Université de Pau et des Pays de l'Adour
Faculté des Sciences
Département de Biologie

Diplôme d' Etudes Supérieures Spécialisées (DESS)

Protection et Valorisation du Végétal

Promotion 1999/2000

Laetitia THORNARY

Caractérisation de la diversité génétique et biologique de *Bemisia tabaci* Gennadius à la Réunion

Stage réalisé au sein du

Centre de Coopération Internationale en Recherche
Agronomique pour le Développement
CIRAD-AMIS
Saint-Pierre, La Réunion, France

Sous la direction de Monsieur B. REYNAUD

Université de Pau et des Pays de l'Adour
Faculté des Sciences
Département de Biologie

Diplôme d' Etudes Supérieures Spécialisées (DESS)

Protection et Valorisation du Végétal

Promotion 1999/2000

Laetitia THORNARY

Caractérisation de la diversité génétique et biologique de *Bemisia tabaci* Gennadius à la Réunion

Stage réalisé au sein du :

Centre de Coopération Internationale en Recherche
Agronomique pour le Développement
CIRAD-AMIS
Saint-Pierre, La Réunion, France

Sous la direction de Monsieur B. REYNAUD

Le document ci-joint est le résultat d'un travail effectué par un étudiant de DESS. Il est tel qu'il a été remis par l'étudiant et ne comporte aucune correction ni commentaire. Il doit être considéré comme un exercice de formation.

Remerciements

Je remercie tout particulièrement Bernard Reynaud, Entomologiste, pour la confiance et l'autonomie qu'il m'a accordée tout au long de cette étude.

Je remercie de la même manière Michel Peterschmitt, Virologue, et Martine Granier, Technicienne, pour toute l'aide qu'ils m'ont apportée en ce qui concerne la partie génétique de l'étude.

Mes remerciements vont aussi à Martial Grondin, Technicien et à Jérôme Lambion, Volontaire à l'Aide Technique, pour leurs conseils, leur esprit critique, et leurs remarques judicieuses qui furent très précieuses.

Je tiens également à remercier Frédéric Chiroleu, Biostatisticien, Lionel Gagnevin, Phytopathologiste, pour leur aide lors de l'analyse des données et Philippe Ryckewaert, Entomologiste, pour la mise au point de protocoles.

Le stage et le séjour sur l'île n'auraient pas été les mêmes sans mes colocataires ni les VATs, en particulier Henri, Sébastien, Caroline, Thuy, Dominique, Olivier et Frédéric, ainsi qu' Isabelle, Pierre-François, Bénédicte et Clémentine. Merci pour tous les bons moments passés.

PLAN

Introduction 1

1. Généralités 2

1-1. Présentation de l'organisme d'accueil et du lieu d'étude 2
1-1-1. Le CIRAD 2
1-1-2. L'île de la Réunion 3
1-2. *Bemisia tabaci* Gennadius 4
1-2-1. Taxonomie, origine 4
1-2-2. Description 4
1-2-3. Biologie de Bemisia tabaci 5
1-2-4. Distribution et Plantes hôtes 6
1-2-5. Techniques de lutte contre ce ravageur 6
1-3. Le TYLCV 7
1-3-1. Symptomatologie 7
1-3-2. Classification et variabilité 7
1-3-3. Biologie du virus 8
1-3-4. La transmission du TYLCV 9

2. Matériels et Méthodes 10

2-1. Matériel 10
2-1-1. Prospection des souches d'origine 10
2-1-2. Conditions d'élevages 11
2-2. Méthodes 11
2-2-1. Technique moléculaire 11
2-2-2. Analyse de la diversité génétique : représentation arborée de Neighbors joining 12
2-2-3. Test de Fécondité 14
2-2-4. Test de transmission 14

3. Résultats et Discussion 18

3-1. Diversité génétique de *B. tabaci* 18
3-1-1. Analyse de la diversité en génération G0 et G1 18
3-1-2. Vérification de l'homogénéité génétique des lignées 20
3-1-3. Discussion sur l'analyse génétique 22
3-2. Analyse de la diversité biologique de *B. tabaci* 23
3-2-1. Test de Fécondité 23
3-2-2. Discussion 25
3-2-3. Test de transmission du TYLCV 26
3-2-4. Discussion 27

Conclusion 28

Bibliographie 30

Annexes

Introduction

Depuis 1997, des symptômes d'origine virale ont été constatés sur des tomates de plusieurs exploitations de l'île de la Réunion. Après analyse, il s'est avéré que ce virus était le TYLCV (Tomato Yellow Leaf Curl Virus) ou « agent de la maladie des feuilles jaunes en cuillère de la tomate », transmis par l'aleurode *Bemisia tabaci* Gennadius.

Le TYLCV constitue un problème majeur affectant la production de tomate dans de nombreux pays. Décrit pour la première fois au Moyen-Orient, il a été signalé depuis dans de nombreuses régions tropicales et subtropicales et il est également présent en Europe depuis une dizaine d'années. La rapidité de l'expansion géographique de ce virus semble lié à l'apparition, dans les années 80, d'un biotype particulier de *B. tabaci* (Costa & Brown, 1991)

Cet aleurode est connu depuis 1938 à la Réunion, mais depuis 1997, les niveaux de population ont augmenté et les dégâts sur les cultures ont été plus importants (Peterschmitt *et al.*, 1999)

Dès 1998, un groupe de travail s'est constitué, associant la SPV (Service de la Protection des Végétaux), l'ARMEFLHOR (Association Réunionnaise pour la Modernisation de l'Economie Fruitière, Légumière et Horticole), le CIRAD (Centre international en Recherches Agronomiques pour le Développement), la FDGDEC (Fédération Départementale des Groupements de Défense contre les Ennemis des Cultures), le SUAD de la Chambre d'agriculture (Service d'Utilité Agricole de Développement).

Ce groupe de travail a été chargé de réaliser un programme de recherche et de développement pour proposer des méthodes de lutte adaptées à ce virus et à son vecteur.

Le but de l'étude actuelle est d'approfondir les connaissances sur la diversité génétique des *Bemisia tabaci* sur l'île, en fonction des plantes hôtes, et de voir si les différences moléculaires correspondent à des différences biologiques d'intérêt agronomique.

Pour cela, des lignées isofemelles seront crées, à partir d'individus prélevés sur différentes plantes hôtes, des tests de fécondité et de transmission du TYLCV seront réalisés.

GENERALITES

1-1. Présentation de l'organisme d'accueil et du lieu d'étude

1-1-1. Le CIRAD

Le Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement est un Etablissement Public à caractère Industriel et Commercial dont la direction générale est basée à Paris. Il a été crée en 1984, lors de la fusion des anciens Instituts Tropicaux, et coopère aujourd'hui avec plus de 90 pays d'Afrique, d'Asie, du Pacifique, d'Amérique Latine, et d'Europe. C'est à Montpellier qu'est situé un centre de recherche, de formation, d'appui technique et de documentation. De nombreuses antennes ou stations sont présentes dans les DOM-TOM et différents pays étrangers. Son but est avant tout de servir l'Agriculture et l'Elevage grâce à la mise en œuvre de programmes de recherche agronomique appliquée. Son budget s'est élevé en 1999 à 1 milliard de francs (152 millions d'euro).

Le financement du CIRAD à la Réunion provient du Budget Civil de la Recherche et du Développement (BCRD) pour environ 53%, le reste est assuré par le Conseil Régional (20%) et le Conseil Général (10%) de la Réunion, ainsi que d'autres conventions (17%) (Europe, Etat, Privés).

Les recherches effectuées ont pour objectifs de développer l'agriculture locale, et d'améliorer les connaissances pour servir ensuite au développement des pays de la zone tropicale, en collaboration avec les pays voisins de l'Océan Indien (Maurice, Madagascar, Comores...). Dans ce cadre là, un programme a été défini pour la période de 2000-2006, visant à favoriser la coopération dans les pays de l'Océan Indien. Au sein même de la Réunion, une réflexion sur les thématiques d'intérêt commun aux différentes filières de productions végétales a été développée par les organismes travaillant dans le domaine agricole pour le développement (le Service de la Protection des Végétaux et la fédération Départementale des Groupements de Défense des Cultures), et pour la recherche le CIRAD, l'INRA et l'Université. Cette démarche a abouti à la création d'un même laboratoire appelé Pôle de Protection des Plantes. Ce laboratoire sera opérationnel fin 2001.

Le CIRAD-Réunion est divisé en six pôles : canne à sucre, fruits légumes et plantes aromatiques, agriculture durable environnement et forêt, élevage, agro-alimentaire et protection des cultures. D'autre part les six départements suivants du cirad sont présents à la Réunion c'est-à-dire :

- CIRAD-AMIS : Appui Méthodologique à l'Innovation Scientifique
- CIRAD-CA : Cultures Annuelles
- CIRAD-FLHOR : Productions Fruitières et Horticoles
- CIRAD-EMVT : Elevage et Médecine Vétérinaire
- CIRAD-FORET : Gestion des forêts, qualité des bois, pépinière
- CIRAD-TERA : Systèmes agro-alimentaires et ruraux

Le stage s'est déroulé au sein du pôle de protection des plantes rattaché au CIRAD-AMIS, sur la station de Ligne Paradis, à Saint-Pierre.

1-1-2. L'île de la Réunion

L'île de la Réunion est un département français d'Outre-Mer situé dans le Sud-Ouest de l'Océan Indien, par 21°06' de latitude Sud, et 55°32' de longitude. Cette île volcanique, âgée de trois millions d'années, a une superficie de 2512 km², elle appartient à l'archipel des Mascareignes comprenant également l'île Maurice et l'île Rodrigues.

Le Piton des neiges, point culminant de l'île à 3069 m, est le massif à l'origine de l'île ; il est éteint depuis 20 000 ans. Du fait de la présence d'un point chaud, c'est le Piton de la Fournaise (2632 m), plus récent, qui est actuellement en activité.

1-1-2-1. Présentation physique

Le relief de l'île est très accentué, et se caractérise par une chaîne montagneuse s'étendant sur un axe Nord-Ouest/Sud-Est au centre de l'île, ce qui a pour conséquence de diviser l'île en deux régions (Raunet, 1991) :

- l'une chaude et humide, dite « au vent », orientée nord-est face aux alizés, reçoit 70 % des précipitations (3 à 10 m/an)
- l'autre chaude et sèche, appelée la côte « sous le vent », orientée sud-ouest, reçoit moins de 2 m/an de pluies, et de répartition très irrégulière

De plus, ce type de relief est à l'origine d'une multitude de microclimats et de la distinction entre les Hauts et les Bas de l'île, la limite se situant vers 500 m d'altitude.

Malgré ces microclimats, il ressort un climat dominant sur l'île marqué par deux saisons :

- l'hiver austral, de mai à novembre, frais et sec,
- l'été austral, de décembre à avril, nettement plus chaud et pluvieux avec des précipitations extrêmes et des phénomènes cycloniques

1-1-2-2. L'agriculture réunionnaise

L'économie réunionnaise se caractérise par un large déséquilibre, car la demande finale locale excède les ressources produites localement.

Parmi les filières, la canne à sucre occupe une place déterminante car elle représente encore en 1998 59 % de la Surface Agricole Utile (SAU), et concerne plus de la moitié des exploitations (Agreste, 1998). Cependant d'autres activité se sont développées, dont l'élevage, les cultures hors-sol et le maraîchage. Le secteur des fruits légumes connaît un fort développement et représente aujourd'hui en valeur, plus du tiers de la production agricole totale. En revanche, les productions traditionnelles, telles que le géranium , le vétiver et la vanille sont en régression structurelle forte , la vanille, quant à elle, maintient sa production depuis 1996 (Agreste, 1998).

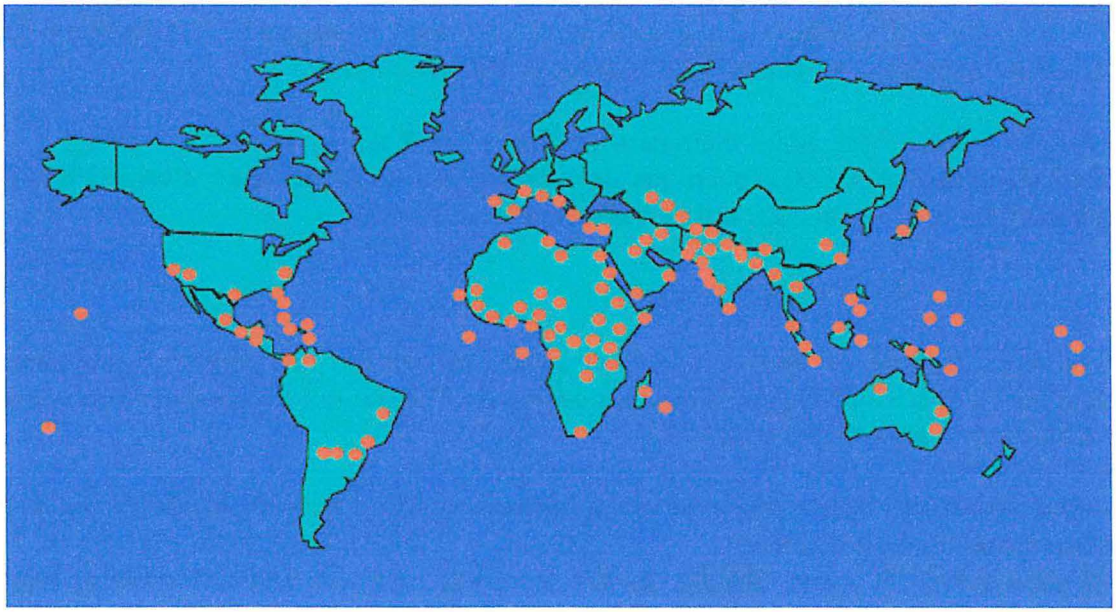


Figure 1: Distribution mondiale de *Bemisia tabaci*

Photo 1 : Adulte de *Bemisia tabaci*
(ph. J.F. Vayssières)

1-2. *Bemisia tabaci* Gennadius

1-2-1. Taxonomie, origine

B.tabaci appartient à la sous-famille des Aleyrodinae, à la famille des Aleyrodidae, il peut être classé soit dans le sous-ordre des Homoptères, il appartient alors à l'ordre des Hemiptères, soit dans le sous-ordre des Sternoerhyncha, il appartient alors à l'ordre des Homoptères (Greathead, 1986).

B. tabaci, tout comme les autres aleurodes sont communément appelés « mouches blanches » en raison du dépôt cireux blanc qui recouvre entièrement le corps et les ailes de l'adulte.

Il a été décrit pour la première fois en tant que *Aleurodes tabaci*, sur le tabac en Grèce (Gennadius, 1899), mais la corrélation entre sa morphologie et la diversité de ses différentes plantes hôtes ont fait qu'il eu beaucoup de synonymes. Ainsi, il est communément appelé « tobacco, cotton, ou encore sweetpotato whitefly ».

Il est considéré comme probablement originaire de l'Inde ou du Pakistan. Il a ensuite progressé vers les zones tropicales et subtropicales de l'Ancien et du Nouveau Monde. Dans les années 80, il a été décrit dans des zones plus tempérées telles que l'Europe notamment l'Espagne, l'Italie ou encore le sud de la France (figure 1).

Mais depuis 1986, les Etats de Californie, d'Arizona ou de Floride connaissent une aggravation du problème due à cet insecte. Plusieurs hypothèses ont été évoquées expliquant cette situation : les changements de pratiques agricoles, l'utilisation de nouveaux insecticides , l'accroissement de monocultures irriguées, ou encore les échanges constants de matériel végétal entre différents pays, mais actuellement c'est l'hypothèse de l'apparition d'un nouveau biotype, beaucoup plus polyphage qui est privilégiée (Perring *et al.*, 1993).

1-2-2. Description

L'adulte possède deux paires d'ailes identiques qui recouvrent l'abdomen quand il est au repos. La nervation de ces ailes est réduite. Les antennes sont filiformes et possèdent sept articles. Les pièces buccales sont de type piqueur-suceur. La taille des adultes est en moyenne de 0.85 mm en ce qui concerne la longueur du corps chez le mâle, et de 0.91 mm chez la femelle. L'envergure est en moyenne de 1.81 mm pour le mâle, et de 2.13 mm pour la femelle (photo 1).

