéria (Taylor, 2003) et dans quelques pays en Asie (Fermin et Gonzalves, 2003; Wang *et al.*, 2004). Il s'agit du virus de l'enroulement des feuilles du papayer ou *Papaya leaf curl virus* (PaLCV). Le PaLCV appartient au genre *Begomovirus* et à la famille des *Geminiviridae*. Comme tous les autres begomovirus, il est transmis par la mouche blanche *Bemisia tabaci*.

Des symptômes semblables à ceux causés par le PaLCV ont été récemment observés dans plusieurs périmètres maraîchers du Burkina. Nous avons alors mené des travaux montrant que l'agent pathogène responsable de ces symptômes est bien le PaLCV. Les résultats de cette caractérisation sont rapportés dans ce document.



La mouche blanche *Bemisia tabaci*, insecte vecteur des begomovirus.

aussi un épaissement des nervures avec des pétioles torsadés. Les fruits produits par les plants malades sont déformés et de petite taille. Lorsque les plants sont infectés précocement ils deviennent rabougris et ne produisent pas de fruits.



Symptômes observés sur papayer. A : plant malade avec feuilles déformées; B: détail d'une feuille infectée montrant une forte déformation du limbe avec un pétiole torsadé; C: malformations des fruits sur un plant malade.

Description des symptômes

Les symptômes observés consistent en une déformation très sévère du limbe des feuilles. Il y a

Identification du virus

En plus des symptômes caractéristiques observés, l'agent pathogène a été identifié par sérologie en utilisant le test immunoenzymatique ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). Un anticorps polyclonal ainsi que les anticorps monoclonaux SCR12, SCR16 tous dirigés contre le virus de la mosaïque africaine du manioc (*African cassava mosaic virus*, ACMV) ont été utilisés pour la détection du virus. Les broyats de feuilles de papayer présentant les symptômes de déformation ont tous réagi positivement aussi bien avec l'anticorps polyclonal qu'avec les anticorps monoclonaux (Tiendrébègo, 2006). Les tests sérologiques ont ainsi permis de confirmer la présence du PaLCV dans les échantillons de feuilles de papayer.

Distribution du PaLCV au Burkina.

Les prospections pour identifier le virus de l'enroulement des feuilles du papayer ont pu être réalisées dans très peu de localités. Le virus a été identifié dans les échantillons collectés au sud – ouest du pays (Vallée du Kou, Bobo-Dioulasso, Toussiana) et au centre (Koubri, Kombissiri). Des prospections de plus grande envergure doivent être effectuées pour rechercher la présence du virus dans les autres parties du pays. Ces prospections devraient aussi s'étendre à d'autres pays en raison des problèmes de pullulations des mouches blanches dans plusieurs pays d'Afrique de l'ouest (Otoïdobiga, 2003).

Recommandations de lutte contre le PaLCV

Le virus de l'enroulement des feuilles du papayer vient d'être signalé au Burkina. Les travaux doivent se poursuivre pour une meilleure connaissance du virus et de ses effets sur les pertes de production de papaye. La dissémination du virus pourrait être réduite avec l'éradication des plants infectés de papayer. Comme pour les autres virus du papayer, des sources de résistance au PaLCV doivent être recherchées.

Références bibliographiques

- Fermin G, Gonzalves D (2003). Engineering resistance against papaya ringspot virus by native, chimeric and synthetic transgenes. Pages 497-518 in: Loebenstein G, Tottappilly G (eds). Virus and virus-like diseases of major crops in developing countries. Kluwer Academic Publishers.
- Otoïdobiga LC (2003). Biology and Control Strategies for Whitefly (*Bemisia tabaci* Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae) Populations in Burkina Faso (West Africa). Thèse de PhD, Université McGill, Canada.
- Taylor DR (2003). Virus diseases of *Carica papaya* in Africa- their distribution, importance and control. Pages 25-32 in Hughes J d'A, Odu BO (eds). Plant virology in Sub-saharan Africa. Proceedings of a conference organized by IITA.
- Tiendrébègo F (2006). Identification sérologique et moléculaire de bégomovirus au Burkina Faso. Mémoire de DEA, Université de Ouagadougou, Burkina Faso.
- Wang X, Xie Y, Zhou X (2004). Molecular characterization of two distinct begomoviruses from papaya in China. *Virus Genes* 29: 303-309.

