

Une polyédrose cytoplasmique d'*Earias insulana* Boisduval, nouvelle affection à Reovirus chez les lépidoptères *Noctuidae* du genre *Earias*

Croizier G. (1), Jacquemard P. (2), Amargier A. (1), Croizier L. (1) et Couilloud R. (3)

(1) Station de recherches de Pathologie comparée, I.N.R.A.-C.N.R.S., 30380 Saint-Christol-lès-Alès.

(2) Laboratoire d'études sur les Entomopathogènes, I.R.C.T., Centre de recherches du G.E.R.D.A.T., 34032 Montpellier Cedex.

(3) Laboratoire d'élevage et de nutrition d'Insectes, Centre de recherches du G.E.R.D.A.T., 34032 Montpellier Cedex.

RÉSUMÉ

Une polyédrose cytoplasmique létale a été observée chez des chenilles d'*Earias insulana* Boisduval, à Maroua dans le nord du Cameroun en 1981. Le Reovirus responsable de la maladie se multiplie uniquement dans les cellules de l'intestin moyen. Il diffère du Reovirus récemment décrit chez *Earias biplaga* Wlk, qui possède un tropisme tissulaire plus large que le virus d'*E. insulana*. Les virions des Reovirus d'*E. insulana* et d'*E. biplaga*

mesurent respectivement 60 et 55 nm. L'analyse des génomes par électrophorèse en gel d'acrylamide des segments d'ARN bicaténaire montre l'absence de parenté entre ces deux Reovirus. Elle montre en outre chez ces virus une grande hétérogénéité génétique dont la nature est discutée dans ce mémoire.

MOTS CLÉS : *Earias insulana*, *Earias biplaga*, polyédrose, Reovirus.

INTRODUCTION

Parmi les noctuelles du genre *Earias*, inféodées aux Malvales, deux espèces, *Earias biplaga* Wlk et *Earias insulana* Boisduval, ont une incidence économique plus ou moins prononcée dans les cultures cotonnières.

La distribution géographique d'*Earias biplaga* se limite aux zones tropicales du continent africain et à Madagascar; celle d'*E. insulana*, plus vaste que la précédente, couvre les mêmes régions et s'étend, en outre, depuis le bassin méditerranéen jusqu'au Japon, en passant par l'Inde et le sud de la Chine. Alors qu'*E. biplaga* se rencontre dans les zones subtropicales humides, *E. insulana*, espèce euritherme et plus rustique, s'accommode de conditions climatiques contrastées, ce qui lui permet d'occuper une aire géographique plus étendue.

L'application d'insecticides chimiques est le moyen habituel de protection des cultures cotonnières contre ces deux ravageurs. Des recherches en lutte biologique sont entreprises par l'I.R.C.T. et portent à la fois sur l'utilisation d'entomophages (*Trichogramma* sp. et *Trichospilus* sp.) et d'entomopathogènes (*Bacillus thuringiensis*). Un renforcement de ce programme pourrait être prochainement envisagé grâce à la découverte récente

de maladies virales chez ces deux prédateurs.

Une polyédrose nucléaire et une polyédrose cytoplasmique ont été signalées au Maroc chez *E. insulana* (LE GALL, 1961), mais n'ont jamais fait l'objet d'une étude particulière.

En 1970, au Centre de recherches du G.E.R.D.A.T., une maladie virale s'est manifestée spontanément dans les élevages d'*E. biplaga* conduits à partir d'insectes originaires de Côte-d'Ivoire. L'étude de cette maladie jusqu'alors non signalée a mis en évidence une polyédrose cytoplasmique due à un Reovirus à tropisme tissulaire large (CROIZIER *et al.*, 1981). En 1981, à Maroua au Nord-Cameroun, JACQUEMARD observe à partir d'une population naturelle d'*E. insulana*, des chenilles malades présentant des polyèdres dans le cytoplasme des cellules intestinales.

Cette note a pour objet d'étudier la polyédrose cytoplasmique originaire du Nord-Cameroun, de présenter les caractères histopathologiques manifestés par les larves d'*E. insulana* lors d'infections expérimentales et de comparer par analyse de leur génome les deux isolats de Reovirus d'*E. insulana* et d'*E. biplaga*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Techniques d'élevage

Elles ont été décrites dans une note précédente (CROIZIER *et al.*, 1981).

Techniques histologiques

Des larves d'*E. insulana* présentant des symptômes de la maladie, sont fixées, après incision du tégument, dans le liquide de Bouin, puis déshydratées dans une série de bains d'alcool éthylique et une série de bains d'alcool butylique et, enfin, incluses dans le paraplast. Les coupes de 5 µm d'épaisseur sont colorées par la méthode de VAGO-AMARGIER (1963).

Purification des polyèdres

Les polyèdres sont isolés du broyat de l'intestin des larves d'*E. insulana* et d'*E. biplaga*. Les intestins sont finement broyés en présence de SDS (sodium dodécyl sulfate) à 0,1 %. La suspension est filtrée sur gaze et les polyèdres amenés au culot (10 000 g, 15 min.). Les polyèdres remis en suspension dans une solution de SDS à 0,1 % sont centrifugés sur gradient de sucrose (20-60 % poids/poids, 30 000 g, 1 h). Deux ou trois cycles de centrifugation en gradient, selon les préparations, sont nécessaires pour obtenir des suspensions de polyèdres suffisamment pures. Les polyèdres sont lavés par plusieurs cycles de centrifugation en sérum physiologique dépourvu de SDS.

