

# Mise en évidence d'un virus de granulose chez *Sesamia cretica* Led. (Lepidoptera Noctuidae), principal ravageur du maïs d'Afrique du Nord-Est : caractérisation de l'ADN génomique et diagnostic viral

GILLES FEDIERE <sup>(1)</sup>, AHMED TAHA <sup>(1)</sup>, SAÏD ABOL ELA <sup>(1)</sup>, XAVIER LERY <sup>(1)</sup>,  
JEAN-LOUIS ZEDDAM <sup>(1)</sup>, JEAN-CLAUDE VEYRUNES <sup>(2)</sup>, JOSEPH GIANNOTTI <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Laboratoire d'Entomovirologie, ORSTOM, Faculté d'Agriculture, P.O. box 26, Giza, Le Caire, Égypte.

<sup>(2)</sup> Station de Recherches de Pathologie Comparée INRA-CNRS, 30380 St-Christol-Les-Alès, France.

Reprints : G. Fediere

*A new granulosis virus isolated from Sesamia cretica Led. (Lepidoptera Noctuidae) in North-East Africa : DNA characterization and viral diagnosis*

## RÉSUMÉ

Un virus de granulose a été isolé du foreur de tige de maïs *Sesamia cretica* Led. (Lepidoptera, Noctuidae) en Égypte. L'ADN de ce Baculovirus, dénommé ScGV (*S. cretica* Granulosis Virus), a été caractérisé. La taille du génome a été estimée à 112 kilobases et des profils caractéristiques de restriction enzymatique ont été dressés pour 17 endonucléases. Des méthodes de diagnostic viral, test immunoenzymatique ELISA et sonde nucléique totale, ont été établies et testées en vue d'études épidémiologiques de la maladie. ▲

**Mots clés** : baculovirus, granulose, *Sesamia cretica*, noctuidae.

**Key words** : baculovirus, granulosis virus, *Sesamia cretica*, noctuidae.

## ABRIDGED VERSION

*Sesamia cretica* L. (1857) is the most frequent species among the principal borers of Maize and Sorghum in North-East Africa and especially in Egypt. Only one virus infecting larvae of this pest has been recorded, an entomopathogenic virus belonging to Picornaviridae.

Among diseased larvae collected recently from maize fields, viral particles of Granulosis from Baculovirus group were isolated. This genus of entomoviruses (Granulosis virus-GV) belong to the sub-family Eubaculovirinae. The electron microscopic examination of purified viral suspension revealed the presence of ovoid-shape granules measuring 360-440 × 170-230 nm, while the virions measured 250-350 nm in length and 40-60 nm in width.

Note présentée par Constantin Vago.

Note remise le 14 juin 1993, acceptée après révision le 20 septembre 1993.

## ABSTRACT

*A new Granulosis Virus was isolated from the maize stem borer Sesamia cretica Led. (Lepidoptera Noctuidae) in Egypt. The DNA of this Baculovirus, that we propose to name ScGV, was characterized. The size of the total genome was estimated to be 112 kilobases and restriction patterns have been drawn up for 17 endonucleases. Viral diagnosis methods, immunoenzymatic test ELISA and genomic probe, have been laid down and tried out for epidemiological studies of the disease. ▲*

The purified DNA of ScGV was digested by 17 endonucleases of current use. No restriction sites were observed when the genome was digested with Hpa I, while only one restriction site was detected by Sma I. The digestion of the genome by the endonucleases Cfo I, Hae III, and Hind II gives complex electrophoretic profiles which were not considered for DNA characterization.

However, digestion by the endonucleases Bam HI, Bgl II, Cla I, Eco RI, Eco RV, Hind III, Kpn I, Mlu I, Pst I, Pvu II, Sal I and Xho I revealed different electrophoretic profiles composed of 9, 22, 26, 15, 26, 15, 25, 12, 21, 21, 19 and 21 fragments respectively.