L'œuf est de forme ovale, de dimension 0.2 mm x 0.1 mm. Il est situé sur la surface inférieure des feuilles, et est accroché dans le mésophylle, au travers de l'épiderme foliaire. Il est tout d'abord de couleur crème, recouvert de la substance blanche des ailes de la femelle. Il change progressivement de couleur pendant le développement larvaire, il prend une couleur jaune-marron juste avant l'éclosion, et possède alors une paire d'yeux visibles sous forme de deux points rouges à travers le chorion (Ryckewaert, 1998).

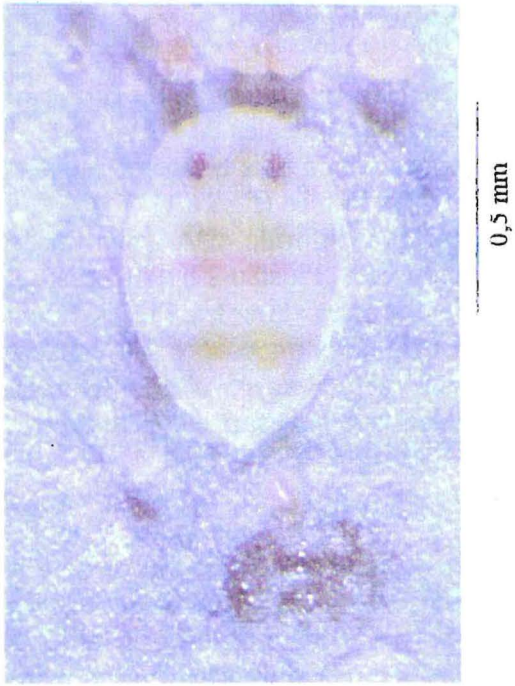


Photo 2 : Dernier stade larvaire de *Bemisia tabaci*

1-2-3. Biologie de *B .tabaci*

1-2-3-1. Cycle de vie

B. tabaci a une durée de vie comprise entre 17 et 27 jours, suivant la plante hôte, les conditions de températures et d'humidité. Les températures idéales de développement se situent entre 16°C et 28°C, les températures inférieures à 9°C et supérieures à 40°C sont létales pour l'insecte. L'optimum d'humidité relative est de 30 à 70 %.(Ryckewaert, 1998)

L'accouplement a lieu quelques heures à quelques jours après l'émergence des adultes. Les femelles fécondées ont une descendance bisexuée, tandis que les non fécondée réalisent une fécondation arrhénotoque. Elles ne donnent alors que des mâles. La sex ratio est généralement de 1 : 1, mais varie suivant les conditions environnementales, et l'âge de la femelle. Ainsi les jeunes femelles donneront plus de femelles que les plus âgées. (Picó, 1996).

Les adultes se nourrissent et pondent de préférence sur les jeunes feuilles. Ainsi les adultes, les œufs et les jeunes larves se retrouvent sur la partie apicale de la plante, alors que les pupes et les adultes récemment émergés sont plutôt sur les parties basses.

Il existe 4 stades larvaires :

- le premier appelé « crawler » est le seul stade mobile. Le déplacement est très limité ; la larve ne peut pas aller sur une autre feuille sauf si la ponte a lieu sur une feuille qui devient sénescente. Le déplacement permet à la larve de trouver l'endroit adéquat pour se fixer et se nourrir.
- les second et troisième stades sont équivalents, ils se différencient essentiellement par leur taille.
- le dernier stade larvaire est caractérisé par l'apparition des yeux (photo 2). Il se divise en deux parties, la première où la larve continue de se nourrir et la seconde où la larve est appelée préimaginale, il n'y a alors plus de prise alimentaire et pendant laquelle on observe un gonflement du corps accompagné d'un grossissement des yeux (Lopez-Avila, 1986).

Les adultes se nourrissent dans le phloème après avoir pénétré dans les tissus foliaires intercellulaires grâce à leur stylet. Ce mode de nutrition permet l'acquisition et la transmission des geminivirus.

1-2-3-2. Dynamique des populations

Les adultes de *B. tabaci* peuvent réaliser des vols de courtes distances, le déplacement est limité au niveau de la plante hôte et des plantes adjacentes. Ils peuvent également se faire rapidement transporter sous l'effet du vent, ce qui favorise la dissémination du ravageur.

En région tropicale, *B. tabaci* ne se met pas en diapause, il peut infester beaucoup de plantes hôtes, et réaliser jusqu'à 15 générations en un an (Picó, 1996). Dans ces régions, les plantes hôtes et l'équilibre biologique avec les ennemis naturels sont les principaux facteurs affectant ces populations d'insectes.

Dans les régions méditerranéennes, les populations sont les plus importantes à la fin de l'été et au début de l'automne, et diminuent fortement pendant l'hiver.

1-2-4. Distribution et plantes hôtes

Il est présent sur tous les continents, avec une large répartition en zones tropicales et subtropicales.

Jusqu'à présent, le biotype connu de *B .tabaci* s'attaquait aux plantes de cultures maraîchères, à certaines plantes ornementales. En revanche, les derniers individus apparus depuis les dix dernières années, envahissent des plantes généralement non hôtes comme la vigne, l'arachide, les *Citrus* et des plantes ornementales telles que les *poinsettia (Euphorbia pulcherrima)* et *Hibiscus sp.* Ces populations de *B. tabaci* ont montré des différences par rapport à celles connues auparavant : elles seraient associées à la transmission du *squash silver leaf* (argenture de la courgette) (Costa et Brown, 1991), elles posséderaient une gamme d'hôte plus importante (Byrne et Miller, 1990), elles absorberaient une plus grande quantité de sève, ce qui aurait pour conséquence des dépôts de miellat plus importants (Byrne *et al.*, 1992).

Ces différences ont fait penser qu'il pouvait s'agir de deux espèces distinctes, comme l'ont suggéré Perring *et al.* en 1993, après avoir essayé en vain de réaliser un croisement entre ces deux biotypes. En revanche, des études moléculaires réalisées par les techniques de RAPD-PCR, l'utilisation de marqueurs de séquence du gène codant pour la cytochrome-oxydase ou pour la sous-unité 16S du RNA mitochondrial ont démontré le contraire. Ces dernières ont permis d'identifier dans une même région plusieurs biotypes très distincts, de plus un polymorphisme moléculaire a été montré différenciant certaines souches, suivant la nature de la plante hôte et la zone géographique (Menozzi,1997)

B. tabaci possède un très large spectre d'hôte avec plus de 500 espèces de plantes appartenant à 74 familles différentes. Les Leguminosae, Compositae, Solanaceae, Euphorbiaceae, Cucurbitaceae, Malvaceae et Convolvulaceae sont les familles les plus représentées (Greathead, 1986)

Cet insecte est considéré comme ravageur de culture car il peut nuire à son hôte en agissant de manière directe car son mode de nutrition de type piqueur-suceur fait qu'il prélève directement les éléments qui lui sont nécessaires dans le phloème, ce qui provoque un affaiblissement de la plante hôte. De plus, les larves exsudent un miellat collant qui peut entraîner le développement de fumagines. Il peut agir également de manière indirecte, c'est-à-dire qu'il peut transmettre des virus nocifs pour les plantes. Ces virus appartiennent majoritairement au groupe des geminivirus. Les autres étant des virus filamenteux (Burban, 1991).

1-2-5.Techniques de lutte contre ce ravageur

1-2-5-1 .Lutte chimique

Plus de 50 produits commerciaux conventionnels sont requis contre *B. tabaci*, certains d'entre eux sont utilisés pour réduire la transmission du virus (Ryckewaert, 1998). Les traitements sont dirigés essentiellement contre les adultes. De nombreuses applications sont nécessaires pour réduire la population, aussi de nombreuses formes de résistance apparaissent.

Une lutte alternative a été développée utilisant des insecticides dérivés de plantes notamment de la roténone, des pyrèthres, des inhibiteurs de chitine. Des huiles minérales peuvent être utilisées pour lutter contre les formes larvaires.

Photo 3 : Symptômes du TYLCV sur tomate

Plusieurs inhibiteurs de chitine ont été crées (buprofezin, pyriproxyfen, diafenthurion et imidacloprid) avec une faible toxicité pour les parasitoïdes de *B. tabaci*.

1-2-5-2. Lutte biologique

Cette lutte utilise des ennemis naturels de *B. tabaci*. Ils sont groupés suivant leur mode d'action comme prédateurs ou parasitoïdes. Le groupe de parasitoïdes le plus intéressant est le groupe des Hymenoptères (Gerling, 1986). Il y a deux espèces appartenant à deux genres appropriées dans le contrôle biologique à la Réunion : *Encarsia formosa* et *Eretmocerus mundus*.

Pour que le contrôle biologique soit efficace, il faut connaître les interactions entre *B. tabaci* et ses ennemis naturels. Mais l'utilisation massive d'insecticides empêche le contrôle car affecte les populations de parasitoïdes.

Il n'y a pas beaucoup d'informations en ce qui concerne l'action des champignons entomopathogènes tels *Paecilomyces fumusoroseus* certains champignons occasionnels peuvent également être utilisés comme *Beauveria bassiana* ou bien *Entomophtora* sp (Cisneros & Mujica, 1998).

L'utilisation de variétés de plantes résistantes aux infestations virales représente l'approche la plus prometteuse pour le contrôle de la maladie. Ainsi, il existe à la Réunion des variétés de tomate résistantes commercialisées.

1-3. Le TYLCV

Le TYLCV (Tomato Yellow Leaf Curl Virus) ou virus des feuilles jaunes en cuillère de la tomate est un geminivirus de la tomate transmis par l'aleurode *B.tabaci*. Il cause de graves dégâts sur la tomate, ce qui provoque une baisse du rendement sur les cultures en plein champ et sous abri.

Il a été décrit la première fois en 1939-1940 en Israël, associé avec *B.tabaci*. En 1959, des champs entiers de tomates étaient détruits avec des symptômes identiques de ceux causés par le TYLCV, aux Etats-Unis (Jordan Valley). Une description de ce virus et de son vecteur a alors été faite (Picó, 1996).

1-3-1. Symptomatologie

Le TYLCV provoque un enroulement et une déformation des feuilles vers le haut (en forme de « cuillère »), un jaunissement du limbe des feuilles, une réduction de la taille des folioles, un raccourcissement des entre-nœuds entraînant un nanisme de la plante (photo 3).

La production de tomates est très réduite car les plants sont en général infestés à de jeunes stades de développement.

1-3-2. Classification et variabilité

Ce virus appartient à la famille des *Geminiviradae*, au genre des *Begomovirus* qui sont uniquement transmis par *B. tabaci*, et n'affectent que les dicotylédones. Le terme de « gemini »= jumeau vient de sa structure, composée d'un double icosaèdre.

Il existe une grande diversité au sein du TYLCV, qui peut-être la conséquence d'une évolution rapide du génome, ou bien la conséquence d'un groupement d'entités virales différentes provoquant les mêmes symptômes sur la tomate. Un gradient de similarité de la

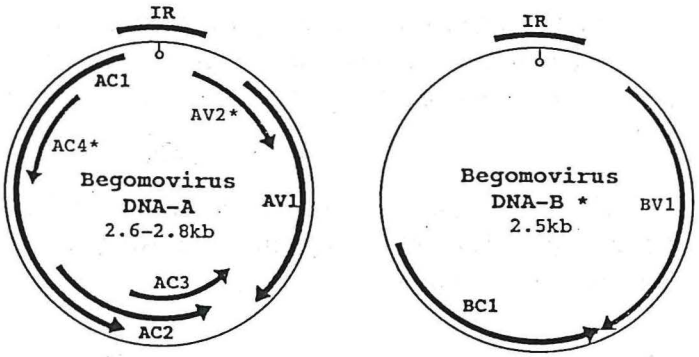


Figure 2 : Organisation du génôme du TYLCV

séquence d'acides aminés reflète la distribution géographique des différents isolats. Avec cette distribution, trois « clusters » homologues ont clairement été corrélés avec des aires géographiques définies. Les isolats du Bassin Méditerranéen ont été groupés en deux clusters, celui de l'est et de l'ouest, et le troisième groupe inclus les isolats du TYLCV décrit en Thaïlande. Les isolats du Bassin Méditerranéen présentent une forte homologie entre eux, contrairement au troisième cluster qui est plus distant (Picó, 1996).

Les isolats du TYLCV rencontrés à la Réunion se composent de deux positions nucléotidiques qui les distinguent de tous les autres isolats. Cinq positions nucléotidiques ont été décrites pour lesquelles ces isolats sont identiques à celui d'Israël, nommé TYLCV-IL. L'isolat de la Réunion provient vraisemblablement d'une seule origine géographique et d'une seule importation, et il possède une source commune avec celui d'Israël. Il est alors appelé TYLCV-IL/RE (Peterschmitt *et al.*, 1999).

1-3-3. Biologie du virus

1-3-3-1. Structure moléculaire

La taille du TYLCV est de 20 x 30 nm, il est formé de deux icosaèdres incomplets. Il est constitué à 80 % environ de protéines. La capside virale contient seulement un seul type de protéine de 30 KD.

Le génome de ces geminivirus est constitué d'une molécule à ADN simple brin circulaire (virus monopartites) ou de deux molécules de taille similaires (virus bipartites). (Bigarré, 1999) (figure 2).Les isolats d'Israël, de Sardaigne, de Sicile, d'Egypte, et d'Espagne ont une seule molécule d'ADN circulaire d'environ 2.8 Kb. L'isolat de Thaïlande est composé d'un génome bipartite, avec deux molécules circulaires d'ADN de 2.8 Kb, encapsidées séparément, nommées DNA A et DNA B. L'ADN-A possède deux ORF, notées AV1 et AV2. La première code pour une protéine non-structurale, la seconde pour l'enveloppe protéique. L'expression des deux protéines, AV1 et AV2, est nécessaire pour développer la maladie. La délétion de l'une des deux séquences entraîne une baisse d'accumulation de l'ADN viral dans la plante, et dons une diminution de l'infection virale (Picó, 1996).

1-3-3-2. Cytologie et réplication virale

La propriété distinguant le TYLCV d'un autre bégomovirus est l'invasion des cellules du mésophylle. Les particules virales peuvent s'accumuler sous forme d'agrégats, provoquant des changements cytopathologiques dans la structure nucléaire (Bigarré, 1999).

L'entrée d'un géminivirus dans une cellule végétale se fait par la blessure provoquée par le stylet de l'insecte vecteur, lors de la salivation. Après l'entrée dans la première cellule cible, l'ADN simple brin est décapsidé, puis importé dans le noyau suivant des mécanismes encore inconnus. Il y a ensuite production d'ADN double brin qui sert d'une part de matrice à la transcription de l'ADN des gènes viraux, et d'autre part à la production de copies d'ADN simple-brin. Une fois sous forme d'ADN double brin, la transcription des gènes viraux est initiée. Une étape clé dans le cycle viral réside dans la synthèse d'une protéine Rep qui catalyse la production d'ADN à partir d'ADN double brin. L'encapsidation des formes virales ADNss se fait dans le noyau, ce qui peut être observé par l'accumulation des virions sous forme de structures paracristallines.
L'insecte ingère les virions agrégés lors des piqûres d'essai dans les tissus non vasculaires, et lors de la phase d'alimentation dans les cellules phloèmiques (Bigarré, 1999) (figure 3).