Purification des virions

Les virions sont libérés par action du carbonate disodique 0,1 M. La dissolution des polyèdres est contrôlée au micro-

scope optique. Les virions sont centrifugés dès la dissolution des polyèdres en gradient de sucre (gradient 15-40 % poids/poids, rotor SW 27.1 BECKMANN, 20 000 RPM, 2 h). La bande contenant les virions est recueillie sur un collecteur automatique de type ISCO et les virions sont sédimentés pour l'étude au microscope électronique et pour l'analyse de l'acide nucléique (rotor SW 41 Ti, 35 000 RPM, 1 h 30).

Technique de microscopie électronique

Les virions sédimentés sont remis en suspension dans quelques microlitres d'eau distillée fraîche et sont déposés sur grille. La préparation est contrastée négativement par le phosphotungstate de potassium à 1 %. Les observations sont faites avec un microscope HITACHI HU 11 C.

Electrophorèse des segments d'ARN

Les suspensions virales issues des polyèdres cytoplasmiques d'*E. insulana* et d'*E. biplaga* sont placées à l'incubateur pendant 2 h à 37 °C en tampon Tris contenant 0,1 mg/ml de protéinase K (MIALHE *et al.*, 1983). Les électrophorèses sont conduites en plaques verticales de 12 cm de hauteur. La technique de LAEMMLI (1970) est utilisée avec un gel de tassement à 4 % et un gel de séparation de 6 % d'acrylamide. Les échantillons sont déposés sous des volumes variant de 2 à 40 µl. Un échantillon de virus de polyédrose cytoplasmique de *Bombyx mori* est inclus dans la série comme référence (FUJII-KAWATA et MIURA, 1970). La migration électrophorétique dure 18 heures. Les gels sont colorés par du bromure d'éthyldium et examinés à 254 nm.

RÉSULTATS

Symptomatologie

Les symptômes de la maladie chez *E. insulana* sont identiques à ceux observés chez *E. biplaga* atteint de la virose cytoplasmique déjà décrite. On constate chez les chenilles un retard de croissance dû à un arrêt de la consommation. Les larves devenant inactives prennent une consistance molle et produisent parfois des soies avant d'avoir atteint le dernier stade larvaire. Lors de l'observation initiale de la virose, en octobre à Maroua, 37 chenilles sur les 141 prélevées aux champs, sont mortes après avoir présenté les symptômes de la polyédrose cytoplasmique.

Histologie

L'examen des coupes transversales de larves montre que les cellules de la paroi intestinale de l'intestin moyen sont infectées. Les polyèdres se trouvent dans le cytoplasme des cellules cylindriques, des cellules caliciformes et des cellules de régénération situées près de la basale de l'épithélium (fig. 1 et 2). Dans les cellules musculaires et trachéolaires de la tunique péri-intestinale, il n'a pas été observé de corps d'inclusion de virus. Ceux-ci n'ont jamais été décelés au-delà de la membrane basale de l'épithélium intestinal du côté de la cavité viscérale. Par contre, du côté de la lumière intestinale, les bords cellulaires sont souvent détruits et on remarque la libération des polyèdres dans le contenu intestinal (fig. 1).

Le diamètre des polyèdres se situe généralement entre 1 et 3 μm , mais peut parfois atteindre 4 μm .