The size of the genome was estimated by adding up the size of all fragments in each electrophoretic profile. The average of total DNA molecular weight was about 112 kilobases. Using the equivalent endonucleases for genome digestion, the electrophoretic profile of ScGV DNA was not identical with those of other GV DNAs already characterized belonging to the following species

ORSTOM Fonds Documentaire

*Pseudaletia unipuncta*, *Spodoptera frugiperda*, *Trichoplusia ni*, *Pieris rapae*, *Plodia interpunctella*, *Chilo infuscatellus*, *Chilo sacchariphagus*, *Phthorimaea operculella*, *Choristoneura fumiferana*, *Pieris brassicae*, *Cydia pomonella* and *Estigmene acrea*.

A total nucleic probe was prepared, labelling with Digoxigenin. The capacity of this probe for detecting the viral DNA was tested using the dot-plot technique, the deposit of 2 µl was capable of detecting 5 pg of DNA. The above mentioned method was used for detecting the homology between ScGV DNA and *Pseudaletia unipuncta* GV DNA. The latter insect is a noctuid pest of maize in Eastern Africa. The experiments of hybridization by Southern blot permitted the recognition by the probe of all the electrophoretic fragments which confirm its specificity.

An antiserum titered as 1/1200° was prepared using all dissolved proteins (the granulin and the capsid proteins), applying the ELISA test using the alkaline phosphatase indirect method, 1ng of the dissolved proteins was detected. An equal concentration of *P. unipuncta* granulosis viral proteins was less intensively visible using the same test for detection.

**P**armi les principaux insectes foreurs du maïs et du sorgho, en Afrique du Nord-Est et en particulier en Égypte, *Sesamia cretica* Lederer, 1857 (Lepidoptera, Noctuidae) est le plus fréquemment observé [1]. Jusqu'à ce jour, un seul virus a été décrit chez ce ravageur [2], il s'agit d'un virus qui semble rattaché aux Picornaviridae. C'est à partir de larves malades, récoltées en plantation, que nous avons isolé des particules virales de type Baculovirus de granulose. Ce genre de virus d'insectes appartient à la sous-famille des Eubaculovirinae [3] où chaque virion se trouve au centre d'un corps d'inclusion protéique de forme ovoïde. Dans l'optique d'une lutte biologique menée à partir de virus entomopathogènes, la première perspective pouvant apparaître ne peut être basée que sur ce Baculovirus, l'utilisation d'un Picornavirus n'étant pas envisageable dans l'immédiat pour des raisons d'innocuité. La présente note fait le point de la caractérisation du génome à ADN de ce virus, suggérant qu'il s'agit d'un nouveau membre du genre des virus de granulose (« Granulosis Virus », GV).

## Matériel et méthodes

### Souches virales

L'inoculum original du virus de granulose de *S. cretica* (ScGV) provient de larves malades récoltées en plantation de maïs dans le delta du Nil à Kafr el Sheikh en 1990. La souche de granulose de *Pseudaletia (Mythimna) unipuncta* (PuGV) nous a été gracieusement fournie par le Docteur Guy Croizier (Station de Recherches de Pathologie Comparée INRA-CNRS de St-Christol-Les-Alès, France).

### Purification des granules

Les larves infectées sont broyées dans du tampon T.S. (50 mM Tris, 2 mM SDS, pH 7,8). La suspension homogénéisée, filtrée et clarifiée, subit plusieurs cycles de purification par ultracentrifugation en gradient de densité de saccharose 30/70% (p/p) à 45 000 g pendant 30 min. Les granules purifiés sont stockés en tampon Tris 50 mM, pH 7,8 à -20°C. La concentration de la suspension en granules est estimée par mesure de la densité optique à 450 nm.

The partial homology between the two types of virus detected by ELISA test was due to the presence of the same sequence coding for the protein of high degree of conservation (this result was confirmed by ELISA test, which the electrophoretic profiles of the two viruses were completely different).

Regarding the morphology of the inclusion bodies and the size of the viral particles, the *Sesamia cretica* virus seems to belong to the genus of Granulosis Virus, whereas the difference between the ScGV electrophoretic profile and those of already characterized GV's put the ScGV as a new virus among the group of granulosis baculoviruses.

The two viral diagnostic tools, which were prepared and titered in the laboratory, could be used in the study of viral epidemiology in the field.

