

Association de l'ADN simple brin avec le dépérissement foliaire du cocotier au Vanuatu (1)

J. W. RANGLES (2), J. F. JULIA (3), C. CALVEZ (3) et M. DOLLET (4)

Résumé. — Le dépérissement foliaire, transmis par l'Homoptera Cixiidae, *Myndus taffini*, qui pique les feuilles pour se nourrir, est une maladie d'une étiologie inconnue qui se développe sur les cocotiers au Vanuatu. L'extraction à partir de tissu foliaire atteint par la maladie, avec ou sans un traitement de digestion par la cellulase, et suivie par une précipitation avec 8 p. 100 de polyéthylène glycol 6 000 ainsi que par une centrifugation à vitesse rapide, a donné un composant sédimentable qui contient un ADN simple brin. Ce composant possède un coefficient de sédimentation estimé à moins de 75 S, ainsi que des densités de flottation en Nycodenz et en Cs_2SO_4 respectivement de 1,21-1,25 g/ml et d'environ 1,36 g/ml, mais aucune particule d'aspect viral n'a été spécifiquement associée avec ce composant. Un essai pour l'ADN, basé sur l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide et sur la coloration à l'argent, a montré que cet ADN était spécifique à la maladie. Son poids moléculaire estimé se trouvant entre 2 et 3×10^6 en gel de polyacrylamide de 3,3 p. 100, il semble ne pas être typique de l'ADN d'aucun groupe taxonomique de virus végétal. L'utilisation de cet ADN pour le diagnostic du dépérissement foliaire et la possibilité qu'il indique une étiologie virale sont discutés.

INTRODUCTION

Le dépérissement foliaire (DF), qui atteint les variétés de cocotier introduites au Vanuatu, est une maladie transmise par l'Homoptera Cixiidae, *Myndus taffini* Bonfils [2, 7, 8], qui pique les feuilles pour se nourrir. Elle est aussi connue sous les noms de « Maladie des Nouvelles Hébrides » [2] et « Dépérissement foliaire par *Myndus taffini* (DFMT) » [8]. A présent, et en raison de ses effets sur le programme régional de sélection au Vanuatu, cette maladie joue un rôle économique important.

On observe, sur les cultivars introduits atteints et sur leurs hybrides, toute une gamme de symptômes plus ou moins graves, alors que sur le cocotier local, le « Grand Vanuatu », et sur les hybrides de celui-ci, on n'observe, respectivement, aucun symptôme ou très peu de symptômes [1, 8]. Le Nain Rouge Malaisie (NRM), toujours très sensible au DF (MT) au champ (Fig. 1), sert ainsi de témoin dans les études épidémiologiques et dans les recherches sur la transmission par insectes. Au champ, le premier symptôme est un jaunissement sur plusieurs folioles des feuilles de la couronne (rangs 7 à 11, en partant de la flèche non ouverte). Sur ces feuilles, il s'ensuit un jaunissement plus généralisé qui se transforme, sur les pétioles, en nécrose latérale; ces feuilles meurent prématurément, retombant au niveau du pétiole à travers la voûte de feuillage. D'autres feuilles jaunissent et meurent au fur et à mesure qu'elles atteignent la position 7 à 11 dans la couronne. Ainsi, les arbres atteints se caractérisent par un apex normal, plusieurs palmes jaunâtres, et plusieurs jeunes palmes mortes retombant à travers les palmes vertes plus âgées. Le stipe devient généralement plus étroit, mais peut s'épaissir de nouveau s'il y a une rémission, comme



FIG. 1. — Symptômes typiques d'une manifestation du dépérissement foliaire au champ. Les quatre premiers arbres de la ligne sont des Nains Rouges Malaisie, très sensibles à la maladie, alors que ceux qui sont derrière sont des Grands Vanuatu, résistants. L'arbre au 1^{er} plan montre des symptômes typiques : une petite couronne et des vieilles palmes mortes retombantes. Les arbres morts ont probablement été atteints antérieurement. L'écran d'arbustes au fond est constitué de *Hibiscus tiliaceus* (buraou), qui est la plante hôte de *Myndus taffini*, vecteur du dépérissement foliaire.

(1) L'original de cet article a paru en langue anglaise dans *Phytopathology*, 1986, 76, N° 9, p. 889-894.

(2) Department Plant Pathology, Waite Agricultural Research Institute, University of Adelaide, Glen Osmond, South Australia 5064 (Australie).

(3) IRHO-CIRAD, Station de Saraoutou, B.P. 89, Santo (Vanuatu).

(4) IRHO-CIRAD, B.P. 5035, 34032 Montpellier Cedex (France)

dans le cas d'un arbre tolérant. Les cultivars sensibles meurent entre 1 et 2 ans après l'apparition des symptômes. Les spathes à la base des feuilles jaunes pourrissent si la feuille soustendante meurt, ou elles produisent une inflorescence qui se développe normalement mais qui donne moins de noix que d'habitude.

Les jeunes plants qui, à titre d'essai, sont inoculés dans les cages d'isolement avec *M. taffini* récolté au champ, présentent des symptômes similaires sur les feuilles de rangs 3 à 5, de 6 à 11 mois après inoculation (Fig. 2, 3). La retombée des feuilles jaunes semble coïncider avec une certaine nécrose latérale à la base du pétiole.

Ni champignon, ni bactérie ou nématode n'ont été identifiés comme agent pathogène et les applications de tétracycline, aux doses utilisées pour lutter contre le jaunissement mortel du cocotier, n'ont eu aucun effet sur la progression de la maladie [8]. L'utilisation du microscope électronique n'a jamais réussi à déceler aucun microorganisme ou virus à l'intérieur du tissu atteint, et toute tentative entreprise dans le but de détecter le viroïde du Cadang-cadang du cocotier, soit par l'analyse électrophorétique sur gel, soit par l'hybridation moléculaire des extraits d'acides nucléiques, a toujours été sans résultat [11, 13 ; Randles et Dollet, *non publié*].