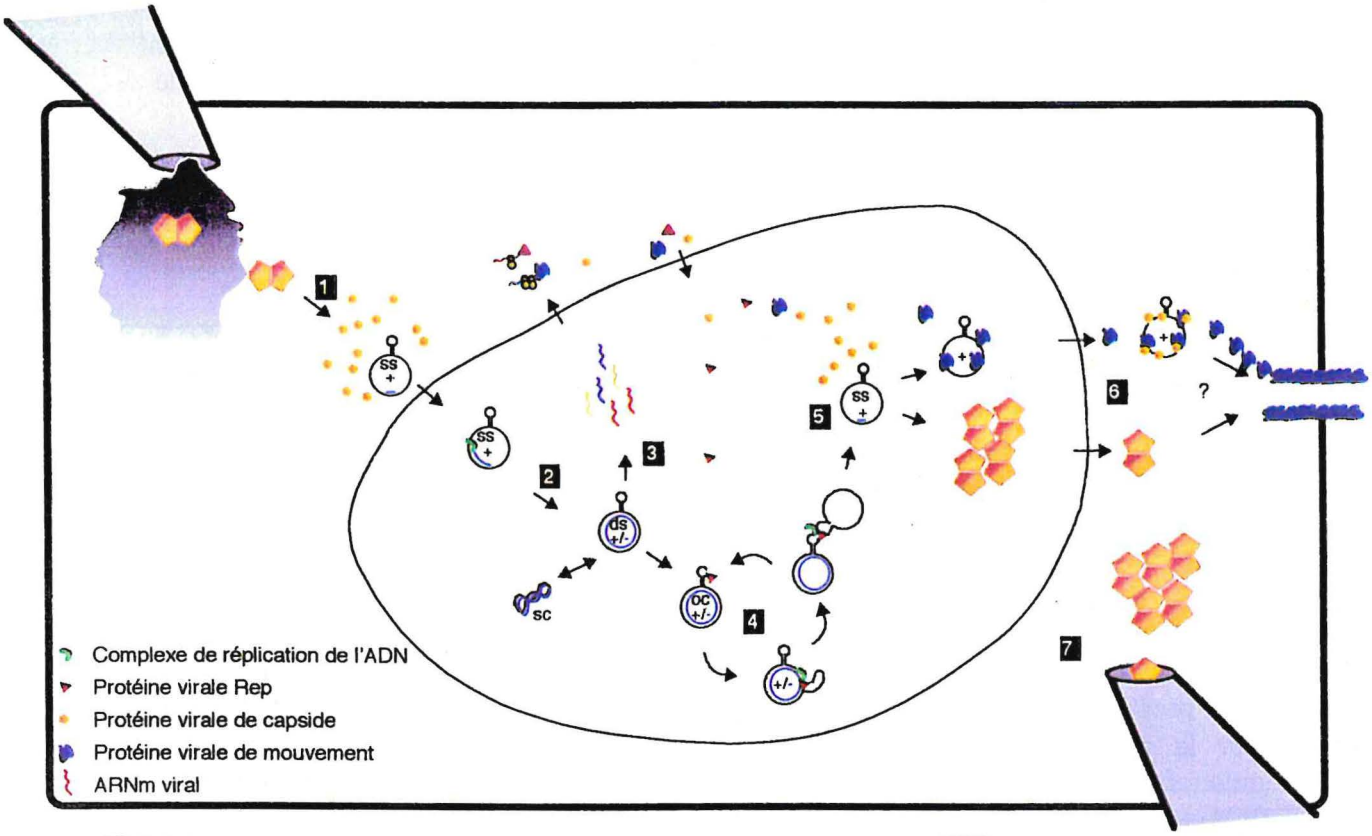


Figure 7. Schéma résumant les principales étapes du cycle des géminivirus (Bigarré, 1999) . **1.** Entrée dans la cellule avec la salive de l'insecte, décapsidation et entrée dans le noyau; **2.** Synthèse à partir d'une amorce virale d'un ADN double-brin (+/-), matrice de la transcription des ARNm et de la formation de brins génomiques (+); **3.** Transcription des ARNm du virus et traduction des protéines virales; **4.** Formation des brins (+) suivant un mécanisme en cercle-roulant; **5.** Encapsidation de l'ADN génomique; **6.** Passage de cellule-à-cellule sous forme de virion ou de complexe nucléo-protéique avec une coopération de protéines virales (?); **7.** Acquisition des virions par l'insecte. **ss** = ADN simple-brin; **ds**=ADN double-brin; **sc**=ADN super-enroulé; **oc**=ADNds ouvert coupé, **(+)**=ADN génomique viral; **(+/-)**=Intermédiaire de replication double-brin

1-3-4. La transmission du TYLCV

La transmission de ces geminivirus est vraisemblablement non-multipliante : le virus est ingéré par l'insecte, il traverse les cellules épithéliales intestinales pour se retrouver dans l'hémolymphe. Il passe ensuite dans l'épithélium des glandes salivaires où il est conservé jusqu'à ce que l'insecte ne le transmettent avec sa salive en piquant les vaisseaux conducteurs végétaux.

Le temps minimum d'acquisition du virus est de 15 à 60 minutes. La période de latence varie de 17 à 24 heures . Après ce temps, l'inoculation devient efficiente à partir d'un temps minimum variant de 10 à 30 minutes. L'ADN viral est repérable chez l'insecte 1 heure après le début de l'acquisition. Il peut être conservé jusqu'à 3 semaines au sein de l'insecte, mais l'enveloppe protéique quant à elle ne peut être conservée que 10 jours. On peut alors considérer que le vecteur est infectieux 10 à 12 jours après l'acquisition (Picó, 1996).

MATERIEL ET METHODES

Photo 4 : Pépinière insect-proof

2-1. Matériel

2-1-1. Prospection des souches d'origine

2-1-1-1. Matériel animal

Sur différentes parcelles cultivées (en ce qui concerne la tomate, le chou, la citrouille..) ou sur des plants prélevés dans les jardins créoles, sur les bordures des parcelles cultivées (pour le manioc, l'euphorbe, le coton...), des feuilles contenant des larves d'aleurodes en fin de 4e stade larvaire, sont prélevées. Ces larves sont ensuite observées à la loupe binoculaire pour l'identification de l'espèce *Bemisia tabaci*.

A ce stade, les larves ne se nourrissent plus et peuvent donc réaliser leur mue imaginale sur des feuilles coupées. L'ensemble est placé dans des boîtes plastiques ouvertes sur une des faces pour permettre une certaine aération. Du papier absorbant humide est posé sur le fond des boîtes pour éviter la dessiccation trop rapide des feuilles.

Les adultes émergent 3 ou 4 jours après, et chaque individu est placé sur un plant sain, c'est-à-dire dépourvu d'aleurode. Un couple est placé sur un plant afin de commencer une lignée.

2-1-1-2. Matériel végétal

Les plants sont obtenus soit par semis :

Tomate *Lycopersicum esculentum* (Solanacée)- variété Boa
Chou *Brassica oléracera* (Crucifère)- variété Alta
Citrouille *Cucurbita maxima* (Cucurbitacée)- récolte de graines à partir de citrouilles achetées sur le marché
Aubergine *Solanum melongena* (Solanacée)- variété Kalenda
Coton genre *Gossypium* (Malvacée)- graines prélevées directement sur la plante d'origine
Euphorbe *Euphorbia hétérophylla* (Euphorbiacée) - graines prélevés directement à par partir de plants récoltés

soit par bouturage :

Manioc genre *Manihot* (Euphorbiacée)
Patate douce *Ipomea batatas* (Convolvulacée),
Jatropha *Euphorbia pulcherrima* (Euphorbiacée)

Ces plants sont placés à l'intérieur d'une enceinte protégée de l'extérieur, appelée pépinière insect-proof (photo 4), ils sont donc ce qui les rend indemnes de tout ravageur.

Pour le test de fécondité, 4 espèces de plantes sont semées, il s'agit de la tomate, du chou, de la citrouille et de l'euphorbe.

2-1-1-3. Matériel viral

Pour les tests de transmission, des *B.tabaci* infectés par le TYLCV sont mis en élevage (tests ELISA réalisés lors d'une étude antérieure). Ils sont utilisés pour contaminer les plants et transmettre le virus aux insectes de l'élevage actuel.

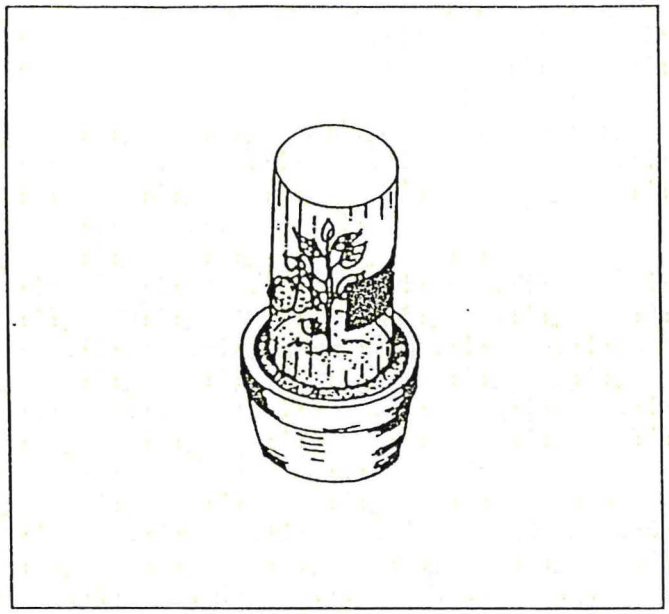


Figure 4 : Représentation du système de cage

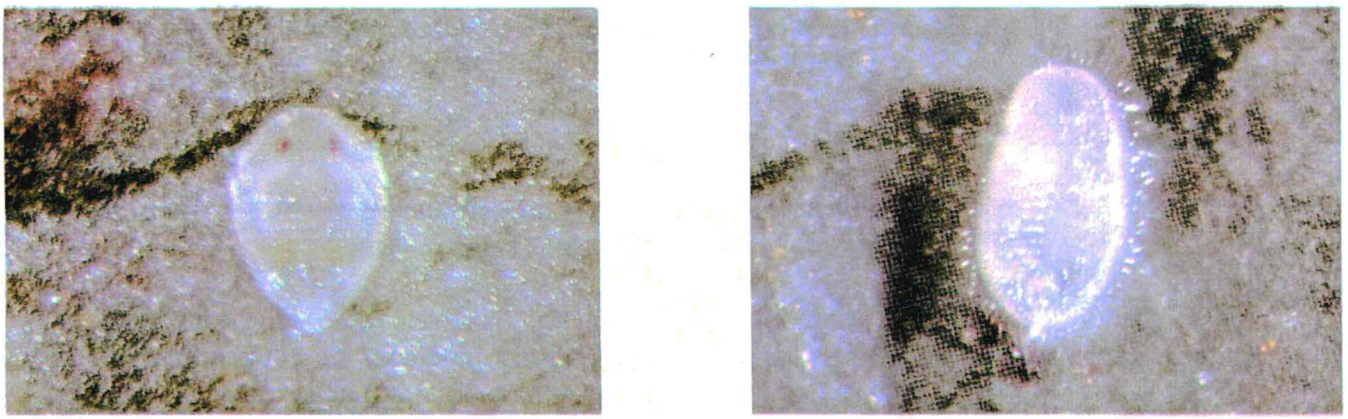


Photo 5 : Larves de *B. tabaci* (à gauche) et de *Trialeurodes vaporariorum*

2-1-2. Conditions d'élevage

Pour lancer chaque lignée, chaque plante est placée sous une bouteille en plastique. Le fond de cette bouteille est découpé et enlevé, 2 cercles de 5 cm de diamètre environ sont découpés sur la paroi. Ces cercles sont recouverts d'un voile permettant l'aération sous la bouteille (figure 4).

Un autre système de cage a été mis en place. Il s'agit d'un unique voile recouvrant la plante et maintenu par une armature métallique du diamètre du pot. Le voile se présente sous la forme d'un tube fermé en bas et en haut par un élastique.

L'ensemble de ces pots est placé dans une chambre climatique, éclairée par des tubes fluorescents bicolores permettant une photopériode de 18 heures. La température est fixée à 25 +/- 2°C et l'humidité relative de 60 +/- 10 %.

2-2. Méthodes

2-2-1. Technique moléculaire

On réalise une PCR-RAPD. On utilise des échantillons connus du biotype B et A de *B.tabaci*, et de *Trialeurodes vaporarium*, pour être sûr que les lignées réalisées correspondent bien à du *B. tabaci*.

Trialeurodes vaporariorum (photo 5) a une gamme d'hôtes semblable à celle de *B.tabaci* , mais en région tempérée, il se retrouve surtout dans les cultures sous serres, d'où son appellation « aleurode des serres ». A la Réunion, où il est présent, il se retrouve préférentiellement dans des zones situées à 600 m d'altitude au minimum.

En deçà de cette altitude, on peut trouver plus facilement du *Bemisia tabaci* (Caballero, 1996).

2-2-1-1. Principe

L'analyse RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) repose sur le principe d'une amplification de sites cibles aléatoires du génome par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) à l'aide d'amorces dont la séquence est identique. Ces amorces sont de courtes séquences nucléotidiques (5 à 6 nucléotides), qui se fixent de manière aléatoire sur le génome. Les amorces sont identiques, et se fixent sur les deux brins d'ADN, de manière à encadrer une certaine région.

Lors d'une analyse, les différents individus auront la même région amplifiée, et vont se différencier par la séquence nucléotidique de cette région.

Avec cette méthode, on évalue des similitudes de séquences entre individus, la région amplifiée étant inconnue.

Il existe cependant certains inconvénients, notamment une bande peut correspondre à plusieurs portions du génome d'où une confusion d'allèles de locus différents. Des variations de conditions expérimentales peuvent sensiblement altérer la répétabilité. Les marqueurs RAPD sont assimilables à deux allèles dont un seul est repérable, ils sont dominants et un seul codage en niveaux de bandes est possible.

2-2-1-2. Protocole expérimental

Prélèvement d'un insecte dans l'alcool à l'aide d'un embout jaune coupé. Dépôt sur un papier filtre, évaporation de l'alcool. Vérification éventuelle sous loupe binoculaire de la présence d'un seul insecte. Transfert de l'insecte à l'aide d'un embout, dans un eppendorf contenant 5 µl du tampon d'extraction (Annexe 2). Broyage avec un pilon pendant environ 20 secondes. Rajout de 20 µl de tampon d'extraction. Centrifugation de quelques secondes. Transfert de l'échantillon dans un eppendorf à vis. Incubation de 15 minutes à 100°C. Centrifugation pendant quelques secondes. Rajout de 25 µL d'eau ultra pure. PCR avec 5µl d'extrait d'ADN et 20 µl de tampon MIX (Annexe 2). Migration sur gel d'electrophorèse à 1.4 % d'agarose (Annexe2).

2-2-1-3. Choix des amorces

Différentes amorces ont été choisies pour cette analyse. Leur séquence résulte d'étude antérieure relatant au sujet, ou encore de la littérature. Elles sont composées d'une courte séquence nucléotidique (tableau 1).

Tableau 1 : Séquences des différentes amorces

amorce	séquence (5'-3')
P1	TGACACATAG
G1	ATTGTTCCTT
H9	TGTAGCTGGG
F12	ACGGTACCAG
H16	TCTCAGCTGG
B1	CAGAACTCGG
B2	ACCATCGGCA
B3	ATCCCGAAG

2-2-2. Analyse de la diversité génétique : représentation arborée de Neighbor joining

2-2-2-1. Principe

L'étude de la diversité des espèces animales ou végétales, la taxonomie (de *taxis* : arrangement, et *nomos* : loi) a été l'objet d'une grande activité scientifique depuis les milieu du 20e siècle. Elle représente une zone d'interface entre la biologie et la génétique et les mathématiques, et ce n'est que depuis les années 70, grâce à l'accroissement considérable des puissances de calcul, qui a ouvert des perspectives nouvelles dans ce domaine, qu'elle a pu être considérée comme une discipline particulière.

En taxonomie, le terme de classification correspond aux relations de filiation entre unités au sens de l'évolution, avec comme objectif d'inférer une phylogénie. Le résultat peut être représenté par un arbre, dont les nœuds représentent des individus appartenant à l'ensemble étudié, et les branches sont des liens de filiation dont les valuations incluent la dimension temporelle de l'évolution (Perrier, 1998).

La représentation sous forme arborée découle directement de la définition de l'évolution comme un processus par accumulation de mutations. Les méthodes de phylogénie sont basées sur une relation fondamentale entre similitude et parenté : le degré de ressemblance entre

deux éléments traduit leur niveau de parenté. La reconstruction phylogénétique ne s'intéresse ici qu'à la similitude, celle-ci étant la résultante de deux composantes : l'homologie et l'homoplasie. L'homologie est le partage de caractères identiques par héritage d'un ancêtre commun, l'homoplasie correspond à l'apparition de caractères identiques chez des formes non directement apparentées.