The estimation of LD50 and LC50 values through the biological tests, could permits preliminary experiments of virus application under field conditions as a step towards using this virus in biological control. ▲

## Observation en microscopie électronique

Une suspension de granules purifiée est déposée sur une grille recouverte d'un film de collodion carboné. Les corps d'inclusion sont ensuite contrastés négativement avec de l'acétate d'uranyle à 2%, pH 7,4.

## Extraction et purification de l'ADN

Les particules virales sont libérées des granules après une attaque au Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (60 mM final). La suspension de virus purifiés est ajustée à 4 mM EDTA puis traitée par le lauroyl sarcosinate de sodium à 2% et à la protéinase K (200 µg/ml) pendant 2 h à 37°C. La déprotéinisation de la solution d'ADN est parachevée par 3 extractions phénoliques. La phase aqueuse est ensuite dialysée contre du tampon T.E. (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) à 4°C pendant 36 h. L'ADN est précipité par addition de 2 volumes d'éthanol absolu en présence d'acétate de sodium (0,3 M final) pendant 14 h à -20°C. Après centrifugation, le culot est rincé à l'éthanol à 70% puis repris dans du tampon T.E. La concentration en ADN est estimée par la mesure de la densité optique à 260 nm. Cette suspension est conservée à -20°C.

## Digestion de l'ADN par les enzymes de restriction et électrophorèse

La digestion de l'ADN s'effectue dans les conditions décrites par le fournisseur des enzymes de restriction. Généralement la digestion de 0,5 à 1 µg d'ADN est réalisée dans un volume final de 20 µl pendant 4 h à 37°C. Les électrophorèses sont réalisées en gel d'agarose de 1 à 2% dans du tampon T.E.P. (90 mM Tris-Phosphate, 20 mM EDTA, pH 8,0). La taille des fragments de restriction est estimée par comparaison avec l'ADN du phage Lambda digéré par les enzymes EcoRI et Hind III. Nous avons utilisé les 17 endonucléases suivantes : Bam HI, Bgl II, Cfo I, Cla I, Eco RI, Eco RV, Hind II, Hind III, Hpa I, Hae III, Kpn I, Mlu I, Pst I, Pvu II, Sal I, Sma I, Xho I.

## Sondes nucléiques

Nous élaborons une sonde totale non radioactive à partir de l'ADN du virus ScGV par marquage à la

Figure 1. **Observation en microscopie électronique de corps d'inclusion purifiés du virus de granulose de *Sesamia cretica* après coloration négative à l'acétate d'uranyle.** La barre représente 400 nm.

Figure 2. **Profils électrophorétiques de restriction de l'ADN du virus de granulose de *Sesamia cretica* digéré par les endonucléases suivantes :** ligne 1 : Bgl II ; ligne 2 : Bam HI ; ligne 3 : Eco RI ; ligne 5 : Xho I ; ligne 6 : Sma I ; ligne 8 : Kpn I ; ligne 9 : Sal I ; ligne 10 : HpaI ; ligne 11 : Cfo I ; ligne 12 : Pst I ; ligne 13 : ADN natif ; Lignes 4 et 7 : ADN du phage lambda digéré par Eco RI et Hind III. Gel d'agarose à 1%.

Figure 3. **Profils électrophorétiques de restriction de l'ADN du virus de granulose de *Sesamia cretica* digéré par les endonucléases suivantes :** ligne 1 : Hind III ; ligne 2 : Bam HI ; ligne 3 et ligne 4 : Bgl II ; ligne 5 : Sma I ; ligne 7 : Cla I ; ligne 8 : Hae III ; ligne 9 : Hind II ; ligne 10 : Eco RV ; ligne 11 : Pvu II ; ligne 12 : Mlu I ; ligne 14 : Xho I ; lignes 6 et 13 : ADN du phage lambda digéré par Eco RI et Hind III. Gel d'agarose à 2%.