La corrélation entre la répartition des arbres malades et *M. taffini* dans les plantations, ainsi que la démonstration que le DF (MT) est, effectivement, transmis par les adultes de *M. taffini* [8], suggèrent que la maladie est due à un agent transmissible. Il semble peu probable qu'une toxine d'insecte soit impliquée puisque des petits groupes de *M. taffini* peuvent transmettre le dépérissement foliaire au cours d'une brève période d'inoculation au moment où l'insecte se nourrit.

Cet article décrit les tentatives faites en vue d'impliquer un agent pathogène en analysant des extraits de cocotier, afin de trouver des composants spécifiques à la maladie, ainsi que l'association d'un ADN simple brin inhabituel avec des jeunes plants inoculés et discute la possibilité que le dépérissement foliaire soit d'une étiologie virale.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Source de matériel contaminé.

Les jeunes plants NRM de 2 à 3 feuilles ont été inoculés dans une cage d'isolement en introduisant des adultes de *M. taffini* récoltés au champ, sur les jeunes pousses [8]. Des jeunes plants NRM contaminés dans les conditions naturelles ont également été utilisés. Du tissu foliaire jaunissant a été récolté 6 à 8 mois plus tard sur les feuilles 2, 3 et 4 des arbres malades. Du tissu témoin a été récolté sur des jeunes plants non inoculés, plantés dans la même pépinière à Saraoutou (Espiritu Santo, Vanuatu), ou sur des jeunes plants sains élevés en serre au Waite Institute.

Les nervures médianes ont été enlevées et les folioles, envoyées à Adelaïde par avion, ont été stérilisées en surface avec de l'hypochlorite de sodium (1 % chlore disponible), de l'éthanol et de l'eau distillée à un rapport de 1 : 2 : 2, puis rincées, égouttées et extraites immédiatement ou stockées à -20°C .

Méthodes d'extraction.

Les folioles ont été coupées avec des ciseaux, placées dans un mixer et mélangées avec une solution tampon à raison de 20 g par 120 ml de solution tampon. Plusieurs méthodes ont été utilisées alternativement.



FIG. 2. — Un jeune plant de la variété Nain Rouge Malaisie dans une cage d'isolement, contaminé par *Myndus taffini* récolté à partir de cocotiers malades au champ. La palme n° 3 (indiquée par une flèche) présente un jaunissement accompagné de taches brun clair.

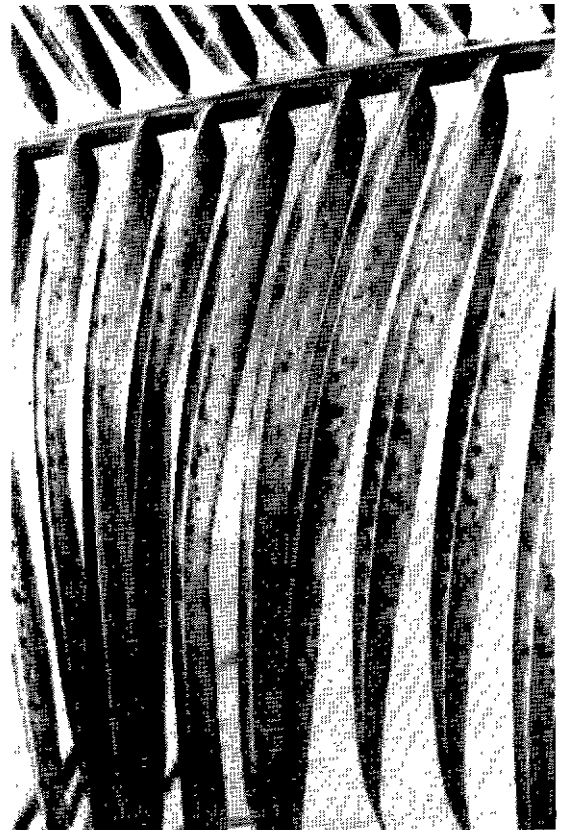


FIG. 3. — Gros plan des symptômes trouvés sur la palme n° 3 du jeune plant de la figure 2.

Méthode A :

La solution tampon était constituée de 0,1 M de citrate de sodium, pH 4,7, contenant 10 mM d'EDTA, 1 % de monothioglycérol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) et 0,5 % de cellulase (Sigma). L'extrait a été mis en incubation à 30 °C pendant 4 heures, le pH étant réajusté à 7,0 en ajoutant 0,5 M de Na₂HPO₄, et l'incubation a été poursuivie à 4 °C pendant 16 heures. L'extrait a été homogénéisé encore une fois et filtré au travers d'une mousseline. On a ensuite ajouté du polyéthylène glycol 6 000 jusqu'à 8 % (PEG, British Drug House, poids moléculaire moyen entre 6 000 et 7 500). Le précipité qui en résulte a été récupéré à l'aide d'une centrifugation à 10 000 g pendant 10 min., puis centrifugé à nouveau à 200 000 g pendant 70 min. Les culots ont été remis en suspension dans une solution tampon, clarifiés comme ci-dessus et centrifugés à 200 000 g pendant 90 min. sur un coussin de saccharose à 20 %. Le culot final a été remis en suspension dans 0,1 ml d'une solution tampon de 10 mM de phosphate et clarifié comme ci-dessus. Les acides nucléiques ont été extraits à partir de la phase surnageante par une incubation de 16 heures à 37 °C avec 0,5 ml de protéase à 0,1 %, provenant de *Streptomyces griseus*, 0,1 M d'acétate de sodium et 0,5 % dodécyl sulfate de sodium (SSD). Ceci a été extrait en présence de 0,5 ml d'un mélange aqueux de phénol-crésol (9 : 1), et des acides nucléiques ont été précipités à partir de la phase surnageante avec trois volumes d'éthanol. Les culots ont été remis en suspension dans 50 % de glycérol contenant du xylène cyanole et le tampon d'électrophorèse.