ANNEXE 4

Fiche technique 4 : L'espèce sauvage du manioc (*Manihot glaziovii*) hôte de l'ACMV au Burkina Faso.

L'espèce sauvage du manioc (*Manihot glaziovii*) hôte de l'ACMV au Burkina Faso

Fidèle Tiendrébéogo¹, Edgar V.S. Traoré³, Nicolas Barro¹, Jean Michel Lett², Alfred S. Traoré¹ & Oumar Traoré²

¹Laboratoire de Biochimie & Biologie Moléculaire, CRSBAN/UFR/SVT, Université de Ouagadougou 03 BP 7021 Ouagadougou 03, Burkina Faso

²CIRAD, UMR 53 PVBMT CIRAD-Université de la Réunion, Pôle de Protection des Plantes,

7 Chemin de l'IRAT, 97410 Saint Pierre, La Réunion, France

³Institut de l'Environnement et de Recherches Agricoles (INERA)

01 BP 476 Ouagadougou 01, Burkina Faso

Introduction

La maladie de la mosaïque du manioc constitue une contrainte majeure pour la production du manioc en Afrique subsaharienne. Les pertes annuelles causées par le complexe de virus causant cette maladie sont estimées à plus de 1,5 milliards de dollar (Legg *et al.*, 2006; Thresh *et al.*, 1997). Ce complexe de virus comprend sept espèces de *Begomovirus* dont les trois principaux sont le *African cassava mosaic virus* (ACMV), le *East african cassava mosaic virus* (EACMV) et le *South african cassava mosaic virus* (SACMV) (Bull *et al.*, 2006). Ces *Begomovirus* se transmettent par l'insecte vecteur *Bemisia tabaci* Gennadius mais aussi par les boutures des plantes infectées.

Le rôle des mauvaises herbes dans la propagation et le maintien de ces virus dans l'environnement est à élucider. Nos travaux de caractérisation des *Begomovirus* du manioc au Burkina Faso, nous ont conduit à rechercher le virus sur l'espèce sauvage du manioc (*Manihot glaziovii*).

Description des symptômes

Les mouches blanches ont été observées sur les jeunes feuilles des plantes malades observées à Ouagadougou. Les symptômes de mosaïque jaune avec déformation de la base du limbe ont été observés (Photo ci dessous).

Symptômes de mosaïque avec déformation des feuilles observées sur *Manihot glaziovii*



Caractérisation du virus

L'ADN total des feuilles des plants de l'espèce sauvage du manioc a été extrait à l'aide du kit DNeasy (Qiagen, France). Les amorces dégénérées VD360/CD1266 (Delatte *et al.*, 2005) ont permis de détecter la présence de *Begomovirus*. L'ADN génomique (ADN-A) a été amplifié à l'aide du Kit Templi Phi (Amersham, Bioscience), digéré par l'endonucléase *Bam*HI et cloné dans le

vecteur pGEM-3Zf (+) (Inoue-Nagata *et al.*, 2004).

Après séquençage, une séquence de 2782 bp a été obtenue avec succès. Cette séquence présente une identité nucléotidique de 96,84% avec l'ACMV-[BF:Kam:08] (FM877473) et seulement 72,04% avec l'EACMV-UG[BF:Kou:08] (FM877474). Ces résultats suggèrent que l'espèce sauvage du manioc est infectée par l'ACMV. Des résultats similaires de caractérisation de l'ACMV sur *Manihot glaziovii* ont été rapportés au Nigéria (Alabi *et al.*, 2008).

Les mauvaises herbes peuvent servir d'hôtes réservoirs ou alternatifs des Begomovirus. La recherche de ces hôtes permettront de comprendre l'épidémiologie des maladies causées et leur mode de maintien dans l'environnement.