Les méthodes associées de construction d'arbre reposent sur un principe de parcimonie qui veut que le chemin qui nécessite le moins de mutations soit le plus probable (Perrier, 1998)

Le problème d'ajustement d'une réalité à un modèle arbre peut être décomposé en plusieurs étapes (figure 5)

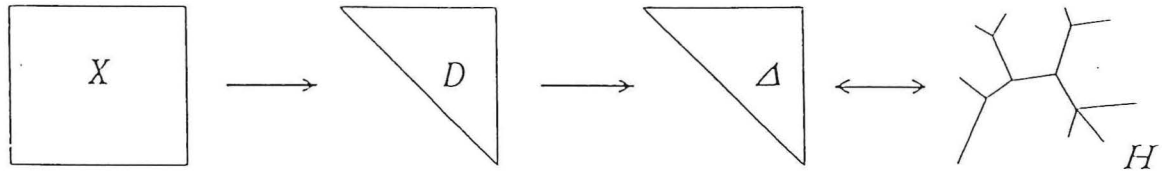


Figure 5 : Représentation arborée des relations entre éléments d'un ensemble I : calcul d'une dissimilarité D à partir de la matrice X des observations des individusxcaractères, ajustement de D par une distance représentable sous forme d'un arbre (Perrier, 1998).

La réalité est décrite, en entrée par une matrice *X* des éléments d'un ensemble *I* d'unités taxonomiques, caractérisés par une série de variables de description de la diversité. Une fonction de dissimilarité *D* entre éléments de *I* quantifie, selon un certain point de vue, les relations de voisinage entre ces éléments.

Suivant les équivalences entre structures arborées et distances représentables (dendrogramme, distance additive et arbre), établir un modèle arbre est strictement équivalent à définir une matrice de distance entre les éléments de *I* telle que Δ possède des propriétés de représentation sous forme d'arbre. L'ajustement d'une réalité *X* par un arbre *H* devient équivalent à l'ajustement de *D* par Δ (Perrier, 1998).

2-2-2-2. Présentation du logiciel d'analyse taxonomique : NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System)

Huit gels sont réalisés à chaque analyse RAPD-PCR, suite à l'utilisation des huit amorces différentes. L'ensemble des profils obtenus ont été regroupés pour évaluer les relations phylogénétiques de chaque lignée à l'aide d'une représentation arborée. La construction de l'arbre est établie à partir de caractères de ressemblance qui sont dans notre cas la présence ou l'absence de fragments d'amplification obtenus dans les différents profils. On choisit ainsi dans chaque gel d'amplification plusieurs fragments et l'on note pour chaque échantillon leur présence (notée 1) ou leur absence (notée 0).

Les profils sont comparés deux à deux par calcul du coefficient de similarité de Jaccard, puis soumis à une classification par la méthode du neighbor joining tree pour obtenir un arbre de distances additives sur lequel un ajustement des longueurs de branches par rapport aux distances de Jaccard est effectué par la méthode des moindres carrés.

2-2-3. Test de fécondité

Un plant au stade 2 feuilles est mis sous une bonnette. Un couple âgés de 1 à 4 jours, sont alors mis sous ce plant pendant 6 jours.

Les 2 individus sont ensuite prélevés à l'aide de l'aspirateur à insecte, puis ils sont identifiés sous binoculaire, pour vérifier la présence du mâle et de la femelle.

Du fait de la difficulté d'observer les œufs sous binoculaire sans couper la feuille (car comme il se passe 25-30 jours entre chaque génération, les adultes issus de ce test nous sont utiles pour la suite des manipulations, il faut donc qu'ils puissent émerger), ce sont les larves de 3ème stade (âgées de 12 à 15 jours) qui sont comptées.

Pour chaque lignée, on détermine un nombre moyen de larves de 3ième stade/plante hôte.

2-2-4. Test de Transmission

Différentes étapes réalisées lors du test de transmission du TYLCV :

- phase d'acquisition : Les *B. tabaci* sont placés sur des plants de tomate contaminés par le TYLCV pendant 72 heures.
- phase d'inoculation : Les aleurodes ayant acquis le virus sont mis sur des plants sains pendant 6 jours.
- apparition des symptômes : Les insectes sont retirés, les plants sont laissés 10 jours pour qu'apparaissent les premiers symptômes.
- test ELISA : Les plants sont analysés par ELISA, pour déterminer le taux de transmission du virus par les aleurodes.

2-2-4-1. Protocole de la méthode ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

Pendant longtemps les seules méthodes de détection du TYLCV étaient basées sur des techniques de biologie moléculaire (hybridation avec des sondes radioactives, froides ou encore la Polymerase Chain Reaction (PCR), méthodes qui étaient difficiles à appliquer en grande série. Depuis 1995, la technique utilisée repose sur la méthode ELISA dont le protocole est commercialisé par ADGEN (Ecosse). Le protocole officiel de détection du TYLCV a été mis en place par le LNPV de Montfavet.

Principe de la réaction « DAS-PROTOCOL (TYLCV) » :

Le principe de la méthode est la réponse immunologique. La molécule recherchée représente un antigène que l'on injecte à un animal. Celui-ci réagit en fabricant des anticorps dont on va se servir pour repérer l'antigène recherché. La réaction sérologique est révélée par un anticorps couplé à un enzyme. Après ajout et révélation du substrat de cette enzyme, la quantité de produit d'hydrolyse, fonction de la quantité d'antigène au départ, est évaluée par analyse spectrophotométrique .

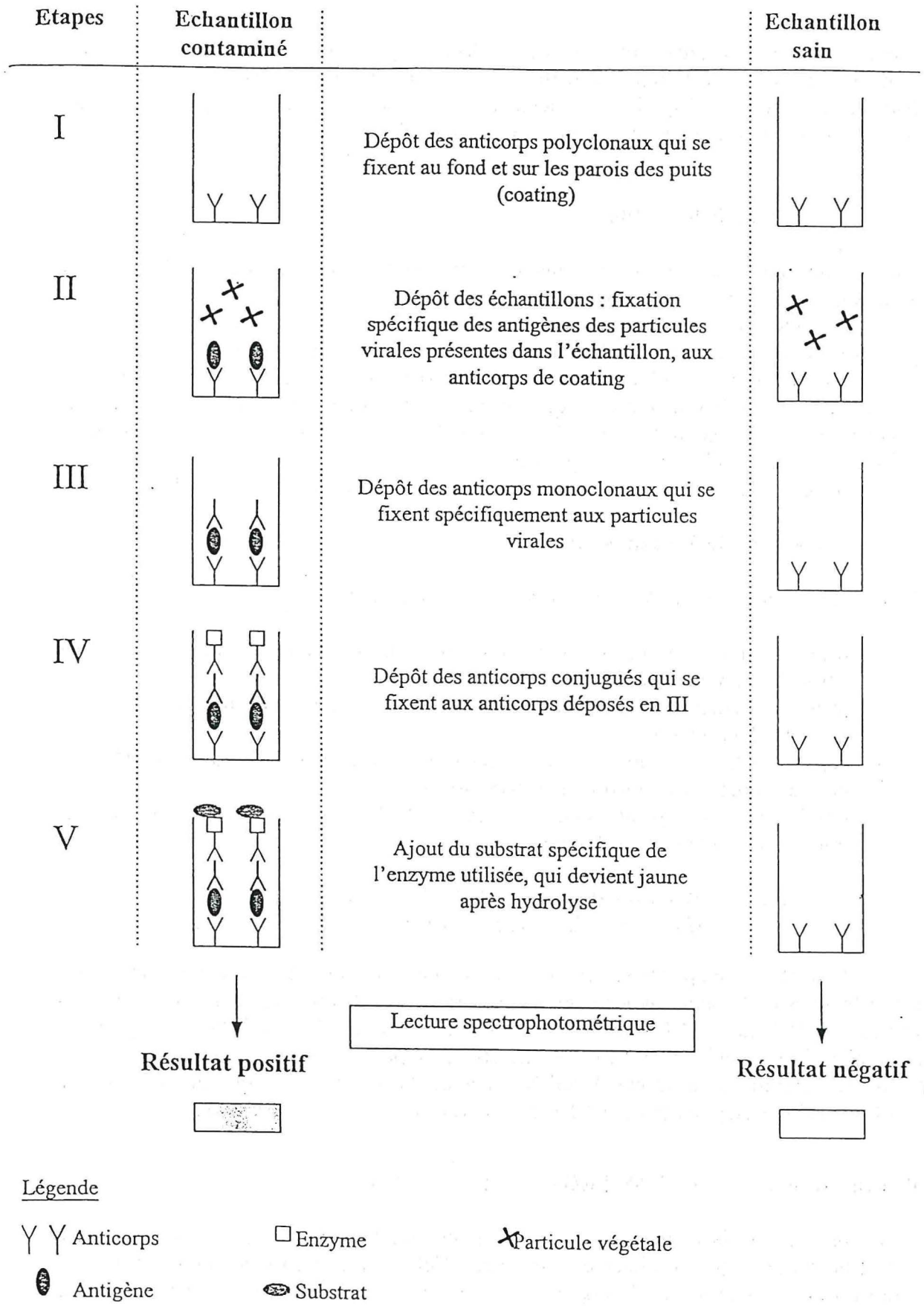


Figure 6 : Principe de la réaction DAS-ELISA indirecte

Le « double antibody sandwich (DAS) ELISA utilise tout d'abord des anticorps (IgG) polyclonaux qui sont fixés sur la surface des puits (« coating »). Ces anticorps servent à capturer les antigènes des particules virales présentes dans l'échantillon. Un anticorps monoclonal est ensuite utilisé pour détecter les particules virales. Puis un anticorps-enzyme conjugué est déposé pour révéler l'anticorps monoclonal. Le substrat spécifique de l'enzyme est ajouté, il devient jaune après hydrolyse (figure 6).

L'ensemble des échantillons est ensuite passé en lecture spectrophotométrique ; suivant les densités optiques (DO) observées, on pourra alors différencier les échantillons sains de ceux contenant le virus.

2-2-4-2. Mode opératoire détaillé :

Tableau 2 : Protocole du test ELISA

Etape	Facteur de dilution	Tampon	Volume déposé par puits	Durée d'incubation	Réglage de l'étuve pour incubation	Précautions particulières
Dépôt des IgG polyclonaux de lapin	1/1000e	carbonate	100 µl	3 heures	34°C–37°C	couvrir la plaque
Dépôt des extraits	0.5 g dans 4.5 ml	extraction TRIS	100 µl	une nuit	réfrigérateur	couvrir la plaque
Saturation au lait écrémé en poudre	5 % lait (poids/vol)	PBS-Tween-PVP	200 µl	30 minutes	34°C-37°C	couvrir la plaque
Anticorps monoclonal de souris	1/1000e	PBS-Tween-PVP	100 µl	2 heures	34°C-37°C	couvrir la plaque
Anticorps conjugué anti-souris, molécule entière	1/3000e	conjugué	100 µl	2 heures	34°C-37°C	couvrir la plaque
Substrat 4-NPP	1 mg/ml	substrat	100 µl		température ambiante	hors étuve, à l'obscurité

Entre chaque étape, un lavage est réalisé avec du Phosphate buffer saline -Tween (0.05%), la plaque étant alors remplie 3 fois de tampon laissé 3 minutes.

Les différents réactifs sont distribués à raison de 100µl/puits.

Lors du remplissage de la plaque, les puits situés sur le bord gauche ne sont pas utilisés pour les essais, ils sont remplis d'eau distillée durant toutes les étapes excepté pour la dernière où ils sont remplis de solution de substrat. Les puits numérotés de 2 à 9 sur les bords du haut et du bas de la plaque ne sont pas non plus utilisés, ils sont rempli d'eau distillée durant toutes les étapes.

Dans chaque essai, des échantillons témoins malade et sain sont utilisés.

2-2-4-3. Lecture des densités optiques- Interprétation des résultats :

La référence de lecture se fait à partir de la solution substrat. Les mesures de densités optiques se font à 405 nm. Lorsque le tampon d'extraction est du PBS-PVP, les lectures se déroulent en trois temps , après 30 minutes, 1 heure et 2 heures d'incubation, afin de suivre la cinétique de la réaction enzymatique. Lorsque le tampon d'extraction est du TRIS, les lectures se font toutes les 10 minutes pendant 1h 30, c'est-à-dire jusqu'à ce qu'apparaissent les premiers bruits de fond. Ces derniers correspondent à une réaction obtenue lorsque l'on teste du jus de plante saine. Cette réaction non spécifique peut être due, entre autres, à l'agglutination de protéines de plantes présentes dans le jus de plante saine avec des anticorps antiprotéiques de plante contenu dans le sérum.

Le seuil de positivité des réactions enzymatiques sur une plaque de titration est déterminé sur la base de la densité optique des 10 témoins sains par plaque et calculé selon la formule suivante :

$$S = M_{(\text{DO témoins sains})} + 3 * EC_{(\text{DO témoins sains})}$$

RESULTATS ET DISCUSSION

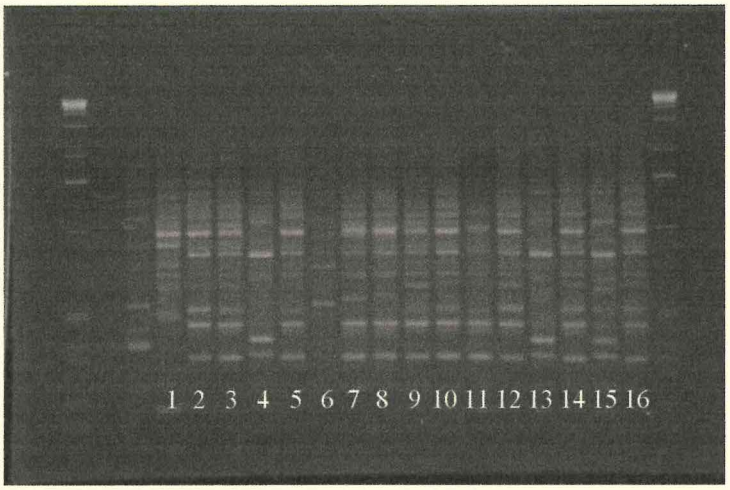


Figure 7A : Profils de bandes obtenus par RAPD-PCR avec l'amorce H16

Tableau 3 : Correspondance des numéros

numéros	correspondance
1	biotype A
2	biotype B
3	chou 3 G0
4	citr 3 G0
5	euph 3 G0
6	manioc
7	p.dou 1 G0
8	p.dou 1-1 G1
9	jatropha
10	coton 1-2 G1
11	tom 2 G0
12	aub 1 G0
13	trial. vaporariorum
14	coton 2 G0
15	citr 1 G0
16	chou 1 G0

Tableau 4 : Récapitulatif des lignées

Plante d'origine	Génération	Lignée
aubergine	G0	n° 1
"	G1	n° 1-8
"	G0	n° 2
"	G1	n° 2-2
"	G1	n° 2-1
"	G2	n° 2-2-1
"	G0	n° 3
"	G1	n° 3-2
tomate	G0	n° 2
"	G2	n° 17-7-7
"	G1	n° 12-5
"	G2	n° 12-5-2
"	G1	n° 7-7
"	G2	n° 7-7-2
chou	G0	n° 1
"	G0	n° 2
"	G1	n° 2-1
"	G1	n° 2-2
"	G0	n° 3
coton	G0	n° 1
"	G1	n° 1-2
"	G2	n° 1-2-1
"	G0	n° 2
"	G1	n° 2-2
"	G1	n° 2-7
patate douce	G0	n° 1
"	G1	n° 1-1
euphorbe	G0	n° 1
"	G1	n° 1-3
"	G0	n° 3

Explication de la numérotation des lignées utilisées :

Les lignées sont représentées sur le tableau 3. Chaque chiffre indique une lignée distincte pour la même plante d'origine. Mais il existe un lien entre les génération G0 et G1 : chaque lignée, commençant par un même chiffre est issue d'une seule et unique femelle, à l'origine de la lignée. Ainsi la lignée 1-8 (G1) de l'aubergine représente la descendance de la lignée 1 (G0) du fait qu'une femelle fécondée de la lignée 1 a servi à donner la génération G1.