Méthode B :

Du tissu foliaire a été mixé avec 0,1 M de tampon phosphate, pH 7,0, contenant 10 mM d'EDTA et 1 % de monothioglycérol. L'extrait a été filtré au travers d'une mousseline et le filtrat agité en présence de 2 % de Triton X-100 pendant 1 heure à 4 °C. Ce filtrat a été clarifié par une centrifugation à 10 000 g pendant 10 min. Du PEG a été ajouté jusqu'à 8 % et le précipité récupéré à l'aide d'une centrifugation à faible vitesse, comme ci-dessus. Le culot a été remis en suspension dans du tampon phosphate 10 mM, pH 7,6, pendant 2 heures, clarifié par une centrifugation à faible vitesse, puis centrifugé à 200 000 g pendant 70 min. Le culot a été encore remis en suspension dans 1 ml de SDS à 2 %, mélangé avec un volume équivalent de phénol 90 % et agité pendant 45 min. à 20 °C. Après centrifugation, la phase aqueuse a été extraite de nouveau avec un volume équivalent d'un mélange de phénol-chloroforme (1 : 1). Les acides nucléiques ont été récupérés par une précipitation à l'éthanol.

Méthode C :

Du tissu foliaire a été extrait en suivant la méthode B, mais il a été clarifié en le mélangeant avec 2 % de Triton X-100 pendant 15 min. à 4 °C ; ensuite on a ajouté 2 g de bentonite et l'ensemble a été homogénéisé encore pendant 2 min. Le mélange a été centrifugé à 10 000 g pendant 10 min. On a ajouté du PEG à la phase surnageante jusqu'à une concentration de 8 % et le précipité a été récupéré après 90 min. de centrifugation à faible vitesse. Des acides nucléiques ont été extraits selon la méthode B.

Méthode D :

Les extractions ont été réalisées en suivant la méthode C, mais le premier précipité PEG a été remis en suspension

dans 20 ml de tampon phosphate 10 mM, pH 7,6, en l'agitant pendant 1 à 2 heures, puis clarifié à l'aide d'une centrifugation à faible vitesse. Un deuxième précipité PEG à 8 % a été obtenu à partir de la phase surnageante comme ci-dessus et ce culot a été remis en suspension dans le volume minimal de tampon phosphate 10 mM stérile, pH 7,6. Une aliquote de ceci a été mélangée avec un volume équivalent d'un mélange de protéase (2 mg/ml), de 0,5 % de SDS, d'acétate de sodium 0,1 M et de 10 % de glycérol, puis mise en incubation, soit à 37 °C pendant 1 à 2 heures, soit à 25 °C pendant 16 heures, mélangée avec des traces d'un colorant marqueur, puis soumise directement à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Méthodes de centrifugation.

Les gradients de densité linéaires, de 10-40 % de saccharose, dans un tampon phosphate 10 mM, pH 7,6, sont centrifugés dans un rotor SW65 Spinco à 60 000 tours/min. pendant 2 heures à 5 °C. Les marqueurs de vitesse de sédimentation étaient le virus de la mosaïque du tabac (115 S) [12], la protéine fraction 1 (18 S) et des ribosomes 80 S préparés par l'extraction de jeunes feuilles de *Nicotiana clevelandii* Gray dans un volume (p/v) seulement de tampon phosphate 10 mM. Les gradients ont été fractionnés à l'aide d'un appareil ISCO.

Les gradients de densité isopycniques de Nycodenz [4] ont été préparés en disposant en couches des volumes équivalents de Nycodenz à 30, 40, 50 et 60 % (p/v) dans un tampon phosphate, placé dans des tubes de centrifugation « ultraclear » de 5 ml (Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA). Des échantillons de 100 à 400 µl ont été déposés puis centrifugés à 35 000 t/min. pendant 16 heures à 5 °C dans un rotor Spinco SW 50,1, cette opération étant suivie d'une décélération lente. Les bandes observées avec la diffusion de lumière ont été récupérées soit goutte à goutte par une perforation du fond, soit par aspiration par le haut à l'aide d'une pipette en verre ou d'une seringue et d'une aiguille. Les gradients Cs₂SO₄ ont été préparés en disposant en couches 1,7 ml de Cs₂SO₄ à 30 % et 1,7 ml de Cs₂SO₄ à 50 % dans du tampon phosphate 10 mM, utilisant 0,2 à 0,3 ml de l'échantillon et procédant à une centrifugation comme ci-dessus.

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide.

On a utilisé des gels en plaques de 1,5 mm d'épaisseur et de 10 cm de long, composés de polyacrylamide à 3,3 % ou à 5 % et d'urée 8 M, tamponnés à pH 8,3 avec du tris 90 mM, de l'acide borique 90 mM et d'EDTA 3 mM. Ces gels ont été placés dans un appareil Biorad 220 pour fractionner les acides nucléiques. Les ADN marqueurs étaient des fragments d'ADN bactériophage digérés par l'enzyme de restriction Hind III (New England Biolabs), soit des fragments EcoRI de l'ADN SPP 1 (provenant de A. Rezaian) chauffés à 100 °C pendant 3 min. avec ou sans 50 % de formamide déionisé. On a fait passer un courant constant de 18 mA pendant 16 heures à travers les gels à 5 %, et un courant de 30 mA pendant 3 heures à travers les gels à 3,3 %. La coloration à l'argent suivait la méthode de Sammons *et al.* [14] avec, cependant, quelques modifications : un lavage d'une heure dans une solution de 10 % d'éthanol et de 0,5 % d'acide acétique, renouvelée deux fois, une coloration d'une heure dans 0,2 % d'Ag NO₃, 2 lavages de courte durée dans de l'eau distillée dégazéifiée et un développement dans une solution de NaOH 0,375 N, 2 mM de borohydrure de sodium et de 0,15 % de

formaldéhyde. Les gels ont été mis dans du Na_2CO_3 70 mM pendant une heure, puis stockés dans de l'acide acétique à 1 %.