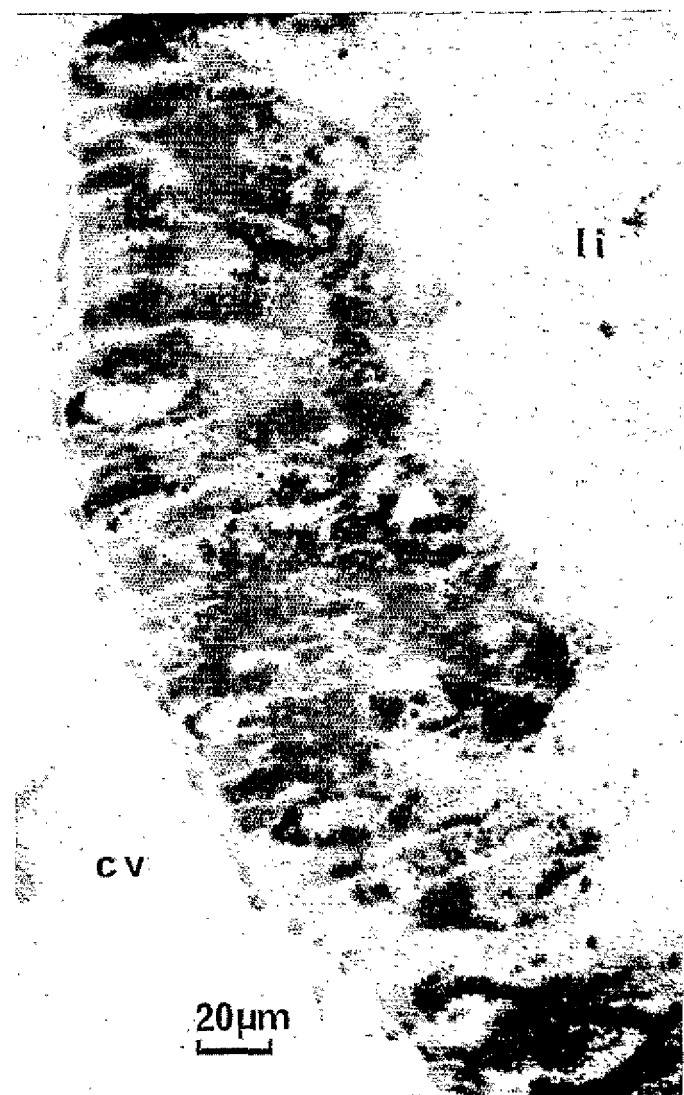


FIG. 1. — Partie de section transversale de l'intestin moyen de larve d'*E. insulana* atteinte de virose. Polyèdres dans les cytoplasmes des cellules. Les polyèdres issus des cellules éclatées se trouvent dans la lumière intestinale. cv : cavité viscérale ; li : lumière intestinale. Coloration VAGO-AMARGIER.

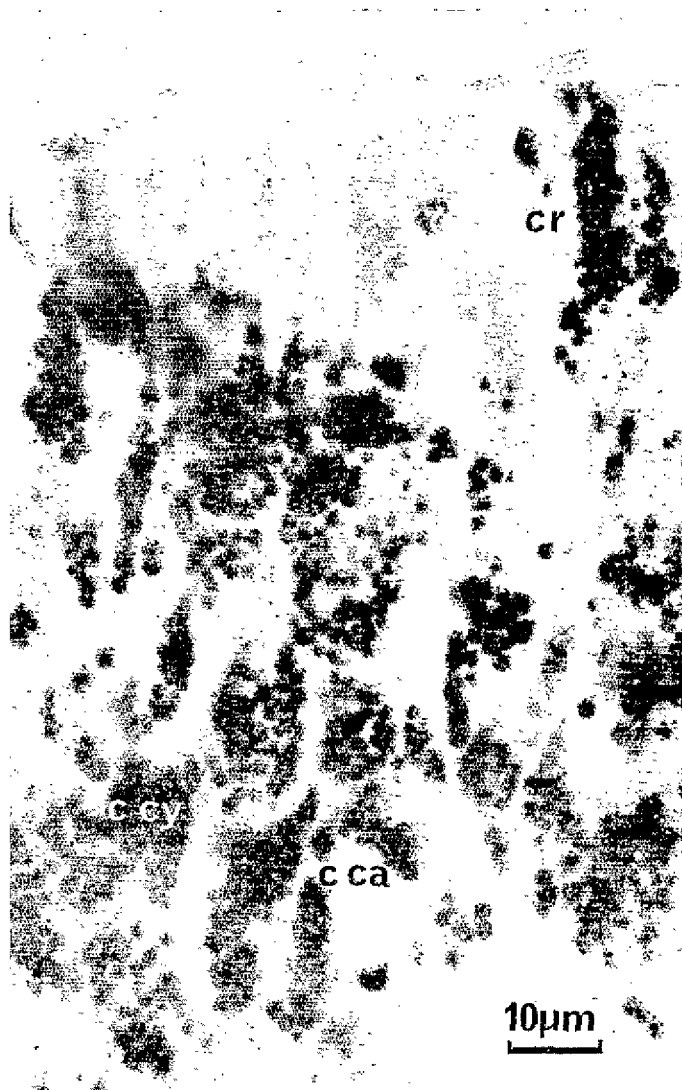


FIG. 2. — Fragment d'intestin montrant tous les types de cellules de l'épithélium intestinal infectées. cr : cellules de régénération ; cy : cellules cylindriques ; ca : cellules caliciformes. Coloration VAGO-AMARGIER.

Microscopie électronique

Les particules virales issues des polyèdres cytoplasmiques d'*E. insulana* et d'*E. biplaga* présentent divers degrés de dégradation (fig. 3 et 4). Sur les particules vides ou pleines, on distingue les projections caractéristiques des virions des Reovirus de polyédrose cytoplasmique. Les virions du Reovirus d'*E. insulana* mesurent 60 nm, tandis que ceux du virus d'*E. biplaga* mesurent 55 nm.

Electrophorèse des segments d'ARN des Reovirus d'*E. insulana* et d'*E. biplaga*

Les segments d'ARN bicaténaire des deux Reovirus d'*Earias* sont représentés dans la figure 5. Les poids moléculaires des segments sont estimés en prenant pour référence les segments du Reovirus de *E. mori* (fig. 6).