3-1. Diversité génétique de *Bemisia tabaci*

3-1-1. Analyse de la diversité en génération G0 et G1

La diversité génétique des individus a tout d'abord été évaluée par la technique RAPD-PCR, en comparant chaque profil à ceux de deux témoins de *B. tabaci*, de biotype A et B, ainsi qu'un témoin de l'espèce *T. vaporariorum*, ce qui a permis de confirmer la présence de *B. tabaci* dans nos élevages.

Tous les individus testés pour cette première analyse correspondent à la génération G0, à l'exception de la patate douce, du coton et de la tomate, où les individus sont de la G1. Huit gels ont été réalisés suite à l'utilisation des huit amorces différentes (tableau 1 cf. 2-2-1-3). Deux des huit gels sont montrés sur les figures 7A et 7B.

L'ensemble des 8 gels présente des profils composés de bandes bien amplifiées pour la plupart. La majorité des lignées présentent des profils de bandes similaires à ceux du biotype B. Il s'agit des individus issus de lignées de tomate, de chou, de coton, d'aubergine, de jatropha, d'euphorbe et de patate douce (figure 7A).

Le témoin de *T. vaporariorum* présente quant à lui, un profil très différent de celui du biotype B. Les deux individus issus de citrouille paraissent présenter un ensemble de bandes similaires à celles du témoin de *T. vaporariorum*.

L'insecte sur lignée de manioc montre lui aussi un profil très différent du biotype B et de *T. vaporariorum*.

Aucun profil n'est vraiment similaire à celui du biotype A.

Alors que l'amorce H16 révèle une majorité d'individus au profil semblable à celui du biotype B, l'amorce B2 (figure 7B) montre une différence de profil sur la lignée de patate douce. Pour les deux individus représentatifs de cette lignée, certaines bandes sont communes au biotype B, et d'autres ne sont présentes que pour ces échantillons.

L'ensemble des huit gels obtenus a permis la réalisation d'un premier arbre en représentation de neighbor joining.

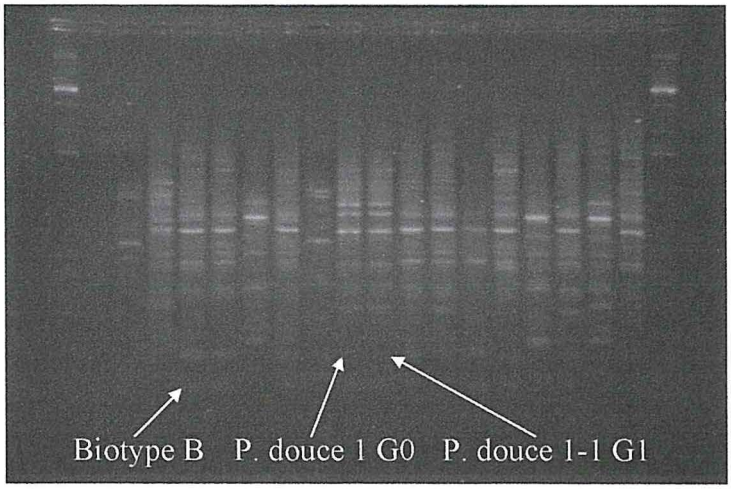


Figure 7B : Profils de bandes obtenus avec l'amorce B2

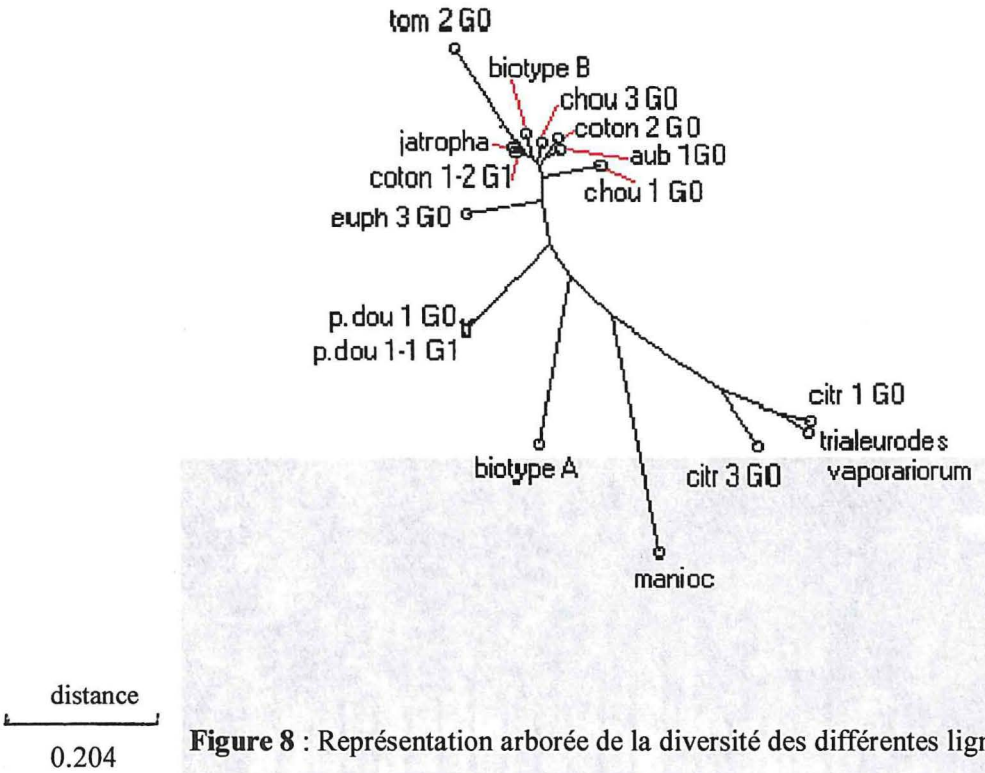


Figure 8 : Représentation arborée de la diversité des différentes lignées mises en élevage

Remarque : les traits rouges ont été rajoutés afin de bien distinguer les terminaisons des lignées

L'arbre permet de distinguer des variations génétiques entre les individus. Deux grands groupes se distinguent :

- un groupe assez homogène, les individus sont séparés entre eux par de courtes distances additives
- un groupe beaucoup plus hétérogène, avec des distances additives plus grandes

Le groupe homogène comprend des individus proches du biotype B. La distance moyenne à l'intérieur de ce groupe est de 0.213, elle est plus faible que la distance moyenne entre tous les individus, qui est de 0.583. Ce groupe inclue les aleurodes prélevés sur tomate, chou, aubergine, coton et jatropha.

Les autres individus paraissent isolés, séparés par de grandes distances. Les individus de ce groupe proviennent des lignées d'euphorbe, de patate douce, de manioc, de citrouille, du biotype A de *B. tabaci* et de *T. vaporariorum*. La distance entre chaque individu est supérieure à la distance moyenne totale (exemples : dist. biotype A-p.douce G0 et G1 = 0.653, dist. biotype A-Trialeurodes vaporariorum-citrouille 1 et 3 G0 = 0.882, dist. manioc-citrouille 3 G0 = 0.897).

Le témoin de *T. vaporariorum* et les individus de la lignée de citrouille sont très proches les uns des autres. En effet la moyenne de leur distance additive est de 0.258.

Les deux individus issus de la lignée de patate douce sont au même point sur l'arbre.

Cet arbre révèle donc des différences génétiques existant entre les individus des différentes lignées. Pour la plupart d'entre eux, ils s'apparentent au biotype B de *B. tabaci*. Aucun insecte n'appartient au biotype A.

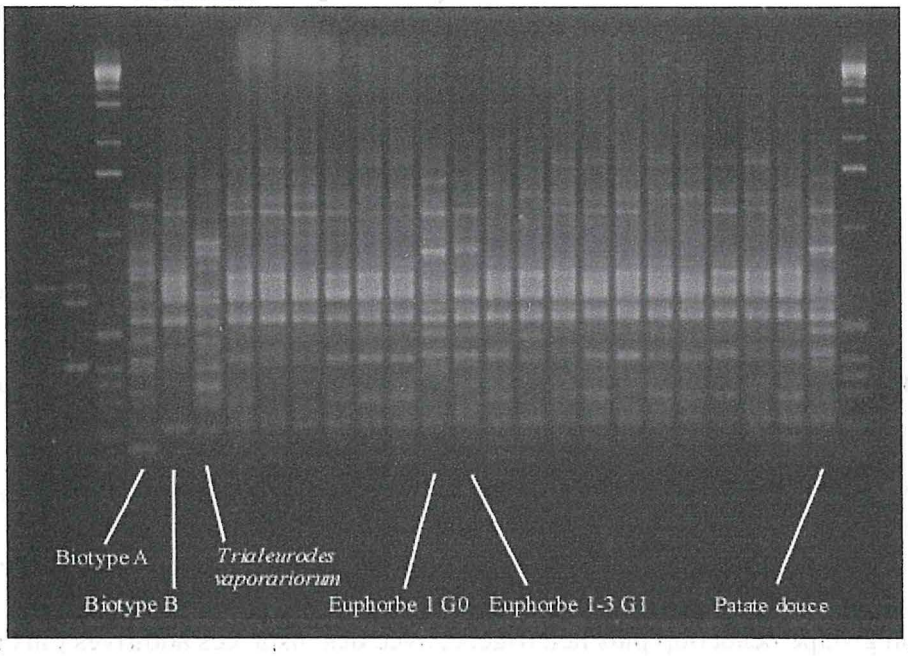


Figure 9 : Profils de bandes obtenus avec l'amorce B2

Alors qu'une partie de l'arbre est homogène, avec de faibles distances additives, l'autre est beaucoup plus hétérogène, ce qui laisse supposer que chaque aleurode représente un groupe, différents les uns des autres.

Deux lignées lancées présentent des individus d'autres espèces, il s'agit des individus sur citrouille qui appartiennent vraisemblablement à l'espèce *T. vaporariorum* et des individus de la lignée de manioc présentant un profil très différent de celui de *B. tabaci* et de *T. vaporariorum.*

3-1-2. Vérification de l'homogénéité génétique des lignées

Le gel réalisé avec l'amorce B1 (figure 9) présente un ensemble de bandes communes à tous les individus et au biotype B de *B. tabaci.* Il n'y a ici aucun individu issu de la lignée citrouille. Les individus des lignées aubergine, coton, chou et tomate ont des profils très proches de ceux du biotype B. Les profils sont également similaires entre les générations G0 et G1 de chaque lignée.

Trois profils se distinguent, il s'agit des individus de la lignée d'euphorbe (un individu de la génération G0 et un de la G1), et d'un individu de la lignée de patate douce. Pour ces trois individus, certaines bandes sont communes à celles du biotype B et d'autres sont présentes uniquement chez ces trois lignées.

La représentation arborée présentée sur la figure 10 compare pour chaque lignée la génération G0 et G1.

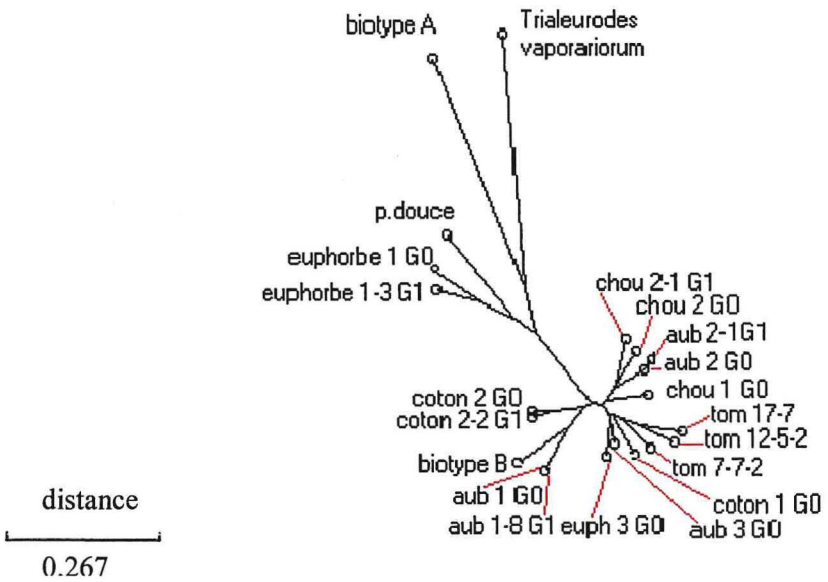


Figure 10 : Représentation arborée des lignées en comparant la génération G0 à G1

On obtient un arbre similaire à celui de la figure 8. Un groupe homogène se distingue, proche du biotype B de *B. tabaci*. La distance additive à l'intérieur de ce groupe est de 0.228, elle est plus faible que la distance moyenne totale, qui est de 0.403.

Pour chaque lignée, les individus de la génération G1 sont très proches de ceux de la génération G0 (exemples : dist. coton 2 G0 et G1 = 0.079, dist. chou 2 G0 et G1 = 0.150, dist. aubergine 2 G0 et G1 = 0.026)), ce qui indique que les lignées sont génétiquement proches.

La seconde moitié de l'arbre est composée d'individus très éloignés les uns des autres, les distances additives sont respectivement de 0.789 pour la lignée de patate douce et le biotype A *et T. vaporariorum,* de 0.895 entre *T. vaporariorum* et le biotype A

Un groupe particulier semble se différencier, il comprend les individus de patate douce et d'euphorbe. La distance moyenne entre ces individus est de 0.324. Elle est inférieure à la distance moyenne entre tous les individus, ainsi qu'entre le biotype A et B.

La distance entre les deux individus issus des générations G0 et G1 de l'euphorbe est de 0.225, ce qui montre une certaine homogénéité entre les générations de cette lignée.

Un autre arbre a été réalisé à partir des huit amorces, dans chaque lignée plusieurs individus ont été testés, afin d'observer leur homogénéité.

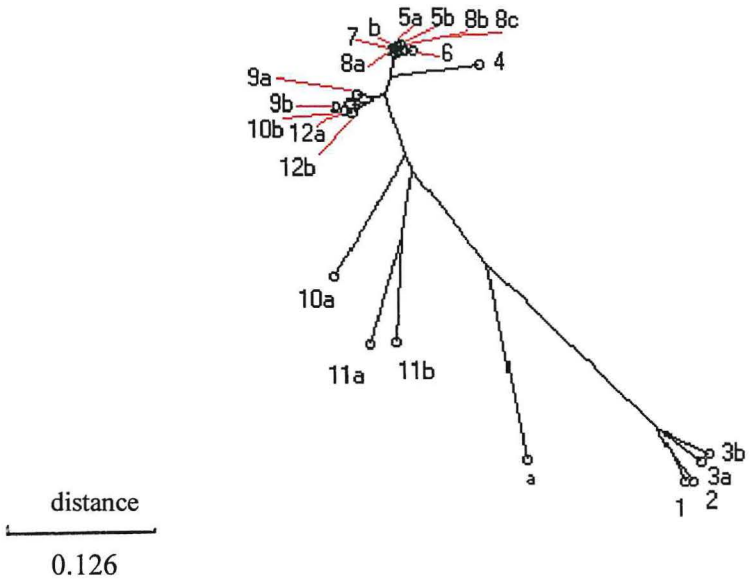


Figure 11 : Représentation arborée de plusieurs individus issus des mêmes lignées

Cet arbre révèle une bonne homogénéité entre les individus de chaque lignée (exemples : dist. coton 1-2-1 G2 entre 2 individus = 0.094, dist. aubergine 2-2-1 G2 entre 3 individus = 0.178, alors que la moyenne générale entre tous les individus = 0.444). Le groupe autour du biotype B de *B. tabaci* se confirme, il comprend les lignées de coton, d'aubergine, de tomate. Les individus correspondant à *T. vaporariorum* sont également très proches entre elles (exemple dist. entre Trialeurodes vaporariorum n° 1 et 2 = 0.253). Les lignées de patate douce et d'euphorbe ne sont pas représentées ici.