Identification des acides nucléiques.

La sensibilité à l'alcali a été testée par l'incubation de préparations d'acides nucléiques avec du KOH 0,3 N à 37 °C pendant une heure avec une neutralisation par HCl 1 N et une précipitation à l'éthanol avant analyse.

La sensibilité à la ribonucléase A a été testée par l'incubation avec de la RNase A bouillie, suivie de l'adjonction de phénol jusqu'à 18 % pour arrêter la réaction. La sensibilité à la déoxyribonucléase I a été testée par incubation avec 100 µg de l'enzyme DNEP (SIGMA) par millilitre de 100 mM Tris-Cl, pH 7,4, et 100 mM MgCl_2 , en terminant comme pour la ribonucléase. Egalement, 20 µg d'enzyme par millilitre de Tris-Cl 10 mM et MgCl_2 10 mM ont été utilisés à 37 °C pendant 60 min. avant la précipitation à l'éthanol de l'acide ribonucléique résiduel. L'aspect simple brin a été testé par l'incubation de préparations avec la nucléase S_1 (SIGMA) à raison de 100 unités/ml avec une solution tampon contenant, par millilitre, de l'acétate de sodium 30 mM, pH 4,6, du ZnSO_4 3 mM, 40 µg d'ADN de thymus de veau dénaturé et du NaCl 50 mM ou 300 mM. L'incubation a eu lieu à 37 °C pendant 10 min. De l'ADN double brin a été chauffé à 100 °C pendant 5 min. puis utilisé comme test d'activité enzymatique.

RÉSULTATS

Détection de l'ADN lié à la maladie.

La méthode A était semblable à celle retenue pour la purification d'un lutéovirus [6] et a été employée pour assurer l'extraction complète du tissu. Dans le cas des méthodes B, C et D, le temps nécessaire pour les réaliser était beaucoup moins important et, pour les méthodes C et D, une journée était suffisante.

Chacune des quatre méthodes d'extraction donnait une bande d'acide nucléique à poids moléculaire élevé liée à la maladie (ADN-DF (MT), Tabl. I, Fig. 4). La bande ADN-DF (MT) à poids moléculaire élevé était présente en con-



FIG. 4. — Association spécifique d'une seule bande (DF (MT)-ADN) avec des extraits d'acide nucléique obtenus à partir de cocotiers malades (D) mais pas avec des extraits obtenus à partir de plantes saines (H). L'électrophorèse a été effectuée sur un gel de polyacrylamide 5 % contenant de l'urée 8 M.

centration très faible, n'étant détectable que par la coloration à l'argent et non pas au bromure d'éthidium ni au bleu de toluidine O. Elle était facilement identifiée, étant la bande supérieure dans les conditions d'électrophorèse employées.

Plusieurs variations de la méthode d'extraction ont été testées. La coloration de fond foncée des gels a été considérablement réduite par l'incorporation de bentonite dans

TABLEAU I. — Association de l'ADN à poids moléculaire élevé avec le dépérissement foliaire

Type de maladie	Lieu	Méthode d'extraction (1)	Nombre de palmiers	
			Testés	avec ADN
Asymptomatique	Waite Institute	A	5	0
	Vanuatu	A	4	0
	Vanuatu	B	3	0
	Vanuatu	C	2	0
	Vanuatu	D	2	0
	Total		16	0
Symptomatique inoculée	Vanuatu	A	29	28
	Vanuatu	B	12	12
	Vanuatu	C	10	10
Non inoculée	Vanuatu	B	1	1
	Vanuatu	D	2	2
	Total		54	53

(1) (Voir « Matériel et Méthodes »).

l'extrait au moment de la clarification, ce qui a beaucoup facilité la détection de l'ADN-DF (MT). Il était possible d'interchanger le thioglycérol et le 1 % de 2-mercaptoéthanol dans le tampon d'extraction, afin d'éviter le brunissement de l'extrait de feuille de cocotier mais, même sans les agents réducteurs et malgré le brunissement des extraits qui en résultait, l'ADN-DF (MT) était détectable si la clarification était réalisée à la bentonite. Le charbon activé (5 %), la poudre de cellulose-DEAE (1 %) et la poudre de célite (10 %), mélangés avec les extraits, puis éliminés par centrifugation, permettaient aussi un certain niveau de clarification, bien que moins efficaces que la bentonite. Les solvants organiques, 1-butanol (8,5 % pendant 10 min. à 4 °C) et chloroforme (0,5 vol. émulsionnés pendant 5 min. à 4 °C), donnaient des rendements moins importants que le Triton X-100 (2 %), sans aucune amélioration de la clarification. Les traitements au phénol, à la protéase et à l'alcali (0,3 N NaOH à 37 °C pendant 2 heures, neutralisation à l'HCl) étaient tous efficaces pour l'extraction d'ADN-DF(MT) à partir des culots finaux.