Le diagramme des ARN du virus d'*Earias insulana* comporte plus de segments que celui des polyédroses cytoplasmiques où le nombre habituel est de 10 (fig. 5). Sur ce diagramme, on dénombre 8 segments apparemment équimoléculaires, plus 3 bandes plus importantes correspondant à des segments de poids moléculaires de $0,55 \times 10^6$, $1,05 \times 10^6$ et $1,15 \times 10^6$ daltons. Dans la bande supplémentaire la moins mobile, de poids moléculaire de $2,6 \times 10^6$ daltons, il y a superposition d'au moins 3 segments (fig. 6). Au total, le diagramme fait apparaître 14 segments au minimum.

Le diagramme des ARN du virus d'*E. biplaga* peut être décomposé en un ensemble de 10 segments classiques de poids moléculaires compris entre $0,36$ et $2,5 \times 10^6$ daltons et en 3 segments mineurs additionnels de poids moléculaires plus faibles (fig. 5 et 6).

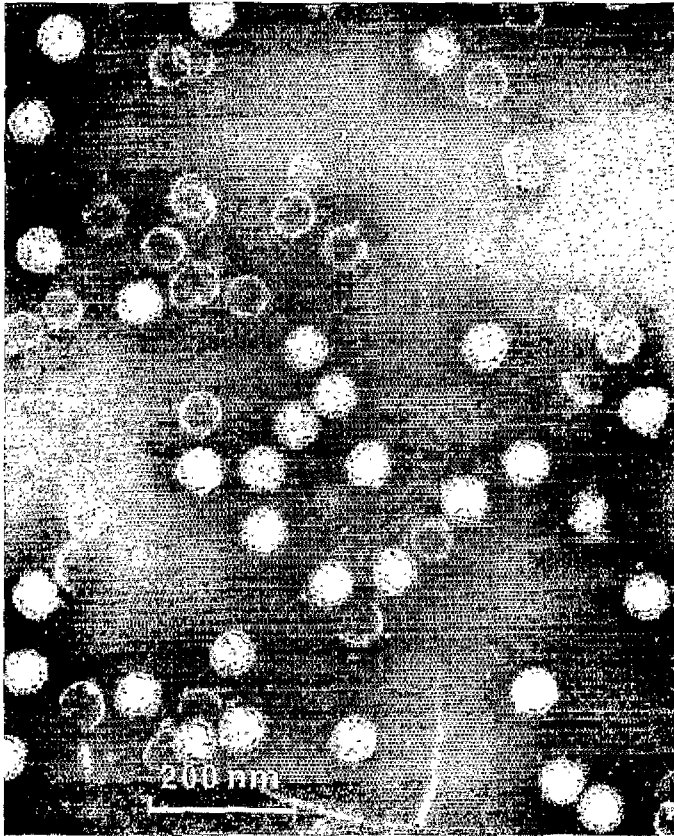


FIG. 3. — Suspension de virions du Reovirus d'*E. insulana*. Microscopie électronique: coloration négative au phosphotungstate de potassium.

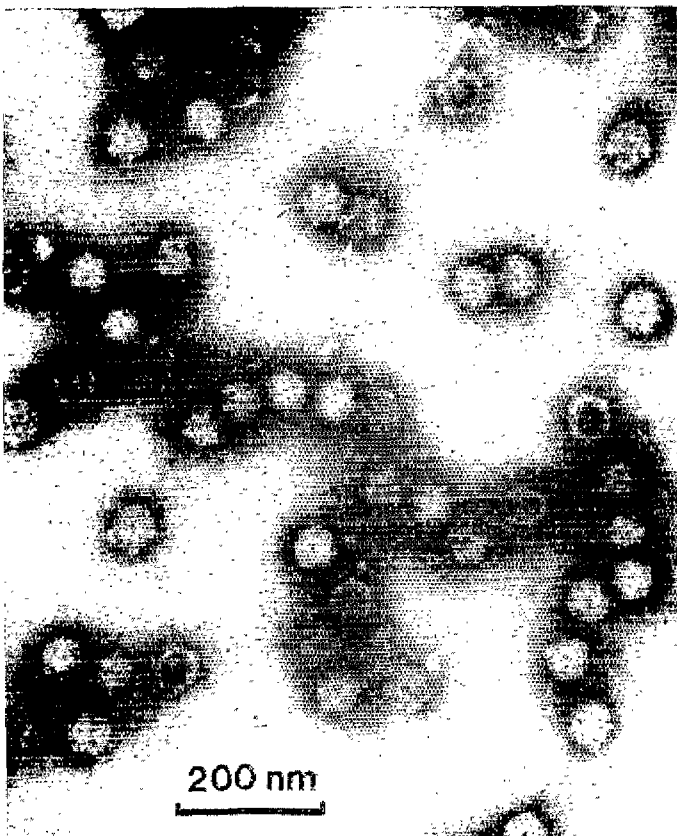
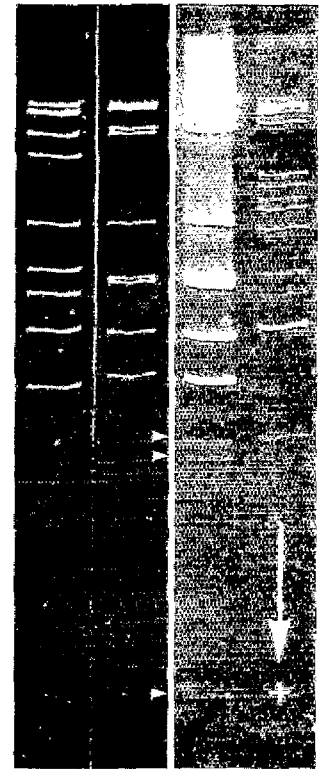


FIG. 4. — Suspension de virions du Reovirus d'*E. biplaga*. Microscopie électronique: coloration négative au phosphotungstate de potassium. Triangles blancs: projections ornant les virions.