Références bibliographiques

- Alabi O.J., Ogbe F.O., Bandyopadhyay R., Kumar P. L., Dixon A. G. O., Hughes J. d'A., Naidu R. A. (2008). Alternate hosts of African cassava mosaic virus and East African cassava mosaic Cameroon virus in Nigeria. *Arch. Virol.* 153: 1743-1747.
- Bull S.E., Briddon R.W., Sserubombwe W.S., Ngugi K., Markham P.G., Stanley J. (2006). Genetic diversity and phylogeography of cassava mosaic viruses in Kenya. *J. Gen. Virol.* 87:3053-3065.
- Delatte H., Martin D.P., Naze F., Golbach R.W., Reynaud B., Peterschmitt M., Lett J. M. (2005). South West Indian Ocean islands tomato begomovirus populations represent a new major monopartite begomovirus group. *J. Gen. Virol.* 86: 1533-1542.
- Inoue-Nagata A.K., Albuquerque LC, Rocha WB, Nagata T (2004). A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage ϕ 29 DNA polymerase. *Journal of Virological Methods* 116:209-211.
- Legg J.P., Owor B., Sseruwagi P., Ndunguru J. (2006). Cassava mosaic virus disease in east and central Africa: epidemiology and management of a regional pandemic. *Adv Virus Res* 67:355-418.
- Thresh J.M., Otim-Nape G.W., Legg J.P., Fargette D. (1997). African cassava mosaic virus disease: the magnitude of the problem. *AJRTC* 2:13-1

ANNEXE 5

Fiche technique 5 : Identification sérologique et moléculaire de *Begomovirus* sur deux herbes sauvages (*Sida acuta* et *Ageratum conyzoides*) et une plante ornementale (*Erythrina indica* var *picta*) au Burkina Faso.

Identification sérologique et moléculaire de *Begomovirus* sur deux herbes sauvages (*Sida acuta* et *Ageratum conyzoides*) et une plante ornementale (*Erythrina indica* var *picta*) au Burkina Faso

Fidèle Tiendrébéogo¹, Edgar V.S. Traoré², Jean Michel Lett², Alfred S. Traoré¹, Nicolas Barro¹ & Oumar Traoré²

¹Laboratoire de Biochimie & Biologie Moléculaire, CRSBAN/UFR/SVT, Université de Ouagadougou 03 BP 7021 Ouagadougou 03, Burkina Faso

²CIRAD, UMR 53 PVBM CIRAD-Université de la Réunion, Pôle de Protection des Plantes,

7 Chemin de l'IRAT, 97410 Saint Pierre, La Réunion, France

³Institut de l'Environnement et de Recherches Agricoles (INERA)

01 BP 476 Ouagadougou 01, Burkina Faso

Introduction

Les *Begomovirus* (Famille *Geminiviridae*) ont émergé ces dernières années comme étant économiquement dommageables pour des cultures comme le haricot, le manioc, le coton, le tabac, le piment et la tomate (Rojas *et al.*, 2005).

Au Burkina Faso, Ces virus sont bien dissimulés dans la nature et se propagent très rapidement dès la reprise de la production maraîchère. Les mauvaises herbes sont alors fortement suspectées pour leur rôle de hôte réservoir ou alternatif pour plusieurs *Begomovirus* (Huang et Zhou, 2006).

Ce travail vise à rechercher les mauvaises herbes et les plantes ornementales hôtes de *Begomovirus* qui poussent autour des parcelles de production maraîchère.

Description des symptômes

Des symptômes d'enroulement en cuillère de la feuille, avec épaissement vert sombre et saillis des nervures ont été fréquemment observés sur *Sida acuta*. Dans la famille des *Asteraceae*, *Ageratum conyzoides* a été observé avec des symptômes de l'enroulement des feuilles bien nets, mais sans chlorose. Une espèce ornementale appelée *Erythrina indica* var *picta* a été observé avec des symptômes de mosaïque jaune, de déformation et gaufrage foliaire.