La bande a été obtenue à partir d'extraits de tissu foliaire frais ou congelé. L'ADN-DF (MT) a été isolé à partir d'échantillons d'un poids de 2, 5, 10 ou 20 g, après avoir été mélangés dans 120 ml de solution tampon, suivant la méthode D. L'ADN a été isolé également à partir d'échantillons stockés à 4 °C pendant 4, 9 et 12 jours avant l'extraction, suivant la méthode B ; cependant, la coloration à l'argent de fond dans le gel était plus foncée

dans le cas des échantillons stockés pendant 9 et 12 jours, ce qui rendait plus difficile la détection de l'ADN.

Les propriétés de l'ADN-DF (MT).

L'insensibilité de la bande ADN-DF (MT) à la RNase et à l'alcali, ainsi que sa sensibilité à la DNase I (Fig. 5 et 6) confirment son identité d'ADN.

Le chauffage des préparations à 100 °C, avec ou sans adjonction de 50 % de formamide, n'a eu aucun effet sur la mobilité électrophorétique de l'ADN-DF (MT) (Fig. 7), conformément à ce que l'on attend dans le cas d'un ADN simple brin.

Des fragments d'ADN marqueurs, obtenus à partir de bactériophages SPP 1 et λ ont été mélangés avec l'ADN simple brin pendant ces traitements et leur migration était plus lente que celle de l'ADN double brin. L'aspect simple brin de l'ADN-DF (MT) a été confirmé par un traitement à la nucléase S₁. L'enzyme a éliminé l'ADN-DFMT après incubation dans du NaCl 50 mM et 300 mM. Des fragments de restriction d'ADN double brin du phage λ n'étaient pas affectés par les conditions utilisées, tandis que les fragments simple brin obtenus en chauffant le marqueur à 100 °C pendant 5 min. étaient sensibles à l'enzyme.

La migration de l'ADN-DF (MT) était plus lente que celle du fragment 23,13 Kb d'ADN du phage λ dans le gel à 5 % mais, dans les gels à 3,3 %, sa migration était à la vitesse considérée normale pour les fragments de λ entre 6,56 et 9,42 Kb de long. Des bandes doubles ou triples ont

FIG. 5. — Résistance alcaline (KOH) et sensibilité à la déoxyribonucléase (DNase) du DF (MT)-ADN comparée à celle d'un échantillon non traité (U). L'électrophorèse a été effectuée sur un gel de polyacrylamide 5 % contenant de l'urée 8 M.

FIG. 6. — Insensibilité du débris foliaire à la ribonucléase A (RNase) à 2 et à 10 µg/ml, mise en incubation à 20 °C pendant 40 min., par rapport à un échantillon non traité (U) et à un échantillon mis en incubation sans enzyme (0). La bande est identifiée par sa sensibilité à la DNase I (100 µg/m). L'électrophorèse a eu lieu sur un gel de polyacrylamide à 5 % contenant de l'urée 8 M.

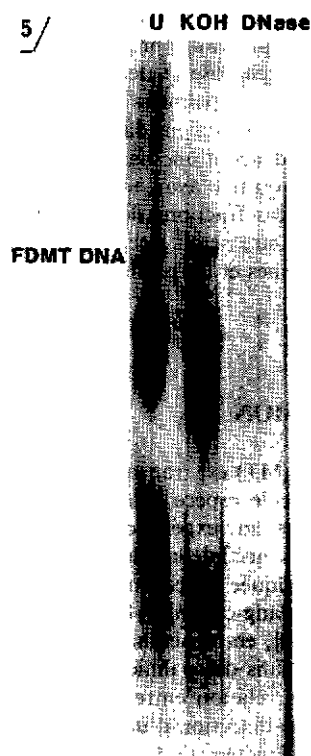
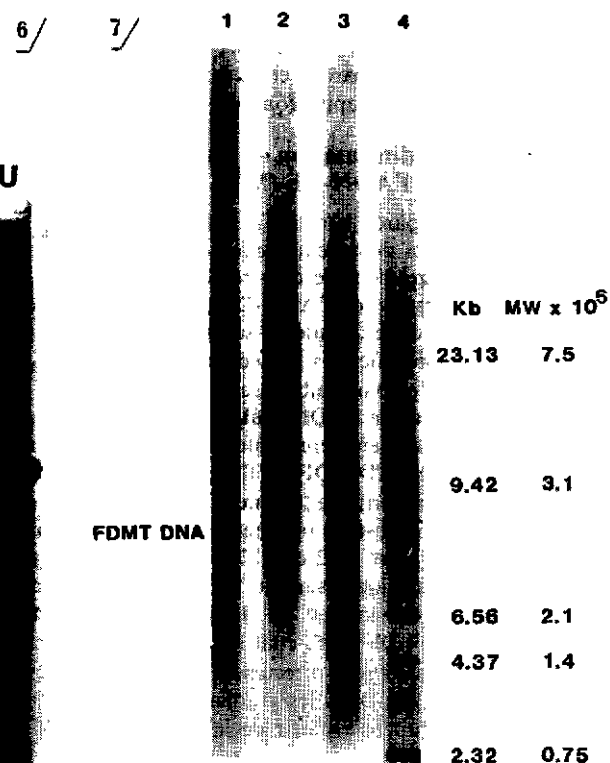


FIG. 7. — Migration électrophorétique de l'ADN du débris foliaire non traité (bande 1), chauffé (100 °C pendant 5 min, bande 2) et complètement dénaturé (dans du formamide à 50 %, 100 °C, 5 min, bande 3) par rapport à celle d'un ADN simple brin marqueur, préparé en portant à ébullition des fragments de restriction Hind III de l'ADN phage λ. La longueur (Kb) et le poids moléculaire de l'ADN marqueur ont été vérifiés par co-électrophorèse en utilisant des fragments simple brin de l'ADN phage SPP 1 digéré par Eco RI. L'analyse a eu lieu sur un gel de polyacrylamide à 3,3 % contenant de l'urée 8 M.