Figure 4. **Hybridation en Southern blot entre les génomes des virus ScGV et PuGV.** a) Profils électrophorétiques de restriction de l'ADN des virus ScGV et PuGV. Gel d'agarose à 1%. Ligne 1 : ADN du phage lambda digéré par Eco RI et Hind III Ligne 2 : ADN de ScGV digéré par Eco RI Ligne 3 : ADN de PuGV digéré par Eco RI Ligne 4 : ADN de ScGV digéré par Bam HI Ligne 5 : ADN de PuGV digéré par Bam HI Ligne 6 : ADN de SPP1 digéré par Eco RI. Ligne 7 : ADN de ScGV digéré par Hind III Ligne 8 : ADN de PuGV digéré par Hind III b) Image après « Southern blot » des fragments d'ADN, montrés sur la Figure 4 a, révélés par une sonde d'ADN de ScGV marqué à la digoxigénine.

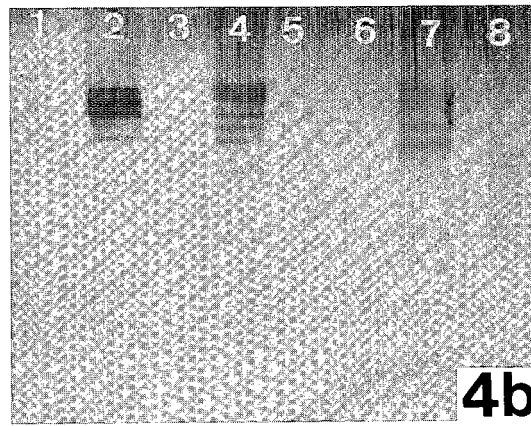
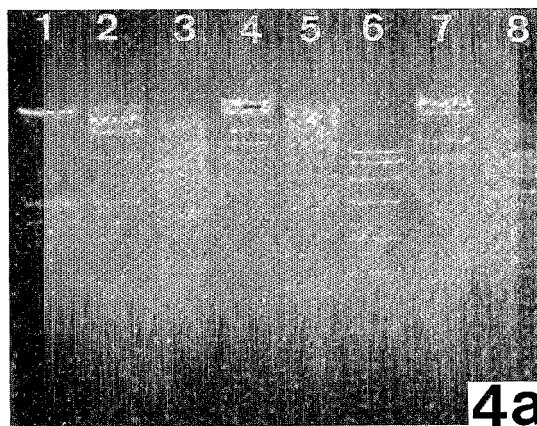
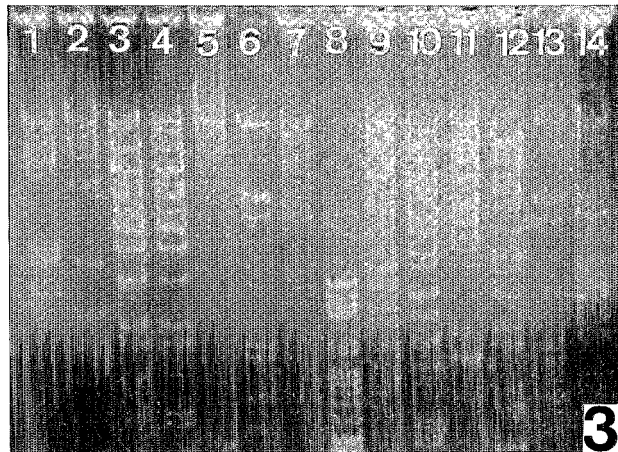
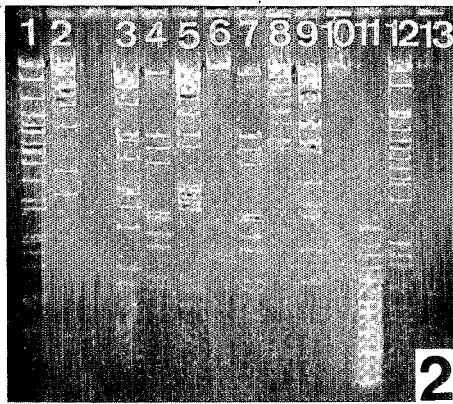
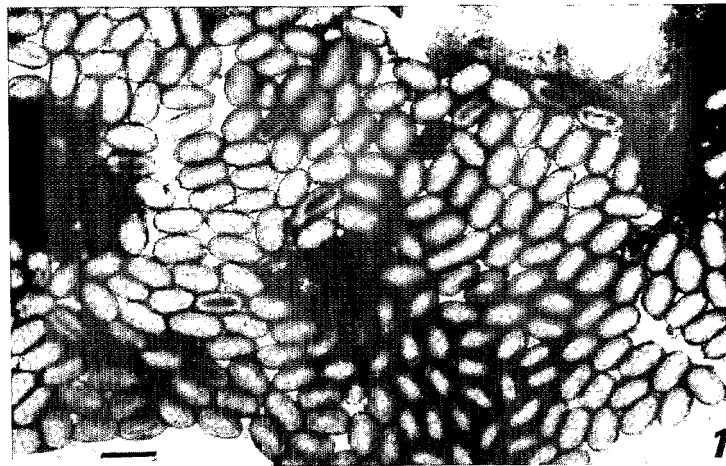
digoxigénine-11-dUTP selon le protocole préconisé par le fournisseur (Boehringer Mannheim) et nous suivons les mêmes recommandations pour mettre en œuvre la technique d'hybridation *dot blot* afin d'étalonner et de titrer