On note cependant quelques individus qui se distinguent des lignées du biotype b. Il s'agit de deux individus issus de la lignée 12-5 d'un individu de la lignée 7-7-2 de tomate.

Cette représentation arborée est similaire aux 2 autres présentées, dans le sens où les individus témoins des biotypes A et B, ainsi que Trialeurodes vaporariorum sont très éloignées les uns des autres. En effet, la distance entre les 2 biotypes A et B est de 0.704, la distance entre le biotype B et Trialeurodes vaporariorum est égale à 0.737 et la distance entre le biotype A et Trialeurodes est de 0.475. Toutes ces distances sont supérieure à la distance moyenne générale entre tous les individus qui est de 0.444.

3-1-3. Discussion sur l'analyse génétique

Cette première analyse marquée par la technique RAPD-PCR a permis de révéler de la variabilité génétique au sein des différents lignées. Cette technique avait déjà été employée pour différencier génétiquement des souches de *B. tabaci* venant de différentes régions du monde (Ménozzi, 1997).

Cependant la sensibilité de la technique est telle qu'elle ne permet pas de distinguer de manière plus précise 2 biotypes d'une même espèce par rapport à 2 espèces d'aleurodes différentes, comme l'ont montré Gawel & Bartlett en 1993. Dans leur étude, les biotypes A et B de *B. tabaci* n'apparaissaient pas plus similaires qu'ils ne l'étaient 2 autres espèces d'aleurode, *Parabemisia myricae* Kuwana *et Trialeurodes abutilonea* Hadelman. Ceci est confirmé dans notre étude, car chaque représentation arborée de neighbor joining montre la même disposition des individus correspondant aux 2 biotypes A et B de *B. tabaci* et à *T. vaporariorum*. Les distances entre les témoins des 2 biotypes ne sont pas plus petites que celle séparant le biotype A de *T. vaporariorum*.

La technique des lignées isofemelles a permis une bonne homogénéisation de nos lignées, comme on la vu sur la figure 10 ; dès la génération G1, les individus paraissaient similaires génétiquement à ceux de la génération G0. La répétition des individus de ces mêmes lignées a confirmé ce résultat. Seules 2 lignées sont apparues comme non homogènes, il s'agit de lignées de tomates, dont les premiers individus avaient été récoltés lors d'études antérieures. Pour ces deux lignées, sur respectivement 2 et 3 individus testés,1 sur 2 et 2 sur 3 individus ont montré un profil nettement différent du biotype B

Le biotype B apparaît dominant, il est présent sur les lignées d'aubergine, de tomate, de chou et de coton. Ces plantes d'origine sur lesquelles *B. tabaci* a été prélevé ont déjà été reconnues comme plantes hôtes (Burban, 1991, Ryckewaert, 1998, Drost *et al.*, 1998, Servín *et al.*, 1999).

A l'exception du coton, les aleurodes à l'origine des lignées ont été prélevés sur des parcelles conjointes. Des échanges entre plantes hôtes ont pu se produire du fait de la proximité des différents plants, il n'est donc pas étonnant de voir qu'ils sont génétiquement proches.

Un biotype différent du A et du B semble se distinguer, sur les lignées d'euphorbe et de patate douce. L'analyse de leur profil et donc leur positionnement sur l'arbre laisse supposer qu'ils représentent le même biotype. Le lieu de prélèvement des insectes n'est pas le même, il n'y a donc pas à priori d'échange génétique entre ces 2 populations.

Les individus de la lignée de citrouille ont présenté des profils similaires à ceux de *T. vaporariorum*. Après vérification de la morphologie des larves de dernier stade (stade « yeux rouges ») de ces individus, il s'est avéré que cette lignée était bien composée d'individus de l'espèce *T. vaporariorum*, et non pas de *B. tabaci*.

La confusion a résulté dans le fait que la morphologie des larves de *B. tabaci* peut varier en fonction de la texture de la feuille de la plante sur laquelle ils se développent (Rosell *et al.*, 1995, Caballero, 1996). Ainsi avec une plante à texture plutôt pileuse, la larve de *B. tabaci* peut développer un ensemble de soies marginales visibles en face dorsale, ce qui ressemble à celles présentes sur les larves de *T. vaporariorum*.

Figure 12A : Nombre moyen de larves par plante hôte

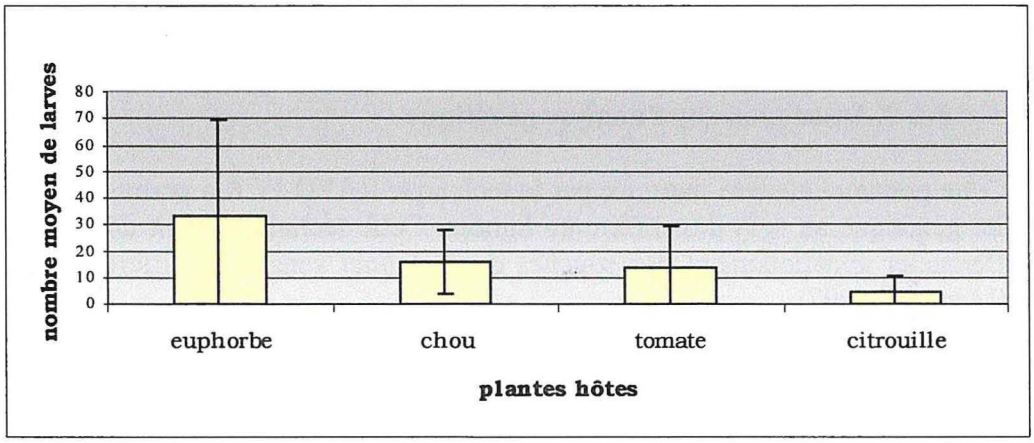


Figure 12B : Nombre moyen de larves pour chaque lignée

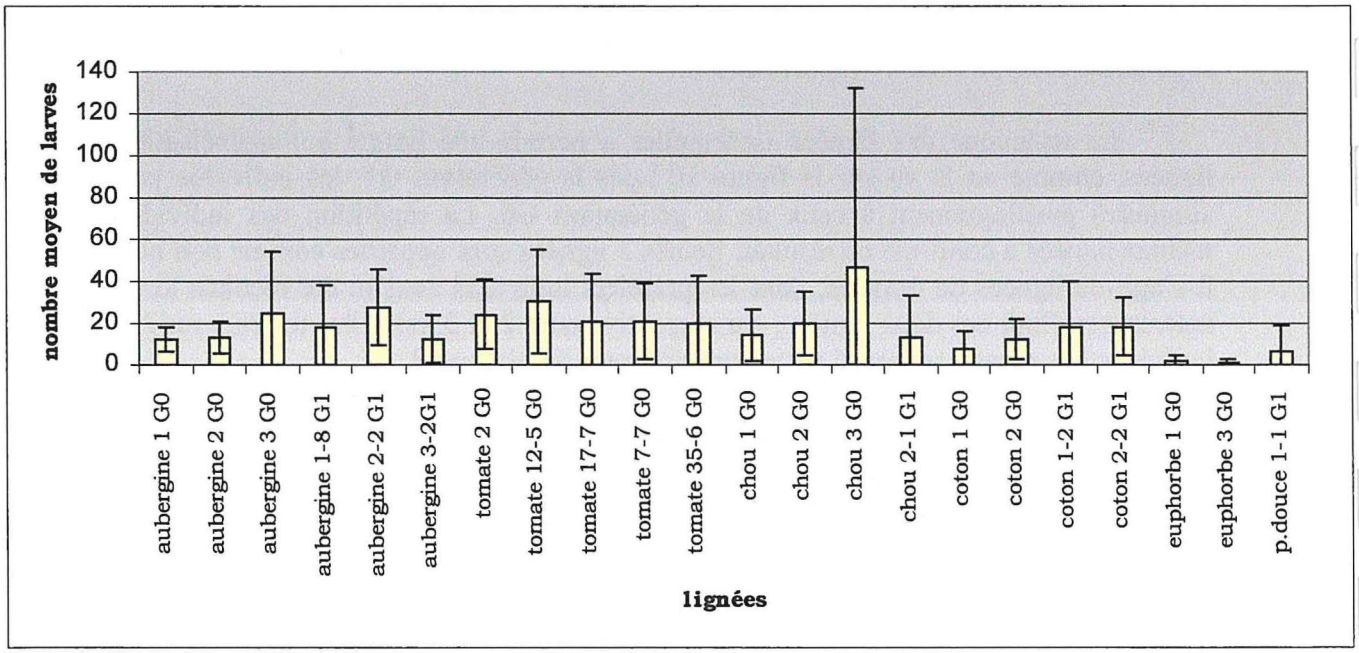
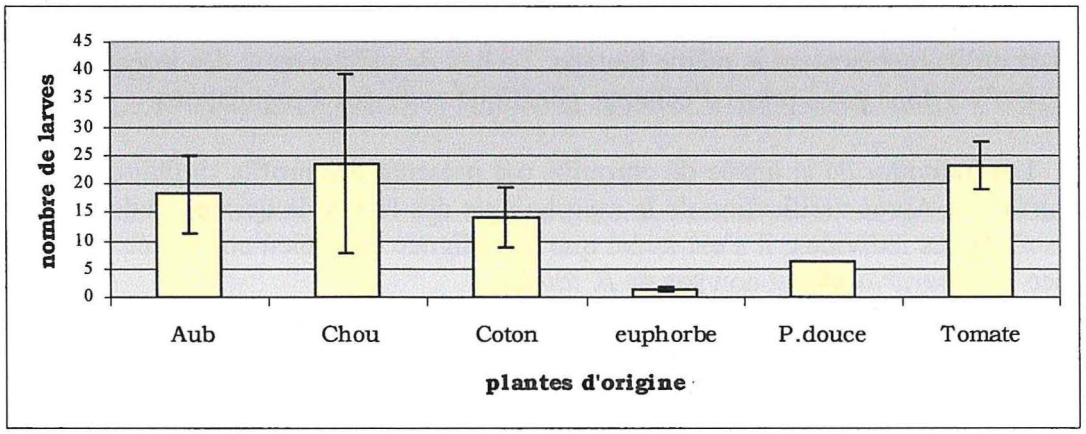


Figure 12C : Nombre moyen de larves pour chaque plante d'origine



Les individus issus de la lignée de manioc ont révélés un profil de bandes très différentes à la fois de celui des 2 biotypes de *B. tabaci*, et de celui de *T. vaporariorum*. Il peut s'agir également d'une autre espèce, nommée *Bemisia afer* Priesner et Hosny qui peut se rencontrer sur manioc, tout comme *B. tabaci* (Burban, 1991). La seule différenciation entre ces 2 espèces se fait au niveau de la longueur des sètes caudales, qui sont de taille similaire à l'orifice vasiforme chez *B. tabaci*, alors qu'elles sont souvent de taille nettement inférieure chez *B. afer*, même s'il existe des variabilités suivant les individus (Martin, 1987). Plusieurs individus de cette lignée sont en cours de détermination au laboratoire de faunistique du CIRAD à Montpellier.

3-2. Analyse de la diversité biologique de *Bemisia tabaci*

3-2-1. Test de Fécondité

Les tests ont été effectués avec des individus issus des générations G0 et G1.

Les données ont été traitées par le logiciel SAS (SAS Institute Inc., V.6-12), sous la procédure GLM. Elles ont été transformées par le log (x +1).

Trois tests ont été réalisés ; il s'agit de tests de comparaison de moyenne de Tukey, de Ryan-Einot-Gabriel-Welsch (REGWQ) Mutliple Range Test et le test de comparaison 2 à 2 par la méthode des contrastes. Le seuil des tests est fixé à 5 %.

Pour chacune des analyses, le test le plus puissant des trois est utilisé.

Les comparaisons sont faites :

- entre plantes hôtes (test de REGWQ)
- à l'intérieur des lignées (méthode des contrastes)
- entre les lignées, afin de comparer les plantes d'origine (test de Tukey)

3-2-1-1. Comparaison des plantes hôtes

Sur la figure 12A est représenté le nombre moyen de larves pondues par l'ensemble des lignées sur les quatre plantes utilisées comme hôtes.

L'euphorbe apparaît être la plus favorable pour le développement des larves. En effet le nombre moyen de larves est de 33.43, contre 15.69, 13.30 et 4.52 pour le chou, la tomate et la citrouille, respectivement.

L'analyse de la variance indique qu'il n'y a pas d'effet global sur les plantes hôtes (p value = 0.1463), mais la comparaison des plantes 2 à 2 révèle des différences (tableau 5).

La taille des échantillons est ici identique, le test de REGWQ est la plus puissant.

Tableau 5 : Nombre de larves de *B. tabaci* selon différentes plantes hôtes

plante hôte	moyenne après transformation log (x + 1)	erreur standart	test REGWQ
euphorbe	1.273	0.656	A
chou	1.020	0.582	A B
tomate	0.809	0.664	B C
citrouille	0.496	0.500	C

Il est possible de différencier 3 groupes, le premier incluant l'euphorbe et le chou, le second le chou et la tomate, et le troisième comprenant la tomate et la citrouille.

3-2-1-2. Comparaison de chaque lignée

La figure 12B illustrant le nombre de larves de l'ensemble des lignées présente un taux moyen de larves qui varie de 12.5 à 30.25, pour l'ensemble des lignées, à l'exception des 2 lignées d'euphorbe et de la lignée de patate douce pour lesquelles elles sont respectivement de 1, 1.5, et 6.25.

La méthode des contrastes compare ici les lignées d'une même plante d'origine entre elles, et non pas l'ensemble des lignées.

Tableau 6 : Classification de chaque lignée par rapport à sa plante d'origine et à la génération

lignée	moyenne transformée par log (x + 1)	erreur standart	test des contrastes
aubergine 1 G0	1.082	0.261	A
aubergine 2 G0	1.078	0.330	A
aubergine 3 G0	1.074	0.772	A
aubergine 1-8 G1	0.959	0.737	A
aubergine 2-2 G1	1.398	0.272	A
aubergine 3-2 G1	0.884	0.638	A

lignée	moyenne transformée par log (x + 1)	erreur standart	test des contrastes
chou 1 G0	0.943	0.654	A
chou 2 G0	1.062	0.721	A
chou 2-2 G1	0.687	0.821	A
chou 3 G0	0.855	1.079	A

lignée	moyenne transformée par log (x + 1)	erreur standart	test des contrastes
coton 1 G0	0.598	0.694	A
coton 1-2 G1	0.959	0.727	A
coton 2 G0	0.914	0.624	A
coton 2-7 G1	1.165	0.413	A

lignée	moyenne transformée par log (x + 1)	erreur standart	test des contrastes
euphorbe 1 G0	0.211	0.422	A
euphorbe 3 G0	0.175	0.349	A

Il n'y a pas de différence significative entre les lignées d'une même plante d'origine.

La fécondité au niveau de chaque lignée est donc semblable à celles issues de la même plante d'origine.

3-2-1-3. Comparaison des plantes d'origine

Le nombre moyen de larves a été regroupé pour chaque plante d'origine.

Le nombre moyen de larves en ce qui concerne chaque plante d'origine et pour les deux générations G0 et G1 sont montrées sur la figure 12C.

Comme le montrait la figure 12B, comparant les différentes lignées entre elles, le taux moyen de larves de 3ème stade révèle encore un nombre de larves relativement important, excepté pour les lignées d'euphorbe et de patate douce dont le taux est beaucoup plus faible que pour les lignées des autres plantes d'origine.

Les générations G0 et G1 ne semblent pas avoir une moyenne différente.

L'analyse de la variance montre un effet global sur les plantes d'origine (p value = 0.0009), qui se retrouve dans les comparaisons 2 à 2, avec le test de Tukey (tableau 7).

Tableau 7 : Groupement des plantes d'origine

plante d'origine	moyenne par transformation log (x + 1)	écart type	test de Tukey
aubergine	1.079	0.511	A
tomate	0.887	0.760	A
coton	0.909	0.598	A B
chou	0.354	0.707	A B
p.douce	0.193	0.359	B C
euphorbe	1.078	0.679	C

Au vue de ces résultats, il est possible de considérer différents groupes. Le premier incluse l'aubergine, la tomate, le coton et le chou ; le second comprend le coton, le chou et la patate douce ; et le troisième la patate douce et l'euphorbe.