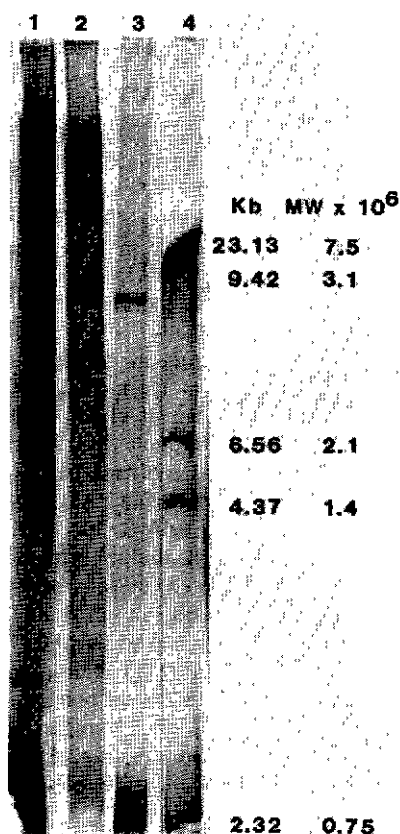


FIG. 8. — Analyse d'un extrait (méthode B) obtenu à partir d'un palmier sain (bande 1), de l'ADN du dépérissement foliaire obtenu à partir de la fraction d'une densité de 1,26 g/ml d'un gradient isopycnique de Nycodenz (bande 2), et de l'ADN du dépérissement foliaire traité à la RNase à 2 µg/ml pendant 15 min à 37 °C (bande 3). La longueur (Kb) et le poids moléculaire de l'ADN marqueur ont été vérifiés par co-électrophorèse utilisant des fragments simple brin de l'ADN phage SPP 1 digéré par Eco R1 (bande 4). L'analyse a eu lieu sur un gel de polyacrylamide à 3,3 % contenant de l'urée 8 M.

quelquefois été observées à la position ADN-DF (MT) dans les gels à 3,3 %. Une valeur de 8,7 Kb a été estimée, basée sur deux essais (Fig. 7 et 8) mais la dépendance entre le poids moléculaire apparent et la concentration du gel nécessite une étude plus approfondie.

Coefficient de sédimentation et densité du composant contenant l'ADN-DF (MT).

Des extraits préparés suivant la méthode B jusqu'au stade qui précède la déprotéinisation ont été analysés par centrifugation en gradient de densité isopycnique.

Dans plusieurs essais, de l'ADN-DF (MT) a été récupéré à partir de gradients de densité de saccharose dans la zone qui représente les coefficients de sédimentation entre 16 et 75 S. Les valeurs les plus faibles se rapprochent de celles attendues dans le cas de l'ADN seul, tandis que les valeurs les plus élevées pourraient représenter un composant particulier contenant de l'ADN-DF (MT). Le matériel récupéré par sédimentation à partir de la zone 30-80 S d'un gradient de densité de saccharose avait une densité de flottation, dans le Nycodenz, entre 1,22 et 1,27 g/ml, déterminée par analyse électrophorétique sur gel des fragments pour l'ADN-DF (MT). La gamme de densités du composant contenant de l'ADN-DF (MT) était la même quand les préparations ont été analysées directement dans les gradients de Nycodenz (Fig. 9). Dans les gradients Cs₂SO₄, l'ADN-DF (MT) a été récupéré à partir de la zone de densité de 1,36 g/ml environ.

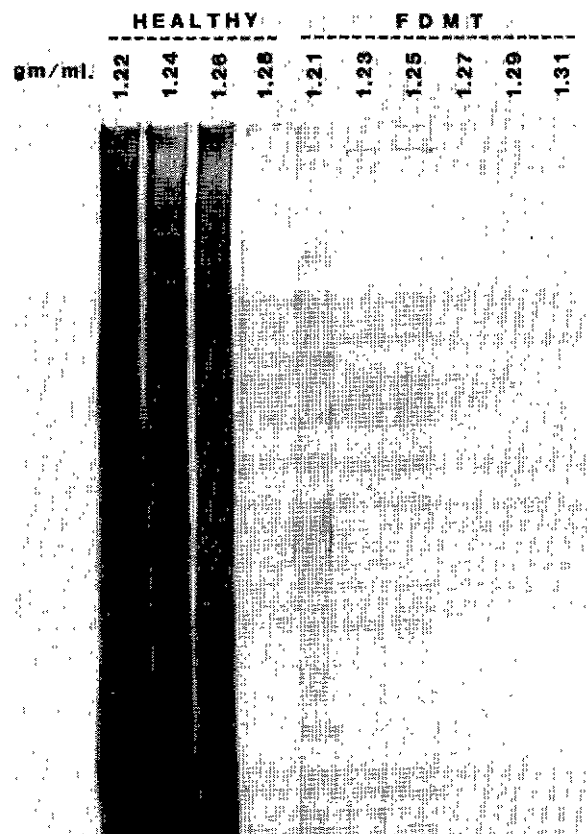


FIG. 9. — Distribution du composant contenant l'ADN du dépérissement foliaire dans un gradient de densité Nycodenz isopycnique. On a effectué une extraction selon la méthode B sur un palmier sain et un palmier atteint par la maladie, jusqu'au stade qui précède la déprotéinisation au dodécyl sulfate de sodium-phénol, puis une centrifugation ; les fractions ont été ensuite analysées par électrophorèse, comme pour la figure 4. L'ADN du dépérissement foliaire est associé à un composant ayant une densité de 1,21-1,25 g/ml.