a) *Ageratum conyzoides* sain



b) *Ageratum conyzoides* présentant des symptômes



c) Plant de *Erythrina indica* sain



d) Taches de mosaïque jaunes
Erythrina indica malade



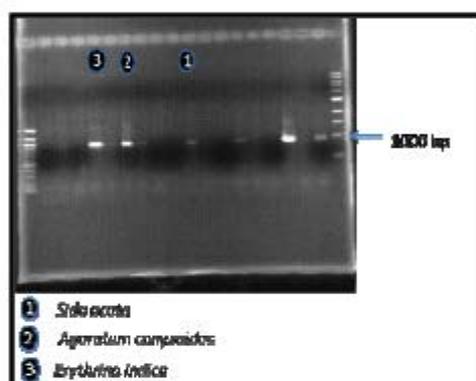
Diagnostic sérologique et moléculaire

Les plantes malades ont été testées par la méthode immunoenzymatique ELISA. L'utilisation du test ELISA avec des anticorps anti-OLCV-B3 et anti-ACMV-Biotinylé, a mis en évidence la présence de *Begomovirus* dans les échantillons de *Sida acuta*, *Ageratum conyzoides* et *Erythrina indica*. En effet, la plupart des extraits des plantes avec symptômes d'enroulement de feuilles, ont réagi positivement avec l'anticorps polyclonal anti-ACMV biotinylé et avec l'anticorps monoclonal anti-OLCV B3. Ces réactions positives indiquent clairement que les symptômes observés ont été induits par des *Begomovirus*.

L'ADN total des feuilles des échantillons positifs en ELISA a été extrait à l'aide du kit DNeasy (Qiagen, France). La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) conduite avec les amorces VD360/CD1266 a permis de visualiser des signaux d'amplification d'environ 906 bp (Delatte *et al.*, 2005).

Ce résultat confirme bien que les deux plantes sauvages (*Sida acuta* et *Ageratum conyzoides*) et la plante ornementale (*Erythrina indica*) sont bien infectées par un virus du genre *Begomovirus*.

Le nombre de mauvaises herbes rapportées comme hôtes de *Begomovirus* est en constante augmentation (Huang et Zhou, 2006).



Electrophorégramme présentant les signaux de détection de *Begomovirus* dans les trois plantes.

Sida acuta est connu comme hôte du *Cotton leaf curl Gezira virus* (Fauquet *et al.*, 2008), un *Begomovirus* très répandu en Afrique sur le gombo (Shih *et al.*, 2009; Kon *et al.*, 2009). Cette herbe est très résistante à la sécheresse et pourrait maintenir le virus pendant la saison sèche. La présence de *Begomovirus* a aussi été rapporté sur *Ageratum conyzoides* en Chine (Huang et Zhou, 2006). Quant à *Erythrina indica*, c'est la première fois à notre connaissance qu'un *Begomovirus* est

détecté sur la plante. Les travaux se poursuivent pour la recherche des espèces bégomovirales associées à ces maladies.

Références bibliographiques

- Delatte H., Martin D.P., Naze F., Golbach R.W., Reynaud B., Peterschmitt M., Lett J. M. (2005). South West Indian Ocean islands tomato begomovirus populations represent a new major monopartite begomovirus group. *J. Gen. Virol.* 86: 1533-1542.
- Fauquet C.M., Briddon R.W., Brown J.K., Moriones E., Stanley J., Zerbini M., Zhou X. (2008). Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Arch. Virol.* 153: 783-821.
- Huang J.F., Zhou X.P. (2006). Molecular characterization of two distinct *Begomovirus* from *Ageratum conyzoides* and *Malvastrum coromandelianum* in China. *J. Phytopathology* 154: 648-653.
- Kon T., Rojas M.R., Abdourhamane I.K., Gilbertson R.L. (2009). Roles and interactions of begomoviruses and satellite DNAs associated with okra leaf curl disease in Mali, West Africa. *J. Gen. Virol.* 90: 1001-1013.
- Rojas M.R., Hagen C., Lucas W.J., Gilbertson R.L. (2005). Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43: 361-394.
- Shih S.L., Kumar S., Tsai W.S., Lee L.M., Green S.K. (2009). Complete nucleotide sequences of okra isolates of Cotton leaf curl Gezira virus and their associated DNA- β from Niger. *Arch. Virol.* 154: 369-372.