Deux groupes s'excluent mutuellement, il s'agit de celui comprenant l'aubergine et la tomate de celui comprenant la patate douce et l'euphorbe.

3-2-2. Discussion

Le test de fécondité a donc été analysé d'une part avec une représentation graphique sur les moyennes du nombre de larves par plante hôte, par lignée et par plante d'origine. Il a été analysé d'autre part par comparaison de moyennes à l'aide des test de Ryan-Einot-Gabriel-Welsh Multiple Range test (REGWQ), le test de comparaison 2 à 2 par la méthode des contrastes ou le test de Tukey.

On remarque donc qu'il existe une différence entre les plantes avec lesquelles on a réalisé ce test de fécondité. L'euphorbe apparaît être la plus favorable, avec un nombre de larves de 3ème stade beaucoup plus important que les autres plantes. Le chou et la tomate sont semblables. La citrouille possède le nombre le plus faible de larves, mais elle est classée dans un même groupe avec la tomate.

Le fait que la citrouille paraisse être la moins appréciée parmi la gamme d'hôte proposée semble contredire les constatations faites avec les 2 biotypes de *B. tabaci* (Ryckewaert, 1998). En effet, il semblerait que la pilosité des feuilles apparaisse comme un facteur fondamental dans la préférence des aleurodes, ceci certainement pour des raisons de protection et de confinement (Berlinger,.1986).

Le résultat obtenu ici est la nette préférence de la majorité des individus pour l'euphorbe, qui est une plante glabre. De plus, cette plante prolifique se rencontre surtout en bordure des parcelles cultivées, il est donc normal de la considérer plante source des aleurodes.

L'analyse des lignées n'a pas montré de différence à l'intérieur même des plantes d'origine. En revanche, des différences ont été révélées entre ces plantes d'origine.

Deux d'entre elles se différencient, et se groupent ensemble, il s'agit de la patate douce et de l'euphorbe. Elles ont une très faible moyenne du nombre de larves, la seule plante hôte présentant des larves est la citrouille. Cette plante qui, pour les autres lignées paraît être la moins favorable.

La lignée d'euphorbe présente un résultat contradictoire avec ce test de fécondité, à savoir que les couples placés sur euphorbe comme hôte proposé n'ont pas entraîné l'apparition de larves sur ce plant, alors que l'euphorbe représente la plante d'origine de cette lignée. On peut alors supposer que l'euphorbe sur laquelle on a rencontré les premiers individus à l'origine de la lignée, ne représente pas le meilleur hôte pour celle-ci. D'après les résultats de ce test, la citrouille semblerait être un hôte plus favorable.

Avec ce test de fécondité, des différences phénotypiques ont été révélées. Ce résultat groupant la patate douce et l'euphorbe rejoint celui obtenu par l'analyse génétique, à savoir qu'il doit exister un biotype particulier commun à la patate douce et à l'euphorbe, biotype différent des A et B témoins.

Les résultats obtenus pour les lignées d'aubergine, de tomate, de chou et de coton sont assez homogènes, en ce qui concerne la préférence d'hôte. Cet ensemble de lignées semblaient se regrouper, d'après l'analyse génétique, dans le biotype B. D'après cette première analyse biologique, on peut supposer que le biotype B représenté ici est plus homogène que le biotype particulier observé avec les lignées d'euphorbe et de patate douce.

Un second test a été réalisé pour se rendre compte des variations biologiques entre les lignées, il s'agit de la transmission du TYLCV.

3-2-2. Test de transmission du TYLCV

Pour évaluer la transmission du TYLCV par nos lignées, 100 ou 200 insectes, suivant l'effectif des lignées, avaient été mis en acquisition sur des plants de tomate virosés, puis placés en inoculation sur des plants de tomate sains. Du fait de la difficulté de déterminer sans confusion la transmission du virus par l'observation directe des symptômes sur les plants (car ils ne sont inoculés qu'au stade 2 feuilles vraies), un test ELISA a été fait systématiquement.

Ce test ELISA a été réalisé sur les souches actuelles d'aubergine, de tomate, de chou, de coton et d'euphorbe.

Tableau 8 : Taux de transmission des lignées

Plante d'origine	Biotype supposé	Nombre de plants inoculés	Taux de transmission
aubergine 2-2 G1	B	200	42 %
aubergine 1-8 G1	B	200	24 %
tomate 2 G0	B	200	21 %
chou 2 G0	B	100	35 %
coton 1 G0	B	100	12 %
euphorbe 1 G0	non B	100	21 %

On remarque que chaque lignée transmet le TYLCV. Les pourcentages de plants contaminés varient de 12 % à 42 %, qui représentent respectivement les taux de plants contaminés par les lignées ce coton 1 G0 et d'aubergine 2-2 G1.

Parmi les 2 lignées ayant l'aubergine comme plante d'origine, le pourcentage de plants révélés positifs connaît une très grande variation entre ces 2 lignées. En effet, il est de 42 % pour la lignée 2-2 G1, contre seulement de 24 % pour la lignée 1-8.

Il n'a pas été possible de faire le test avec les individus issus de patate douce car ces lignées ont assez difficiles à maintenir, en raison du faible taux de survie de ces individus en élevage.

3-2-4. Discussion

Les différents taux obtenus demandent à être vérifiées à l'aide de répétitions. En effet le nombre de plans inoculés pour chaque lignée a été différent il a varié suivant le nombre d'aleurodes disponibles pour ce test. Ceux des souches d'aubergine et de tomate ont été les plus nombreux, ce qui a permis de faire le plus de test.

Toutes les lignées transmettent le TYLCV, qui est à la Réunion l'isolat TYLCV-IL/RE (Peterschmitt *et al.*, 1999). D'après les résultats d'études antérieures sur la transmission de différents isolats du TYLCV (Bedford *et al.*, 1994), il semblerait qu'il y ait des différences de transmission suivant les biotypes de *B. tabaci* et suivant les plantes d'origine.

Les résultats obtenus ici semblent aller dans le même sens en ce qui concerne les lignées (pour l'aubergine), mais des répétitions seraient nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

Conclusion

Les différentes analyses effectuées ont eu pour but de se rendre compte de la diversité de *B. tabaci*, vecteur du Tomato Yellow Leaf Curl Virus, à la Réunion.

Pour identifier la diversité génétique de cet aleurode, des élevages ont été mis en place sur différentes plantes hôtes à partir d'individus prélevés, lors de prospections en différentes localités de l'île.

La majorité des cultures maraîchères se situent sur les côtes Sud et Ouest. Les parcelles infestées par *B. tabaci*, sont à moins de 500 m d'altitude. Au delà, l'espèce en majorité rencontrée est *T. vaporariorum*.

Des analyses moléculaires basées sur la technique RAPD-PCR ont permis de révéler des différences génétiques au sein des lignées de *B. tabaci*. Pour la plupart d'entre elles, de fortes similarités de bandes sont révélées avec le profil caractéristique du biotype B. Ces populations concernent les lignées d'aubergine, de chou, de tomates et de coton.

Il ressort de ces analyses génétiques un biotype particulier révélé par les *B. tabaci* sur euphorbe et sur patate douce. L'analyse des gels et la représentation arborée laisse supposer qu'ils représentent le même biotype.

Cette technique RAPD-PCR a permis de mettre en évidence des amorces informatives sur cette diversité, mais elle connaît des limites notamment au niveau de la distinction des différents biotypes de *B. tabaci* par rapport à des espèces différentes (Gawel & Bartlett, 1993). Aussi, dans le cadre de la suite de notre étude et à partir des constatations faites sur les différentes lignées rencontrées, un test plus précis basé sur le séquençage partiel du génôme des lignées est en cours au CIRAD à Montpellier. Ce test est basé sur le séquençage du gène COI mitochondrial, ce gène est amplifié par PCR à l'aide d'amorces spécifiques (Zhang & Hewitt, 1997).

Le fait de créer des lignées isofemelles a permis d'obtenir une homogénéité au sein des lignées, ceci dès la génération G1, même si deux lignées ont montré des résultats abérrants.

L'analyse de la diversité biologique a révélé une diversité dans les lignées. Le test de fécondité a montré une variabilité qui peut être corrélée avec la variabilité génétique. En effet, les individus du biotype B présentent une certaine homogénéité dans le taux de larves de 3ème stade compté, il permettent le développement de larves sur des plantes hôtes très variées, l'euphorbe représentant la plante hôte la plus favorable.

En revanche, les lignées d'euphorbe et de patate douce n'ont permis le développement de larves uniquement sur citrouille comme plante hôte proposée. Cette dernière fût la plante hôte avec le moins de larves de 3ème stade pour toutes les autres lignées.

Le fait qu'il n'y eu aucune larve de 3ème stade sur euphorbe lors du test de fécondité, avec la lignée ayant l'euphorbe comme plante d'origine montre que l'euphorbe n'est pas l'hôte le plus favorable pour cette lignée au biotype particulier.

Le biotype B est apparu très homogène dans tous les résultats obtenus, on peut alors supposer que son introduction sur l'île a été limitée et s'est déroulée depuis une période moins longue par rapport l'autre biotype rencontré sur patate douce et euphorbe.

La dernière analyse sur la diversité biologique effectuée a concerné la transmission du TYLCV sur la tomate. Les résultats ont montré que toutes les lignées transmettaient le virus. Mais des répétitions seraient nécessaires afin de confirmer et de compléter ces résultats.

Les tests réalisés pour l'analyse biologique de nos lignées n'ont pas pu être réalisé avec des répétitions, car les générations se développent en 25-30 jours. Lors de la suite de l'étude, il sera nécessaire de confirmer ces résultats.

Ces premiers résultats fournissent donc des éléments intéressants sur les différents biotypes de *B. tabaci* présents à la Réunion. Le but étant de garder ces lignées homogènes pour pouvoir bien les identifier, afin de trouver un moyen de lutte efficace contre ce ravageur.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

ANONYME, 1998. TYLCV, un nouveau virus sur la tomate à l'île de la Réunion. Service de protection des végétaux de la Réunion, 16 p.

ANONYME, 1999. AGRESTE, la statistique agricole (mémento agricole-chiffres 1998). Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, 4p.

ANONYME, 1999. Spécial rapport annuel 1999. CIRAD magazine Réunion, 74p.

BARTLETT A. C., & GAWEL, N. J., 1993. Determining whiteflies species. Science (Washington), Vol. 26-1, 1333-1335.

BEDFORD I. D., BRIDDON, R. W., BROWN, J. K., ROSELL, R. C., & MARKHAM, P. G., 1994. Geminivirus transmission and biological characterisation of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographic regions. Annals of applied Biology, Vol. 125, 311-325.

BERLINGER M. J., 1986. Host Plant Resistance to *Bemisia tabaci*. Agriculture Ecosystems Environnemental. Vol.17, 69-82.

BIGARRE L., 1999. Diversité des géminivirus et intéractions avec leurs hôtes. Thèse de Docteur en Sciences, Université de Paris XI biologie, 118p.

BROWN J., & FROHLICH, D. R., & ROSELL, R. C., 1995. The sweet potato or silverleaf whiteflies : biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex?. Annals Review Entomological, Vol. 40, 511-534.

BURBAN C., 1991. Structuration des populations chez un insecte polyphage : Bemisia tabaci (Genn.) (Homoptera : aleyrodidae). Thèse de Docteur en Sciences, Université de Montpellier II, 103p.

BUTLER G. D. Jr. & WILSON F. D., 1984. Activity of Adult Whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae) Within Plantings of Different Cotton Strains and Cultivars as Determined by Sticky-Trap Catches. J. Economical Entomology, Vol. 77, 1137-1140.

BYRNE D., & MILLER W. B., 1990. Carbohydrate and amino-acid composition of phloem sap and honeydew produced by *Bemisia tabaci*. Journal of Insect Physiology, Vol. 36, 433-439.

BYRNE D., BELLOWS J. R. & PARELLA M.P., 1990. Whiteflies in agricultural systems. In whiteflies : their binomics, pest status and management (D. Gerling, Ed), 227-261. Intercept Ltd., Andover, Hants, UK.

BYRNE D., MOORE L., PALUMBO J. C., WATSON T. F., 1992. Whitefly fact sheet. Department of Entomolgy, University of Arizona, 4 p.

BYRNE D., 1999. Migration and dispersal by the sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci*. Agricultural and Forest meteorology, Vol. 97, 309-316.

CABALLERO R., 1996. Identificación de Moscas blancas. In : Metodologías para el estudio y manejo de moscas blancas y geminivirus, 1996. Editor : Luko Hilje, Costa Rica, 1-10.

CAMPBELL B. C., STEFFEN-CAMPBELL J. D. & GILL R. J., 1995. Origin and radiation of whiteflies : an initial molecular phylogenetic assessment. In : Bemisia 1995 : Taxonomy, Biology, Damage, control and management, 1996. Editors : Dan Gerling & Mayer R. T. 29-51.

CHU C. C., HENNEBERRY T. J. & COHEN A. C., 1995. *Bemisia argentifolii* (Homoptera : Aleyrodidae) : host preference and factors affecting oviposition and feeding site preference. Entomological society of America, Vol. 24, 354-360.

CISNEROS P., MUJICA N., 1998. Biological and selective control of the sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hom. : Aleyrodidae). In : Program Report 1997-1998. International Potato Center edition, 255-264.

COHEN S. & BERLINGER M. J., 1986. Transmission and Cultural Control of Whitefly-borne Viruses. Agriculture Ecosystems Environment, Vol. 17, 89-97.

COLMAR-ANDREAS S., 1996. Biología de Moscas blancas. In : Metodologías para el estudio y manejo de moscas blancas y geminivirus, 1996. Editor : Luko Hilje, Costa Rica, 11-21.

COSTA A. S., & BROWN J. K., 1991. Variation in biological characteristics and in esterase patterns among populations of *Bemisia tabaci* Genn. and the association of one population with silverleaf symptoms development. Entomologia Experimentalis et Applicata, Vol. 61, 211-291.

COUDRIET D. L., PABHAKER N., KISHABA A. N. & MEYERDIRK D. E., 1985. Variation in developmental rate on different hosts and overwintering of the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* (Homoptera : Aleyrodidae). Environnemental Entomology., Vol. 14, 516-519.

DUFFUS J. E., 1987. Whitefly transmission of plant viruses. Current topic in vector research edited by K. F. Harris, Vol. 4, 73-91.

DROST, Y. C., VAN LENTEREN, J. C., & VAN ROEMUND, H. J. M., 1998. Life history parameters of different biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera : Aleyrodidae) in relation to temperature and host plant : a selective review. Bulletin of Entomological Research, Vol. 88, 219-229.

FARGETTE D., LESLIE M. & HARRISON B. D., 1996. Serological studies on the accumulation and localisation of three tomato leaf curl geminiviruses in resistant and susceptible *Lycopersicon* species and tomato cultivars. Annals Applied Biology, Vol. 128, 317-328.

FRAPPA C., 1937. Description de *Bemisia manihotis* nuisible au manioc a Madagascar. Bulletin de la société entomologique de France, 30-32.

GAWEL N. J. & BARTLETT A. C., 1993. Characterisation of differences between whiteflies using RAPD-PCR. Insect molecular biology, Vol. 2, 33-38.

GERLING D., 1985. Natural enemies of *Bemisia tabaci*, biological characteristics and potential as biological control agents : a review. Agriculture, ecosystems and environment, Vol. 17, 99-110.

GILL R. J., 1992. A review of sweet potato whitefly in Southern California. Pan-pacific entomologist, Vol. 68, 144-152.

GREATHEAD A. H., 1986. Host Plants. Chapter 3, pp. 17-25. In: *Bemisia tabaci* - a literature survey on the cotton whitefly with an annotated bibliography (Ed. M.J.W. Cock). CAB International Institute of Biological Control, Ascot, UK. 121p.

HEINZ K. M. & PARELLA P., 1994. Poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* Willd. Ex Koltz.) cultivar mediated differences in performance of five natural enemies of *Bemisia argentifolii* Bellows and Perring, n. sp. (Homoptera : Aleyrodidae). Biological Control, Vol. 4, 305-318.