Des particules sphériques d'un diamètre de 20 nm environ ont quelquefois été observées dans ces fractions. Pourtant, l'analyse électrophorétique sur gel des protéines obtenues à partir des fractions de saccharose et de Nycodenz, et provenant de palmiers sains et de palmiers malades, a montré que de nombreuses bandes existaient dans les deux cas et qu'il n'y avait aucune évidence d'une bande spécifique à la maladie. On a conclu qu'il y avait toujours des protéines végétales saines dans ces fractions de densité et qu'une purification complémentaire serait nécessaire afin de pouvoir caractériser les protéines et les particules liées à l'ADN-DF (MT).

DISCUSSION

La démonstration que le DF (MT) est transmis aux jeunes plants du NRM par une seule espèce d'insecte [7] a permis de mettre au point un système expérimental en vue de vérifier si un virus est l'agent causal de la maladie. Nous avons retenu une méthode appliquée précédemment pour déterminer l'agent causal du Cadang-cadang [11] et du jaunissement mortel du cocotier [10], en recherchant un composant spécifique à la maladie dans des palmiers malades.

Nous avons démontré une corrélation entre la présence des symptômes de DF (MT) et la détection d'un ADN simple brin inhabituel. Cet ADN a été détecté dans des jeunes

plants du NRM contaminés naturellement et expérimentalement. Bien que d'autres bandes d'acides nucléiques inhabituelles aient été également trouvées dans le cas de certains cocotiers, leur isolation peu systématique laisse penser qu'elles sont, soit des artefacts de la méthode d'extraction, soit représentatives de microorganismes qui ne sont pas liés spécifiquement à la maladie.

La détection de l'ADN en employant la méthode d'extraction A et les premières indications de son association avec le DF (MT) ont mené à une simplification de la méthode de détection, permettant l'analyse d'un plus grand nombre d'échantillons. Ces données ont confirmé à nouveau l'association entre l'ADN et le DF (MT) et ont montré qu'il était possible de l'utiliser comme un marqueur de diagnostic de la maladie, au moins dans le cas du NRM. L'ADN a été isolé en très petites quantités et sa détection dans les gels n'était possible que par la coloration à l'argent. Il semblerait donc que le diagnostic repose sur des méthodes de détection de l'ADN très sensibles, basées soit sur l'électrophorèse sur gel, telle que décrite ici, soit sur l'hybridation moléculaire.

Le composant auquel l'ADN est associé a une valeur S maximale dans les gradients de densité de saccharose qui se rapproche de celle attendue dans le cas des membres du groupe des geminivirus [9]. Des petites sphères simples, mais non pas doubles, d'un diamètre de 20 nm environ, ont parfois été détectées dans les extraits et leur association avec le DF (MT) fera l'objet d'études complémentaires. La densité de flottation, dans le Nycodenz, du composant contenant l'ADN-DF (MT) se trouve dans la gamme attendue d'une nucléoprotéine virale [4]. Dans le Cs_2SO_4 , sa densité est plus élevée que celle des ARN contenant des bromovirus, des cucumovirus et Alfalfa Mosaic virus, alors qu'elle se rapproche de celle déterminée pour le Pea Ena-

tion Mosaic virus [5], et est moins élevée que celle de l'ADN pur. Ces observations laissent supposer que l'ADN-DF (MT) est associé à d'autres composants et qu'il existe dans une particule spécifique. L'impossibilité rencontrée d'associer systématiquement une particule ou une protéine spécifique aux fractions riches en ADN-DF (MT), suggère qu'une telle particule peut être, soit instable dans les conditions de transport, de stockage ou d'extraction, soit d'une morphologie inhabituelle.

Les propriétés de l'ADN-DF (MT) établies jusqu'à présent ne correspondent à aucun groupe taxonomique de virus de plante connu [9]. Les geminivirus ont un ADN circulaire simple brin dans la plage de poids moléculaire entre $0,7$ et $0,9 \times 10^6$, plus faible que celui estimé pour l'ADN-DF (MT).

Pour conclure, la détection de l'ADN spécifique à la maladie indique qu'un virus est probablement l'agent causal du DF (MT). Elle sera tout de suite utile comme marqueur de diagnostic du DF (MT) chez le cocotier et devrait être utile également dans la recherche d'une particule. La fabrication de clones de fragments d'ADN devrait permettre de tester l'unicité de l'ADN-DFMT et rendre possible la mise au point d'un test basé sur l'hybridation moléculaire. Un tel essai semblerait indispensable pour déterminer l'épidémiologie et la gamme de hôtes du DF (MT), permettant donc une évaluation des risques que présente cette maladie pour l'amélioration du cocotier dans le Pacifique.

Remerciements. — Ces recherches ont été entreprises grâce à une subvention de l'Australian Centre for International Agricultural Research que nous remercions, ainsi que L.D. McCallum et D.C. Miller pour leur assistance technique.