la sonde. Pour vérifier le marquage total des fragments du génome et pour rechercher des homologies de séquence entre l'ADN de ScGV et celui de PuGV, nous utilisons la méthode *Southern blot* [5].

Tableau I

Taille estimée (en Kilopaires de bases) des fragments de restriction de l'ADN du virus de granulose de *Sesamia cretica* après digestion par 12 endonucléases. Estimated size (in Kilobases) of *Sesamia cretica* GV DNA fragments after digestion with 12 restriction endonucleases

	Xho I	Pst I	Sal I	Pvu II	Mlu I	Cla I	Eco RV	Bgl II	Eco RI	Hind III	Bam HI	Kpn I
A	21	24	23	21	14	13	19	27	19	25	25	14
B	19	22	17	15	12	8,3	11	20	18	23	21	13
C	16	16	16	13	8,3	7,5	9,8	13	15	20	19	12
D	13	9	15	11	7,4	6,4	7,6	9,1	14	11	13	11
E	12	8,5	10	9,2	7,2	5,9	6,3	6,1	7,7	7,4	10	10
F	7,9	7,8	9,2	7,7	6,2	5,4	6,1	5,7	5,1	7,1	7,3	9,8
G	5,5	6	5,9	7,2	5,7	4,8	5,6	5,6	4,8	7	5,4	8,3
H	4,4	4,6	5,7	4,5	5,4	4,6	5,1	4,8	3,7	6,7	3	7
I	2,9	4,4	5,5	4,4	5,3	4,4	4,5	4,4	2,6	6,2	2,3	5,7
J	2,7	3,9	4,7	4,1	4,6	4,2	4,4	4,3	2,4	3,4		5,5
K	2,7	3,4	4,6	4,1	3,9	4	4,1	3,8	2,1	3,2		5
L	2,5	3	4,2	3,8	3,3	4,1	4	3,1	1,6	2,6		1,7
M	2,4	2,9	2,9	3,6	3,2	2,9	3,4	2,5	1,1	0,9		
N	2,2	2,4	2,3	2,3	3	2,5	3,1	2,1	0,9	0,7		
O	1	1,5	2	2	2,9	2,3	2,6	1,6	0,5	0,6		
P	0,9	1,2	1,3	2,1	2,4	2,2	2,3	1,5				
Q	0,7	1,1	1	1,6	2,2	2,1	2,1	1,3				
R	0,6	0,9	0,9	1,2	1,8	2	2	1,2				
S	0,5	0,7	0,5	1,1	1,6	1,9	1,8	1,1				
T	0,4	0,6		0,7	1,3	1,8	1,4	1				
U	0,3	0,4		0,6	1	1,7	1,3	0,7				
V					0,9	1,6	1,2	0,5				
W					0,6	1,3	1					
X					0,5	1,2	0,8					
Y					0,4	1,1	0,6					
Z						1	0,4					
	118,8	124,3	131,7	120,2	102,7	91	107,5	119,9	98,5	124,8	106	103



### Test ELISA

Un sérum spécifique a été préparé à partir d'un lapin contre les protéines totales des granules et des virions. Le test ELISA *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* est effectué selon la méthode indirecte à la phosphatase alcaline [6] préconisée pour détecter, entre autre, les Baculovirus.