HOELMER K. A., 1995. Whitefly parasitoïds : can they control field populations of *Bemisia*?. In : Bemisia 1995 : Taxonomy, Biology, Damage, control and management, 1996. Editors : Dan Gerling & Mayer R. T. 451-476.

KHEYR-POUR A., BENDAHMANE M., MATZEIT V., ACOTTO G. P., CRESPI, S. & GRONENBORN B., 1991. Tomato yellow leaf curl virus from Sardinia is a whitefly transmitted monopartite Geminivirus. Nucleic Acids Research, Vol. 19, 6763-6769.

LOPEZ-AVILA A., 1986. Taxonomy and biology. Chapter 1., 3-11. In: *Bemisia tabaci* - a literature survey on the cotton whitefly with an annotated bibliography (Ed. M.J.W. Cock). CAB International Institute of Biological Control, Ascot, UK. 121p.

MARKHAM, P. G., BEDFORD, I. D., LIU, S., FROLICH, D. F., ROSELL, R., & BROWN, J. K., 1995. The transmission of Geminivirus by biotypes of Bemisia tabaci (Gennadius). In : Bemisia 1995 : Taxonomy, Biology, Damage control and management, 69-75.

MARTIN J. H., 1987. An identification guide to common whitefly pest species of the world (Homoptera : Aleyrodidae). Tropical Pest Management, Vol. 33, 298-322.

MENOZZI P., 1997. Caractérisation de souches de Bemisia tabaci (Gennadius) par des techniques de biologie moléculaire. CIRAD-CA, Montpellier, 7p.

MENOZZI P., 2000. Caractérisation d'insectes et compréhension des mécanismes de résistance aux insecticides à l'aide de techniques de biologie moléculaire. Thèse de Docteur en Sciences, Université de Paul Sabatier de Toulouse, 225 p.

NAVAS-CASTILLO J., SANCHEZ-CAMPOS S., DIAZ J. A., SAEZ-ALONSO E. & MORIONES E., 1999. Tomato yellow leaf curl virus-Is causes a novel disease of common bean and severe epidemics in tomato in Spain. Plant Disease, Vol. 83, 29-32.

PARRELLA M. P., PAINE T. D., BETHKE J. A., ROBB K. L. & HALL J., 1991. Evaluation of *Encarsia formosa* (Hymenoptera : aphelinidae) for biological control of sweetpotato whitefly (homoptera : Aleyrodidae) on Poinsettia. Entomological society of America, Vol. 20, 713-719.

PERRIER X., 1998. Analyse de la diversité génétique : mesure de dissimilarité et représentations arborées. Thèse de Docteur en Sciences, Université de Montpellier II, 192 p.

PERRING T. M., COOPER A. D., RODRIGUEZ R. J., FARRAR C. A., & BELLOWS T. S. Jr., 1993. Identification of whiteflies species by genomic and behavioral studies. Science, Vol. 259, 74-77.

PERRING T. M., BROWN J., COOPER A. D., BEDFORD I. & MARKHAM P., 1998. Genetic analysis of Bemisia (homoptera: Aleyrodidae) populations by Isoelectric focusing electrophoresis. Second annual review USDA Agriculture Research Service, 19.

PETERSCHMITT M., GRANIER M., MEKDOUD R., DALMON A., GAMBIN O., VAYSSIERES J. F & REYNAUD B. 1999. First report of tomato Yellow Leaf Curl Virus in Réunion Island. Plant disease, 33.

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, Vol. 67, 151-196.

PICO B., DIEZ M. J. & NUEZ F., 1999. Improved diagnostic techniques for tomato yellow leaf curl virus in tomato breeding programs. Plant disease, Vol. 83, 1006-1012.

POLSTON J. E. & ANDERSON P. K., 1997. The emergence of whitefly-transmitted Geminiviruses in tomato in the western Hemisphere. Plant disease, Vol. 81 No 12, 1358-1369.

RAUNET M., 1991. Le milieu physique et les sols de l'île de la Réunion. Edition CIRAD-Région Réunion, 438p.

REYNAUD P., 2000. L'aleurode *Bemisia tabaci* en France, situation actuelle et possibilité de développement. Phytoma, la défense des végétaux, Vol. 527, 18-21.

ROSELL R. C., BEDFORD I. D., MARKHAM P. G., FROHLICH D. R. & BROWN J. K., 1995. Morphological variation in *Bemisia* populations. In : Bemisia 1995 : Taxonomy, Biology, Damage, control and management, 1996. Editors : Dan Gerling & Mayer R. T., 147-149.

RYCKEWAERT P., 1998. Caractérisation des aleurodes du genre Bemisia (Homoptera : Aleyrodidae) dans les Petites Antilles et intérêt de leurs auxilliaires en lutte biologique. Thèse de Docteur en Sciences Université Paul Sabatier de Toulouse, 151p.

RYCKEWAERT P., 1998. Lutte intégrée en cultures maraîchères. Dossiers Techniques Horticulture, CIRAD-FLHOR Martinique, 16 p.

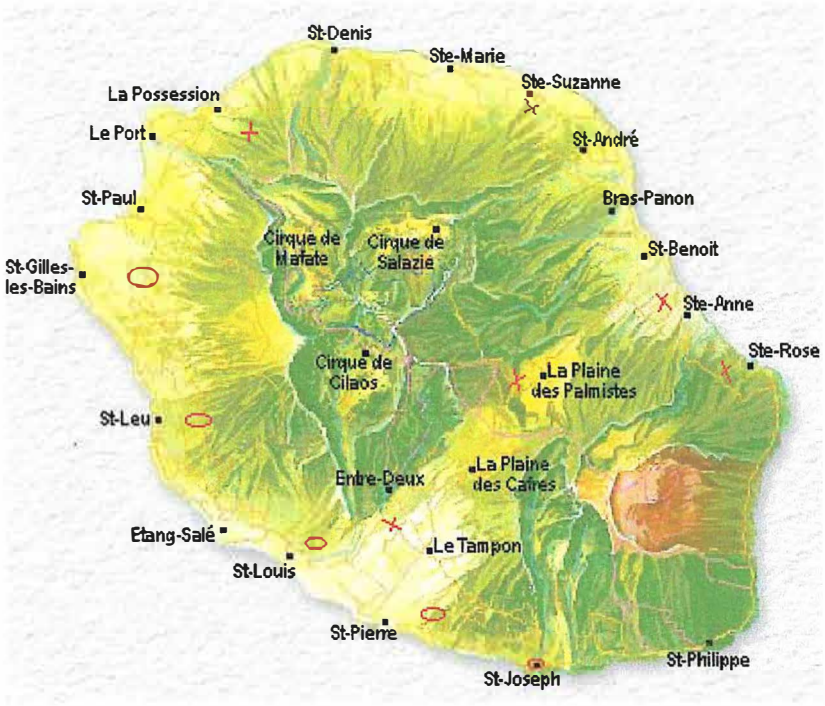
SERVIN R., MARTINEZCARILLO J. L. & HIRALES, L., 1999. Weeds and cultivated hosts of the silverleaf whitefly *Bemisia argentifolii* Bellows and Perring in Baja California Sur, Mexico. Southwestern Entomologist, Vol. 24, 31-36.

SIMMON A. M., 1994. Oviposition on vegetables by *Bemisia tabaci* (Homoptera : Aleyrodidae) : temporal and leaf surface factors. Entomological Society of America, Vol. 23, 381-389.

ZHANG D. X. & HEWITT G. M., 1997. Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial COI primers in insects. Insect molecular Biology, Vol. 6, 143-150.

ANNEXES

Annexe 1 : Différentes prospections de *Bemisia tabaci* sur l 'île



Présence de *B. tabaci*

B. tabaci non trouvé

Annexe 2 : Analyse RAPD-PCR

- ***Tampon** d'extraction :*

KCl (autoclavé) 50 mM
Tris-HCl (autoclavé) 10 mM
Tween 20 0.45 %
NP-40 0. 45 %
Protéinase K 500 µg/ml
Aliquots de 500 µL conservés à –20°C

- ***Tampon MIX :***

Pour chaque amorce:

Amorce (20 pmol/µl) 1µl
dNTP (2.5 mM) 1.5 µl
Tampon 10X Eurobio 1.5 µL
Mg Cl_2 Eurobio 1.5 µl
H_2O 13.35 µl
Taq Eorobio 0.15 µl

- ***Dilutions des amorces et dNTP :***

H9 : diluer 30 X
H16 : diluer 28 X
dNTP (SIGMA) :
diluer 40 X (10 µl de chaque dNTP dans 360 µl d'H_2O)

- ***Programme PCR :***

Cycle X 1 : 5 min 94°C
2 min 40°C
3 min 72°c

Cycles X39 : 1 min 94°C
1.5 min 40°C
2 min 72°C

Stockage à 4°C

- ***Migration :***

Gel d'agarose 1.4 % dans TBE 0.5X
80 V – 2 heures 15 minutes
10 µl de produit PCR par puits

Annexe 3 : Nombre de larves de stade L3 par plante d'origine et par plante hôte

Test de fécondité							
Plante d'origine	Date de comptage	Nbre de larves du stade L3 sur différentes plantes hôtes					
		euphorbe	chou	tomate	citrouille	moyenne	écart-type
aubergine 1	20-juin	15	18	13	4	12.5	6.02771377
aubergine 2	20-juin	22	15	13	3	13.25	7.84750491
tomate 2	14-juin	34	25	38	0	24.25	17.0562794
chou 1	06-juin	29	17	10	0	14	12.1928941
coton 1	06-juin	12	18	0	0	7.5	9
aubergine 3	06-juin	68	17	15	0	25	29.6535552
coton 2	05-juin	17	22	10	0	12.25	9.53502316
chou 2	08-juin	35	28	16	0	19.75	15.3269914
euphorbe 1	07-juin	0	0	0	6	1.5	3
euphorbe 3	14-juin	0	0	0	4	1	2
chou 3	14-juin	174	0	0	14	47	84.923495
tomate 12-5	09-juin	38	10	62	11	30.25	24.8243832
tomate 17-7	16-juin	51	25	0	7	20.75	22.7504579
tomate 7-7	09-juin	27	14	42	0	20.75	17.9513231
tomate 35-6	16-juin	41	38	0	0	19.75	22.838199
Aub 1-8	05-juil	25	43	5	0	18.25	19.7209702
Aub 2-2	27-juin	52	13	32	15	28	18.1291662
Aub 3-2	27-juin	0	18	25	6	12.25	11.3247517
Coton 1-2	27-juil	48	19	0	6	18.25	21.3600094
Coton 2-7	17-juil	36	21	13	3	18.25	13.9373599
Chou 2-1	18-juil	42	0	12	0	13.5	19.8242276
P.douce 1-1	27-juin	0	0	0	25	6.25	12.5
	moyenne	34.81818182	16.40909091	13.90909091	4.727272727		
	écart type	36.34574235	11.81064528	16.62158405	6.48207652		

Annexe 4 : Modèle de la procédure GLM

```
options nocenter ;
options ls=80;
data t1;
infile "c:\Mesdoc~1\laetitia\g0g1.txt"  delimiter='09'x;
input gene $ lignee $ hote $ plante $ larve ;
larve=log10(larve+1);
if plante="citr" then delete ;
run ;

proc sort data=t1;
by gene; run;
proc means data=t1 mean std stderr;
var larve;
by gene;
run;

proc sort data=t1;
by plante; run;
proc means data=t1 mean std stderr;
var larve;
by plante;
run;

proc sort data=t1;
by hote; run;
proc means data=t1 mean std stderr;
var larve;
by hote;
run;

proc sort data=t1;
by lignee; run;
proc means data=t1 mean std stderr;
var larve;
by lignee;
run;

proc print;
run;


proc glm data=t1 ;
class lignee hote plante  ;
model larve= lignee(plante) hote plante plante*hote / int ;
means lignee(plante) hote plante  / SNK tukey REGWQ ;
```

```
contrast 'aub1 / aub2'   lignee(plante) 1 -1 0 0 0
```

Annexe 5 : Tampons utilisés avec les réactifs ADGEN pour le test ELISA

- **Tampon Carbonate (Coating Buffer) :**

Na_2CO_3 1.59 g
$NaHCO_3$ 2.93 g
On dilue l'ensemble avec de l'eau distillée jusqu'à 1 litre
Le pH doit être ajusté à 9.6

- **Tampon d'extraction (TYLCV Extraction Buffer)**

Tris (hydroxymethyl)aminométhane 6.056 g
Sodium sulphite 7.56 g
On dilue l'ensemble avec de l'eau distillée jusqu'à 1 litre
Le pH doit être ajusté à 8.5

- **P.B.S. (Phosphate Buffered Saline) :**

NaCl 8.0 g
KH_2PO_4 0.2 g
$Na_2HPO_4, 2H_2O$ 2.9 g
KCl 0.2 g
qsp 1 litre d'eau distillée
pH ajusté à 7.2

- **Tampon de Lavage (P.B.S.-Tween) :**

P.B.S. 1 l
Tween 20 0.5 ml

- **P.B.S.-Tween-PVP :**

P.B.S.
Tween
Polyvinylpyrrolidone 2 % (poids/volume)

- **Tampon conjugué (Mab dilution buffer) :**

P.B.S.T. 100 ml
Bovine sérum albumine 0.2 g

- **Tampon substrat (Diethanolamine buffer 1M) :**

Diethanolamine 90.39 g
Diethanolamine-HCl 19.82 g
MgCl 0.1 g
Compléter à 1 litre d'eau distillée
Ajuster le pH à 9.8

Titre : Caractérisation de la diversité génétique et biologique de *Bemisia tabaci* Gennadius à la Réunion

Auteur : THORNARY Laetitia

Mots clés : *B.tabaci*, biotypes, RAPD-PCR, plantes hôtes, transmission, TYLCV, ELISA

Résumé : *Bemisia tabaci* (Homoptère : Aleyrodidae), est un ravageur d'importance économique mondiale, notamment en tant que vecteur de Begomovirus dont le Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV). Ce virus est responsable de graves épidémies sur tomate en plein champ comme en culture sous abris à la Réunion depuis 1997. Cette étude vise à caractériser la diversité génétique et biologique de *B. tabaci*. Pour cela des lignées isofemelles ont été créées, à partir d'individus prélevés sur différentes plantes hôtes et localités. Le test d'analyse génétique, réalisé par RAPD-PCR, a montré que la plupart des lignées s'apparentaient au biotype B et il se distinguait un biotype différent sur patate douce et euphorbe comme plantes d'origine. L'analyse biologique a révélé que, parmi la gamme d'hôte proposée, la citrouille apparaissait être un hôte favorable à ces lignées, contrairement à celles de biotype B. La transmission du TYLCV varie en moyenne de 12% à 42%, toutes lignées confondues. Ces résultats fournissent des éléments intéressants pour la connaissance des populations de *B. tabaci* à la Réunion, ceci en vue d'optimiser les techniques de lutte raisonnée contre ce ravageur.

Title : Characterisation of the genetical and biological diversity on *Bemisia tabaci* Gennadius in the Reunion Island.

Author : THORNARY Laetitia

Key words : *B.tabaci*, RAPD-PCR, host plants, transmission, TYLCV, ELISA

Abstract : *Bemisia tabaci* (Homoptera : Aleyrodidae) is among the most serious pest causing worldwide economic losses, especially as vector of Begomoviruses, which include the Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV). Since 1997 this virus has been responsible of great epidemics on tomato in open fields as in greenhouses in Réunion island. The goal of this study was to characterise the genetic and biologic diversity of *B. tabaci*. As a result isofemale lines were started from insects taken from different host plants and localities. The genetic analysis proceeded by RAPD-PCR method showed that the majority of the lines seem to belong to the biotype B, except two collected from sweet potato and euphorbe as native plants. A host plant study revealed that pumpkin was more suitable for non B biotype. Transmission of TYLCV vary from 12% up to 42% for the different lines. Those results give interesting information for a better knowledge of the populations of *B. tabaci* in Réunion in order to optimize techniques of integrated pest management.