FIG. 5. — Comparaison en gel de polyacrylamide des segments d'ARN bicaténaire des Reovirus des polyédroses cytoplasmiques d'*Earias insulana* et *Earias biplaga*.

- a) Reovirus de la polyédrose cytoplasmique de *Bombyx mori*. Reovirus de référence.
 - b) Reovirus d'*E. biplaga* montrant les 10 segments majeurs.
 - c) Reovirus d'*E. biplaga*. Chargement important du gel permettant la mise en évidence de trois segments mineurs (triangles blancs).
 - d) Reovirus d'*E. insulana*. présence de 12 bandes d'intensité variable.
- Fleche blanche: sens de migration des ARN.



B. mori E. biplaga a b c d
E. insulana

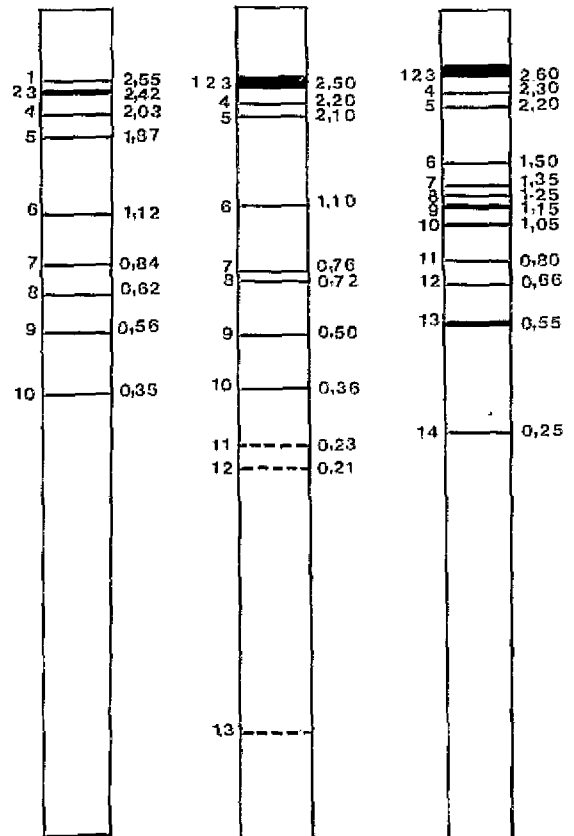


FIG. 6. — Diagramme électrophorétique des segments d'ARN des Reovirus des polyédroses cytoplasmiques. *B. mori*: Reovirus de la polyédrose cytoplasmique de *Bombyx mori*. *E. insulana*: Reovirus de la polyédrose cytoplasmique d'*Earias insulana*. *E. biplaga*: Reovirus de la polyédrose cytoplasmique d'*Earias biplaga*. A gauche des diagrammes figurent les numéros des segments. A droite des diagrammes figure l'estimation des poids moléculaires des segments. Unité: 10⁶ daltons.

DISCUSSION ET CONCLUSION

L'examen du virus isolé chez les chenilles d'*E. insulana* à Maroua en 1981 montre qu'il s'agit d'un Reovirus responsable d'une polyédrose cytoplasmique, doué d'un tropisme tissulaire, limité aux cellules de l'intestin moyen dont les particules mesurent 60 nm. Ce virus diffère du Reovirus d'*E. biplaga* qui possède un tropisme tissulaire plus large dont les particules virales mesurent 55 nm.

Une analyse des génomes par électrophorèse des segments d'ARN confirme l'absence de parenté entre les deux virus, car ils ne possèdent pratiquement aucun segment d'ARN de poids moléculaire comparable.

Chez les deux virus, le diagramme des segments d'ARN est inhabituel. Le Reovirus d'*E. biplaga* comporte trois segments mineurs supplémentaires. Ces segments ne proviennent pas de contamination. Il a été vérifié au cours des étapes successives de purification que ces trois segments sont bien liés à l'existence de particules virales et non à celle des impuretés