### Résultats

#### Étude en microscopie électronique.

L'examen d'une suspension purifiée en microscopie électronique, révèle un grand nombre de granules de forme

ovoïde de 360 à 440 nm de long pour une largeur de 170 à 230 nm (Fig.1). Une observation approfondie des corps d'inclusion nous permet d'apercevoir dans certains cas l'enveloppe du virion, à l'intérieur de laquelle apparaît la nucléocapside. Les virions mesurent entre 250 et 350 nm de long pour une largeur de 40 à 60 nm.

#### Caractérisation de l'ADN viral

L'ADN purifié du virus ScGV a été digéré par un total de 17 endonucléases de restriction. Ce génome ne présente pas de site de clivage pour Hpa I. L'enzyme Sma I coupe l'ADN génomique une seule fois. Les enzymes Cfo I,

Hae III et Hind II génèrent des profils électrophorétiques de restriction particulièrement complexes et n'ont pas été pris en compte pour la caractérisation de l'ADN. Les enzymes Bam HI, Bgl II, Cla I, Eco RI, Eco RV, Hind III, Kpn I, Mlu I, Pst I, Pvu II, Sal I et Xho I génèrent des profils de restriction caractéristiques composés respectivement de 9, 22, 26, 15, 26, 15, 25, 12, 21, 19, 21 segments (Fig. 2 et Fig. 3). La taille du génome a été estimée en additionnant les tailles des fragments de restriction générés par chaque enzyme (Tableau). Compte tenu de l'imprécision de la détermination du poids moléculaire des fragments de grande taille, la valeur moyenne se situe aux environs de 112 Kilobases. Les profils obtenus à partir de l'ADN du ScGV ne correspondent à aucun profil obtenu, avec les enzymes équivalentes, chez les virus de granulose dont l'ADN a été caractérisé : *Pseudaletia unipuncta* [4], *Spodoptera frugiperda* et *Trichoplusia ni* [7], *Pieris rapae* et *Plodia interpunctella* [8], *Chilo infuscatellus* et *Chilo sacchariphagus* [9], *Phthorimaea operculella* [10], *Choristoneura fumiferana* [11], *Pieris brassicae* [12], *Cydia pomonella* [13] et *Estigmene acrea* [14].

### Sonde nucléique

Une sonde nucléique totale a été préparée en faisant intervenir un marquage froid à la digoxigénine. La capacité de cette sonde pour détecter l'ADN viral a été testée. Nous l'avons étalonnée et titrée par la technique de *dot blot* où elle révèle jusqu'à 5 pg d'ADN par dépôt de 2 µl. Par cette méthode, nous avons détecté quelques homologues avec l'ADN purifié du virus de granulose de *Pseudaletia unipuncta*, Lépidoptère Noctuidae, également ravageur du maïs en Afrique de l'Est. Des expériences d'hybridation par *Southern blot* nous ont révélé que la sonde reconnaissait la totalité des fragments de restriction (Fig. 4) et ont confirmé sa spécificité.