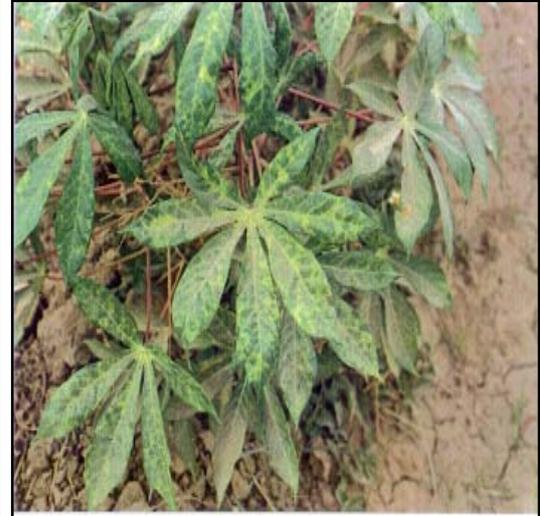
Annexe 6

Quelques symptômes causés par des *Begomovirus*

Quelques symptômes causés par des *Begomovirus*



Symptômes d'enroulement et de jaunissement des feuilles de la tomate



Taches jaunes causées par le virus de la mosaïque africaine du manioc



Fruits de plants sains de gombo



Fruits nains de plants malades de gombo



Fruits tordus de plants malades de gombo

Annexe 7

Composition de quelques tampons utilisés

1. Tampons utilisés en ELISA

- **PBS (Phosphate Buffured Salin) pH7, 4**

Dissoudre dans 900ml d'eau distillée:

Chlorure de sodium (NaCl)	8 g
Phosphate de potassium monobasique (KH ₂ PO ₄)	0,2 g
Phosphate de sodium dibasique (Na ₂ HPO ₄ , 2H ₂ O)	1,44 g
Chlorure de potassium (KCl)	0,2 g
Azide de sodium (NaN ₃)	0,2 g

Ajuster le pH à 7,4 et compléter le volume à 1 litre avec l'eau distillée.

- **PBS-Tween (PBS-T)**

Utilisé pour le rinçage des plaques.

0,50 ml de tween 20 (C₅₈H₁₁₄O₂₆) dans un litre de PBS.

- **Tampon de coating : tampon carbonate 50 Mm pH 9,6**

Dissoudre dans 900ml d'eau distillée :

Carbonate de sodium (Na ₂ CO ₃)	1,59 g
Bicarbonate de sodium (NaHCO ₃)	2,93 g
Azide de sodium (NaN ₃)	0,2 g

Ajuster le pH et compléter à 1 litre avec de l'eau distillée.

- **Tampon substrat**

Diéthanolamine (C ₄ H ₁₁ NO ₂)	97 ml
Eau (H ₂ O)	800 ml
Azide de sodium (NaN ₃)	0,2 g

Ajuster le pH à 9,8 avec du HCl et compléter à 1 litre avec de l'eau distillée.

- **Tampon d'extraction des *Geminivirus* : Tris-HCl 50 mM pH 8,5**

Dissoudre dans 900ml d'eau distillée :

Tris-HCl ou Trizma base (C ₄ H ₁₁ O ₃)	6,05 g
Sulfite de sodium (Na ₂ SO ₃)	5,70 g
Polyvinyl pyrrolidone (PVP)	20 g

Ajuster le pH à 8,5 et compléter le volume à 1 litre avec de l'eau distillée.

- **Tampon anticorps :**

Dissoudre dans le PBS-T :

PVP	2%
Lait écrémé	0,6%

2. Tampons utilisés en diagnostic moléculaire

Composition du tampon CTAB

Pour 100 ml:

Cétyl Triméthyl Ammonium Bromide 2%	2 g
NaCl 1,4 M	46 ml de NaCl 3M
β-mercapto-éthanol 0,2%	200 µl
EDTA 20 mM	4 ml de EDTA 4M
Tris HCl pH=8 100 mM	20 ml HCl 0,5 M
Protéinase K 0, 1 mg/ml	10 mg
H ₂ O	q.s.p 100 ml

Tampons utilisés pour les électrophorèses

Tampon TBE 10X (pH 8,5)

Dans 1 litre d'eau distillée

Tris Base	108 g
Acide Borique	55 g
EDTA solution mère 0,5 M pH 8	40 ml

Tampon TAE 50X

Tris Base	242 g
Acide acétique	57,1 ml
EDTA solution mère 0,5 M pH 8	100 ml

Ajuster à pH 8,5 avant de compléter à 1 litre avec de l'eau distillée.