accompagnant les virions (résultats non présentés). La nature de ces courts segments d'ARN reste obscure en l'absence d'analyse particulière. La complexité du diagramme obtenu pour le Reovirus d'*E. insulana* indique la présence de plusieurs types viraux. Dans des cas analogues, l'hypothèse d'un mélange de deux Reovirus a été avancée ou même prouvée (PAYNE, 1975; PAYNE et RIVERS, 1976). Cependant, la grande fréquence des réassortiments de segments chez les Reoviridae et l'existence de diverses altérations du génome de ces virus donnent à penser que la juxtaposition de deux Reovirus n'explique pas à elle seule les diagrammes du type de celui que nous observons pour le Reovirus d'*E. insulana* (MUSTOE *et al.*, 1978; RUBINSTEIN et HARLEY, 1978; JOKLIK, 1978; RAMIG *et al.*, 1983). Il en résulte que la diversité génétique des Reovirus associés aux *Earias* est grande, en particulier chez *E. insulana*, et qu'on pourrait, par clonage des virus, extraire différents pathotypes présentant un intérêt pour lutter contre ces ravageurs du cotonnier.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- CROIZIER G., AMARGIER A., JACQUEMARD P., COULLLOUD R. et CROIZIER L., 1981. — Polyédrose cytoplasmique d'*Earias biplaga* Wlk. (Lépidoptère, Noctuidae), due à un Reovirus à tropisme tissulaire large. *Cot. Fib. trop.*, 36, 127-135.
- FUJII-KAWATA I. and MIURA K., 1970. — Segments of genome of viruses containing double-stranded ribonucleic acid. *J. mol. Biol.*, 51, 247-253.
- JOKLIK W.K., 1981. — Structure and function of the Reovirus genome. *Microbiol. Reviews*, 45, 483-501.
- LAEMMLI U.K., 1970. — Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (London), 227, 680-685.
- LE GALL J., 1961. — Problèmes phytosanitaires du cotonnier au Maroc. *Al Awamia*, 1, 75-99.
- MIALHE E., CROIZIER G., VEYRUES J.C., QUIOT J.M. et J.P. RIEB, 1983. — Étude d'un virus isolé d'une population naturelle de *Culicoides* sp. (Diptera: Ceratopogonidae). *Ann. Virol.* (Institut Pasteur), 134, 73-86.
- MUSTOE T.A., RAMIG R.F., SHARPE A.H. and FIELDS B.N., 1978. — Genetics of Reovirus: identification of the RNA segments encoding the polypeptides of the μ and size classes. *Virology*, 89, 594-604.
- PAYNE C.C., 1976. — Biochemical and serological studies of a cytoplasmic polyhedrosis virus from *Arectia caja*: a naturally occurring mixture of two virus types. *J. gen. Virol.*, 30, 357-369.
- PAYNE C.C. and RIVERS C.F., 1976. — A provisional classification of cytoplasmic polyhedrosis viruses based on the sizes of the RNA genome segments. *J. gen. Virol.*, 33, 71-85.
- RAMIG R.F., AHMED R. and FIELDS B.N., 1983. — A genetic map of Reovirus: assignment of the newly defined mutant groups H, I and J to genome segments. *Virology*, 125, 299-313.
- RUBINSTEIN R. and HARLEY E.H., 1978. — Reproducible alteration of cytoplasmic polyhedrosis virus double-stranded RNA genome patterns on laboratory passage. *Virology*, 84, 195-198.
- VAGO C. et AMARGIER A., 1963. — Coloration histologique pour la différenciation des corps d'inclusion polyédriques de virus d'insectes. *Ann. Epiphyties*, 14, 269-274.

A cytoplasmic polyhedrosis of *Earias insulana* Boisduval, a new Reovirus disease in the Lepidoptera *Noctuidae* of the genus *Earias*

Croizier G., Jacquemard P., Amargier A., Croizier L. and Coulloud R.

SUMMARY

A lethal cytoplasmic polyhedrosis was observed in the larvae of *Earias insulana* Boisduv. in Maroua North Cameroons in 1981. The causative Reovirus multiplied only in the midgut and differed from the polyhedrosis Reovirus of *Earias biplaga* Wlk. which had a wide tissue tropism. The virions of the Reovirus of *E. insulana* and *E. biplaga* measured 60 and 55 nm res-

pectively. The electrophoretic analysis in acrylamide gel of the double stranded RNA segments revealed the absence of relationship between the Reoviruses. It also showed in these viruses a great genetic diversity the nature of which is discussed in this paper.

INTRODUCTION

Among the noctuids of the genus *Earias* damaging to the Malvales, two species, *Earias biplaga* Wlk. and *Earias insulana* Boisduv. have a great economic incidence in the cotton growing areas.

The extension of *Earias biplaga* is limited to the African continent and Madagascar. The wider range of *Earias insulana* covers Africa, Madagascar and reaches from the Mediterranean basin to Japan, extending across India and the South of China. Whereas *E. biplaga* is found in humid subtropical areas, *E. insulana* which is an eurythermous species and, consequently a more resistant one, adapts itself to contrasted climatic conditions and spreads over a more extended geographic area.

Application of chemical insecticides is the current means of protection in cotton culture against both pests. A biological control programme undertaken by I.R.C.T. concerning the use of entomophagous insects (*Trichogramma* sp. and *Trichospilus* sp.) and entomopathogens (*Bacillus thuringiensis*) is currently under way. It will soon be possible to extend this

programme thanks to the recent discovery of viral diseases in both these pests.

A nuclear polyhedrosis and cytoplasmic polyhedrosis in *E. insulana* had been reported in Morocco (LE GALL, 1961) but they have never been particularly investigated.