### RÉFÉRENCES

- Mostafa F. F. 1981. Biological and ecological studies on the pink borer *Sesamia cretica* Led. (Lepidoptera: Noctuidae). Ph. D. thesis, Faculty of Agriculture, Cairo University, Egypt, 360 p.
- Fediere G., Taha A., Lery X., Giannotti J., Zeddani J. L., Monsarrat A. et Abol Ela S. 1991. A small RNA virus isolated from the maize stem borer *Sesamia cretica* Led. (Lepidoptera: Noctuidae) in Egypt. *Egypt. J. Biol. Cont.* 1: 115-9.
- Francki R. I. B., Fauquet C., Knudson D. L. et Brown D. 1991. Classification and nomenclature of viruses. Supplementum 2, *Archives of Virology*, Springer-Verlag Wien, 450 p.
- Harvey J. et Tanada Y. 1985. Characterization of the DNAs of five Baculovirus pathogenic for the armyworm, *Pseudaletia unipuncta* J. *Invertebr. Pathol.* 46: 174-9.
- Southern E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-17.
- Kelly D. C., Edwards M. L., Evans H. F. et Robertson J. S. 1978. The use of the enzyme linked immunosorbent assay to detect a nuclear polyhedrosis virus in *Heliothis armigera* larvae. *J. Gen. Virol.* 40: 465-9.
- Smith G. E. et Summers M. D. 1978. Analysis of Baculovirus genomes with restriction endonuclease. *Virology* 89: 517-27.
- Tweeten K. A., Bulla L. A. et Consigli R. A. 1980. Restriction enzyme analysis of the genomes of *Plodia interpunctella* and *Pieris rapae* Granulosis Virus. *Virology* 104: 514-9.
- Easwaramoorthy S. et Cory J. S. 1990. Characterization of the DNA of Granulosis Viruses isolated from two closely related moth, *Chilo infuscatellus* and *C. sacchariphagus indicus*. *Arch. Virol.* 110: 113-9.
- Vickers J. M., Cory J. S. et Entwistle P. F. 1991. DNA characterization of eight geographic isolates of Granulosis Virus from the potato tuber moth (*Phthorimaea operculella*) (Lepidoptera, Gelechiidae). *J. Invertebr. Pathol.* 57: 334-42.
- Arif B. M., Guangyu Z. et Jamieson P. 1986. A comparison of three Granulosis Viruses isolated from *Choristoneura* Spp. *J. Invertebr. Pathol.* 48: 180-6.
- Crook N. E. 1986. Restriction enzyme analysis of Granulosis Viruses isolated from *Artogeia rapae* and *Pieris brassicae*. *J. gen. Virol.* 67: 781-7.
- Crook N. E., Spencer R. A., Payne C. et Leisy D. J. 1985. Variation in *Cydia pomonella* Granulosis Virus isolates and physical maps of the DNA from three variants. *J. gen. Virol.* 66: 2423-30.
- Cattano S.P. et Langridge W.H.R. 1982. Characterization of DNA from a Granulosis Virus of *Estigmene acrea*: (Lepidoptera). *Virology* 119: 199-203.

### Test ELISA

L'antisérum préparé à partir d'un lapin contre l'ensemble des protéines dissoutes, granuline et protéines capsidaires, présente un titre de 1/1200<sup>e</sup>. Utilisé pour étalonner un test ELISA selon la méthode indirecte à la phosphatase alcaline, il est dilué au 1/500<sup>e</sup> avec un conjugué dilué au 1/1000<sup>e</sup>. Dans ces conditions, le test est capable de révéler jusqu'à 1 ng de protéines dissoutes dans un dépôt de 200 µl. A concentration de protéine égale, ce test a révélé beaucoup moins intensément la présence du virus de granulose de *P. unipuncta*.

### Conclusion

Par la morphologie de ses corps d'inclusion et par la taille de ses particules, ce virus de *Sesamia cretica* semble bien appartenir au genre des virus de granulose. Les profils de restriction enzymatique de l'ADN génomique, différant de ceux des virus de granulose déjà caractérisés, nous laissent penser que le virus ScGV pourrait correspondre à un nouveau type de Baculovirus de granulose. Certaines homologues, révélées par la sonde nucléique, entre les génomes de ScGV et de PuGV, résultent du fait que ces virus contiennent des séquences codant pour des protéines dont on connaît le haut degré de conservation chez ces virus, comme la granuline (ces résultats sont confirmés dans les tests ELISA, alors que les profils enzymatiques de ces 2 virus sont totalement différents).

Les deux outils de diagnostic viral, que nous avons titrés et étalonnés, vont nous permettre d'aborder, dans des conditions parfaitement contrôlées, les études épidémiologiques de la maladie sur le terrain. Faisant suite à des tests de pathogénicité en laboratoire, particulièrement prometteurs, ces études devraient nous ouvrir la voie à des essais d'utilisation de ce virus, en champs, dans le cadre de la lutte biologique. ▼