REFERENCES

- [1] CALVEZ C., RENARD J. L., MARTY G. (1980). — Tolerance of the hybrid coconut Local \times Rennell to New Hebrides disease (bilingue fr.-angl.). *Oléagineux*, 35, N° 10, p. 443-451
- [2] DOLLET M., TAFFIN G. de (1979). — Progress report on the virological study of the New Hebrides coconut disease. *Document IRHO* N° 1437, Paris.
- [3] FRANCKI R.I.B (1972). — Purification of viruses. Pages 295-335. In *Principles and Techniques in Plant Virology*. C. I. Kado and H. O. Agrawal, eds Van Nostrand Reinhold, New York.
- [4] GUGERLI P (1984). — Isopycnic centrifugation of plant viruses in Nycodenz density gradients. *J. Virol. Meth*, 9, p. 249-258
- [5] HULL R (1976). — The behaviour of salt labile plant viruses in gradients of cesium sulphate. *Virology*, 75, p. 18-25
- [6] JAYASENA K W., RANGLES J W., BARNETT O. W. (1983). — Synthesis of a complementary DNA probe specific for detecting subterranean clover red leaf virus in plants and aphids. *J. Gen. Virol.*, 65, p. 109-117
- [7] JULIA J F. (1982). — *Myndus taffini* (Homoptera Cixiidae), vector of foliar decay of coconuts in Vanuatu (bilingue fr.-angl.). *Oléagineux*, 37, N° 8-9, p. 409-414.
- [8] JULIA J. F., DOLLET M., RANGLES J. and CALVEZ C. (1985). — Foliar decay of coconut by *Myndus taffini* (FDMT). New results (bilingue fr.-angl.) *Oléagineux*, 40, N° 1, p. 19-27.
- [9] MATTHEWS R E F. (1984). — *Classification and nomenclature of viruses*. Fourth Rep. Int. Committee on Taxonomy of Viruses, Karger, Basel. 199 p
- [10] MCCOY R. E., HOWARD F W., TSAI J *et al.* (1983). — Lethal yellowing of palms. *Fla. Agric. Exp. Sta. Bull.* 834, R E. MCCOY, ed. Gainesville, 100 p
- [11] RANGLES J W (1975). — Associations of two ribonucleic acid species with Cadang-cadang disease of coconut palm. *Phytopathology*, 65, p. 163-167.
- [12] RANGLES J. W., DAVIES C., HATTA T., GOULD A. R. and FRANCKI R. I. B. (1981). — Studies on encapsidated viroid-like RNA. I. — Characterization of velvet tobacco mottle virus. *Virology*, 108, p. 111-122.
- [13] RANGLES J. W., PALUKAITIS P (1979). — *In vitro* synthesis and characterization of DNA complementary to Cadang-cadang associated RNA. *J. Gen. Virol.*, 43, p. 649-662.
- [14] SAMMONS P. W., ADAMS L. D. and NISHIZAWA E. E. (1981). — Ultrasensitive silver-based colour staining of polypeptides in polyacrylamide gel. *Electrophoresis*, 2, p. 135-141.

SUMMARY

Association of single-stranded DNA with the foliar decay disease of coconut palm in Vanuatu.

J. W. RANGLES, J.-F. JULIA, C. CALVEZ and M. DOLLET, *Oléagineux*, 1987, 42, N° 1, p. 11-18.

Foliar decay disease induced by feeding of the cixid plant hopper, *Myndus taffini*, is a disease of unknown etiology that develops in coconut palms in Vanuatu. Extraction of diseased leaf tissue with or without a cellulase digestion treatment, followed by a precipitation step with 8 p. 100 polyethylene glycol 6 000, and high-speed centrifugation, yielded a sedimentable component containing a single-stranded DNA. This component has an estimated sedimentation coefficient of less than 75 S and buoyant densities in Nycodenz and Cs_2SO_4 of 1.21-1.25 g/ml and about 1.36 g/ml, respectively, but no virus-like particles were specifically associated with this component. An assay for the DNA, based on polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining, showed that it was disease specific. It has an estimated mol wt between 2 and 3×10^6 in 3.3 p. 100 polyacrylamide gels and therefore appears not to be typical of DNA from any plant virus taxonomic group. The use of this DNA for the diagnosis of foliar decay disease and the possibility that it indicates a virus etiology is discussed.

RESUMEN

Asociación de ADN de un solo paso con el marchitamiento foliar del cocotero en Vanuatu.

J. W. RANGLES, J.-F. JULIA, C. CALVEZ y M. DOLLET, *Oléagineux*, 1987, 42, N° 1, p. 11-18.

El marchitamiento foliar, transmitido por el homóptero Cixiidae, *Myndus taffini*, que pica las hojas para alimentarse, es una enfermedad de etiología desconocida que se desarrolla en el cocotero en Vanuatu. La extracción a partir de tejido foliar afectado por la enfermedad, con tratamiento de digestión por la celulasa o sin él, seguida de una precipitación con un 8 p. 100 de polietileno glicol 6 000, y también de una centrifugación de mucha velocidad, dió un compuesto capaz de sedimentarse que contiene un ADN de un solo paso. Este compuesto posee un coeficiente de sedimentación evaluado en menos de 75 S, como también densidades de flotación en Nycodenz y en Cs_2SO_4 de 1,21-1,25 g/ml respectivamente, y poco más o menos 1,36 g/ml, pero no se encontró específicamente asociada con este componente ninguna partícula con aspecto de virus. Una prueba para el ADN, basada en la electrofóresis sobre gel de poliacrilamida y en la coloración con plata, mostró que este ADN era específico de la enfermedad. Encontrándose su peso molecular estimado comprendido entre 2 y 3×10^6 con gel de poliacrilamida de un 3,3 p. 100, no parece ser típico del ADN de ningún grupo taxonómico de virus vegetal. La utilización de este ADN para el diagnóstico del marchitamiento foliar y la posibilidad de que indique una etiología viral son objeto de discusión.



Librairie Générale - Papeterie E. POCELLO & C^{ie}

avenue Chardy — rue Lecœur — 01 B.P. 1757 — **ABIDJAN 01** — Tél. 33.15.65 - 33.26.93

Littérature — Romans
Ouvrages scolaires et
techniques

Maroquinerie — Articles
de bureau — Fournitures
scolaires

Filiales à **BOUAKÉ** (Pl. de la Poste - Tél. 63.34.88), **TREICHVILLE** (Av. 16 - Tél. 32.20.33), **SAN PEDRO**