At the Research Center of the G.E.R.D.A.T. in 1970 a viral disease appeared spontaneously in the rearings of *E. biplaga* conducted with insects originating from Ivory Coast. The study of this disease which had never been reported until then provided evidence of a cytoplasmic polyhedrosis due to a Reovirus with wide tissue tropism (CROIZIER *et al.*, 1981). In Maroua, North Cameroons, in 1981, JACQUEMARD observed in a natural population of *E. insulana* diseased larvae exhibiting polyhedra in the cytoplasm of the gut cells. This paper deals with the study of the cytoplasmic polyhedrosis originating from North Cameroons and presents the histopathological characteristics manifested by experimentally infected larvae of *E. insulana* and compares by analysis of their genome the two Reovirus isolates of *E. insulana* and *E. biplaga*.

MATERIAL AND METHOD

Rearing techniques

They were described in a preceding paper (CROIZIER *et al.*, 1981).

Histological techniques

Larvae of *E. insulana* showing symptoms of the disease were fixed in Bouin solution after incision of the integument, dehydrated in a series of ethyl alcohol baths and a series of butyl alcohol baths, then embedded in paraplast. 3 μ m thick sections were stained by the method of VAGO-AMARGIER (1963).

Purification of the polyhedra

The polyhedra were isolated from the triturated gut of diseased *E. insulana* and *E. biplaga* larvae. The guts were finely ground in the presence of 0.1% SDS (sodium dodecyl sulfate). The suspension was filtered through a gauze and the polyhedra were pelleted (10,000 g, 15 min.). The polyhedra resuspended in a 0.1% SDS solution were centrifuged on sucrose gradient (20-60% weight/weight, 30,000 g, 1 hour). According to preparations, 2 to 3 gradient centrifugation cycles were necessary to obtain suspensions of sufficiently pure polyhedra. The polyhedra were washed by several centrifugation cycles in SDS free 0.9% NaCl saline.

Purification of the virions

The virions were released by dissolution of the polyhedra with 0.1 M disodium carbonate. The dissolution was control-

led under optical microscope. The freed virions were centrifuged immediately after the dissolution of the polyhedra (gradient 15-40% weight/weight rotor SW 27.1 Beckmann, 20,000 RPM, 2 hours). The band of virions was collected on an ISCO type automatic collector and the virions were pelleted for electron microscope study and nucleic acid analysis (rotor SW Ti, 35,000 RPM, 90 min.).

Electron microscopy technique

The pelleted virions resuspended in a few microlitres of freshly prepared distilled water were deposited on a grid. The preparation was negatively contrasted with 1% potassium phosphotungstate. Observations were made under a HITACHI HU 11C microscope.

Electrophoresis of RNA segments

The viral suspensions from cytoplasmic polyhedra of *E. insulana* and *E. biplaga* were incubated at 37°C for 2 hours in a Tris buffer containing 0.1 mg/ml of proteinase K (MILNE *et al.*, 1933). The electrophoreses were conducted in vertical 12 cm high slabs. The technique of LAMONT (1970) was used with a 4% stacking gel and a 6% acrylamide separation gel. The volume of the deposited samples ranged from 2 to 40 μ l. A sample of cytoplasmic polyhedrosis virus of *Bombyx mori* was included as reference in the comparison of the viruses of *Earias* (FUJII-KAWATA and MURA, 1970). The electrophoretic migration lasted 18 hours. The gels were stained with ethidium bromide and examined at 254 nm.

RESULTS

Symptomatology

The symptoms of the disease in *E. insulana* were identical with those observed in *E. biplaga* affected by cytoplasmic polyhedrosis. A retardation in growth due to cessation of feeding was observed in the larvae. They became sluggish and flaccid and sometimes produced silk before they had reached the last larval instar. In Maroua, late in October 1981, 37 out of the 141 larvae of the population in which the viral disease had been initially observed, had died after they had shown symptoms of cytoplasmic polyhedrosis.

Histology

The examination of transverse sections of larvae revealed an infection of the gut wall cells of the midgut. Polyhedra were seen in the cytoplasm of all cell types: cylindrical cells, goblet cells and regeneration cells situated near the basal membrane of the epithelium (fig. 1 and 2). No virus inclusion bodies were observed in the muscle cells and in the tracheal cells of the perintestinal sheath beyond the basal membrane of the gut epithelium on the side of the visceral cavity. On the other hand, on the side of the gut lumen the cell borders were often destroyed and freed polyhedra were seen in the gut contents (fig. 1). The diameter of the polyhedra ranged from 1 to 3 μ m - Some of them were 4 μ m long.

FIG. 1. — Part of transverse section of the midgut of *E. insulana* larvae affected by virosis. Polyhedra in the cytoplasm of the cells. Polyhedra freed from disrupted cells are in the gut lumen.

cv: visceral cavity; li: gut lumen. Staining VAGO-AMARGIER.

FIG. 2. — Fragment of gut revealing infection in all types of cells of gut epithelium.

cr: regeneration cells; c cy: cylindrical cells; c ca: goblet cells. Staining VAGO-AMARGIER.

Electron microscopy

The viral particles issued from cytoplasmic polyhedra of *E. insulana* and *E. biplaga* showed various stages of damage (fig. 3 and 4). Typical projections of the virions of cytoplasmic polyhedrosis Reoviruses were seen on the empty or full particles. The virions of the Reovirus of *E. insulana* measured 60 nm whereas those of the virus of *E. biplaga* measured 55 nm.

FIG. 3. — Suspension of virions of the Reovirus of *E. insulana*. Electron microscopy: negative staining with potassium phosphotungstate.

FIG. 4. — Suspension of virions of the Reovirus of *E. biplaga*. Electron microscopy: negative staining with potassium phosphotungstate. White triangles: projections of virions.

Electrophoresis of the RNA segments of the Reovirus of *E. insulana* and *E. biplaga*

The double stranded RNA segments of both Reoviruses of *Earias* are shown in fig. 5. The molecule weights of the segments were estimated by taking as reference the segments of the Reovirus of *B. mori* (fig. 6). The diagram of the RNA of the virus of *E. insulana* includes more segments than the 10 segments usually observed for cytoplasmic polyhedroses (fig. 5). On this diagram one counts 8 apparently equi-molar segments plus 3 more important bands corresponding to segments having a molecule weight of 0.55×10^6 , 1.05×10^6 and 1.15×10^6 daltons. Moreover in the additional band of 2.6×10^6 daltons there is a superposition of at least 3 segments (fig. 6). The diagram shows a minimum total of 14 segments.

The diagram of the RNA of the virus of *E. biplaga* may be resolved in a whole of 10 usual segments having a molecule weight ranging between 0.36 and 2.5×10^6 daltons and of 3 additional minor segments having lower molecule weights (fig. 5 and 6).

FIG. 5. — Comparison in polyacrylamide gel of the double stranded RNA segments of the Reoviruses of the cytoplasmic polyhedroses of *E. insulana* and *E. biplaga*.
 a) Reoviruses of the cytoplasmic polyhedrosis of *Bombyx mori*, Reovirus of reference.
 b) Reovirus of *E. biplaga* showing 10 major segments.
 c) Reovirus of *E. biplaga*. Heavily over-loaded gel allowing the providing of evidence of 3 minor segments (white triangles).
 d) Reovirus of *E. insulana*: presence of 12 bands of variable intensity. White arrow: direction of migration of the RNA.

FIG. 6. — Electrophoretic diagram of the RNA segments of the Reoviruses of cytoplasmic polyhedroses.

B. mori: Reovirus of the cytoplasmic polyhedrosis of *Bombyx mori*.

E. insulana: Reovirus of the cytoplasmic polyhedrosis of *Earias insulana*.

E. biplaga: Reovirus of the cytoplasmic polyhedrosis of *Earias biplaga*.

To the left of the diagrams the segments are numbered.

To the right of the diagrams is the estimate of the molecule weights of the segments. Unit: 10^6 daltons.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The examination of the virus isolated from diseased *E. insulana* larvae in Maroua in 1981 showed that the infective agent responsible for the cytoplasmic polyhedrosis was a Reovirus with a narrow tissue tropism limited to the midgut cells. This virus differed from the Reovirus of *E. biplaga* in its tissue tropism and also in the size of its viral particles (55 and 60 nm respectively for the Reoviruses of *E. biplaga* and *E. insulana*).

The analysis of the genomes by electrophoresis of the RNA segments confirmed the absence of relationship between the two viruses which had practically no RNA segment with comparable molecule weight.

The diagram of the RNA segments of both viruses was unusual. The Reovirus of *E. biplaga* included 3 additional minor segments. These segments were not due to contamination. In the course of the successive purification stages it had been verified that these 3 segments were linked to the viral

particles and not to contaminants (results not presented). The nature of these short RNA segments has not been particularly analysed and remains obscure. The complexity of the diagram obtained for the Reovirus of *E. insulana* indicates the presence of several viral types. In similar cases the mixture of the two Reoviruses had been assumed or even proved (PAYNE, 1976; PAYNE and RIVERS, 1976). However, the high frequency of segment reassortments in the Reoviridae and the existence of various alterations of the genome of the viruses lead to the belief that the juxtaposition of the Reoviruses alone does not explain diagrams such as were observed for *E. insulana* (MUSTOE *et al.*, 1978; RUBINSTEIN and HARLEY, 1978; JOKLIL, 1978; RAMING *et al.*, 1983). The result is that the genetic diversity of the Reoviruses of *Earias* is great, particularly in *E. insulana* and that it will be possible through cloning of the viruses to extract different interesting pathotypes in order to control these cotton pests.

RESUMEN

En 1981, se observó en Maroua, en el norte del Camerún, una poliedrosis citoplásmica fetal en las orugas de *Earias insulana* Bois. El Reovirus responsable de la enfermedad solo se multiplica en las células del intestino medio. Difiere del Reovirus recientemente descrito en *Earias biplaga* Wlk., el cual posee un tropismo tisular más ancho que el virus de *Earias insulana*. Los viriones de los Reovirus de *E. insulana* y *E. biplaga* miden respectivamente 60 y 55 nm. El análisis de los genomas por electroforesis en gel de acrilámina de los segmentos de ARN bicatenario muestra que no hay parentesco entre estos dos Reovirus. Muestra también que existe entre ellos una gran heterogeneidad genética cuyas características están investigadas en este informe.