La rhizomanie de la betterave : état actuel de nos connaissances

Pascal Valentin, Guy Fonné, François Blech, Marcelle Gerst, Catherine Reinbold, Olivier Lemaire, Didier Merdinoglu, Sabine Merdinoglu, Charles Putz

La rhizomanie de la betterave est actuellement le problème sanitaire majeur de la culture betteravière dans le monde. Cette maladie est due au virus des nervures jaunes et nécrotiques de la betterave *(beet necrotic yellow vein virus, BNYVV)* transmis par le champignon du sol *Polymyxa betae.*

Observée pour la première fois en Italie dans la plaine du Pô vers 1955, elle s'est répandue rapidement dans de nombreux pays d'Europe : en premier lieu en France et plus particulièrement en Alsace en 1970 [1], puis en Grèce, en Allemagne, dans tous les pays de l'Est de l'Europe et plus récemment en Angleterre [2]. Parallèlement à sa progression en Europe, elle s'est développée dans le monde entier : au Japon dès 1965 [3], sur le continent américain [4], en Chine [5] et dans la Communauté des États Indépendants (CEI = ex-URSS).

La présence de *P. betae* dans les racines de betteraves a été mentionnée dès 1964 par Keskin [6], qui a décrit le cycle de ce champignon de façon détaillée. Peu après les premières descriptions du champignon, Canova en 1966 [7] mentionne la présence d'un virus chez la betterave, associée à un symptôme de développement anarchique des racines (rhizomanie). Les études concernant ce virus ont débuté dès 1968 et le nom définitif de virus des nervures jaunes et nécrotiques de la betterave ou BNYVV lui a été attribué par Tamada et Baba en 1973 [8]. Après avoir été longtemps soupçonnée, la transmission de la rhizomanie par *P. betae* a été démontrée par Tamada en 1975 [9].

En 1977 [10], on montre par inoculation mécanique que le BNYVV est seul responsable des symptômes de rhizomanie, l'absence de symptômes provoqués par le seul *P. betae* étant confirmée par de nombreux auteurs.

Importance économique

La gravité de la maladie est due en grande partie à son caractère endémique entraînant son extension par le sol dans les pays producteurs de betteraves. L'infection a lieu dans les sols faiblement drainés ou fortement irrigués.

En France, environ 78 000 hectares cultivés en betteraves sont contaminés, soit 18 % de la sole betteravière totale selon l'Institut technique de la betterave [11]. Le rendement, de 60 à 70 tonnes de racines à l'hectare en zone saine, peut chuter jusqu'à 20 tonnes dans les parcelles contaminées. Parallèlement, le taux de sucre normalement voisin de 18 % baisse jusqu'à 8 % en moyenne. Plus l'attaque est précoce, plus les pertes de rendement sont importantes. Enfin, l'augmentation de la concentration en ions Na^+ et K^+ dans les pivots se traduit par une diminution de la pureté des jus [12, 13]. Ces effets combinés entraînent une baisse importante d'extraction et de rentabilité pour l'industrie sucrière.

Symptomatologie

Le symptôme le plus caractéristique de la rhizomanie *(photo 1)* est visible au niveau des racines de la betterave : la base du pivot présente un étranglement, sa taille peut être considérablement réduite et les anneaux vasculaires se nécrosent *(photo 2)*. Le chevelu racinaire, nécrosé également, prolifère anormalement, produisant une « barbe poivre et sel ». C'est ce symptôme de chevelu racinaire qui a donné le nom italien à la maladie : rhizo = racine, mania = folie.

Cette attaque racinaire provoque un déficit dans l'alimentation hydrique, entraînant le flétrissement généralisé de la partie aérienne des betteraves en été, aux heures chaudes de la journée *(photo 3)*. Les symptômes de flétrissement au champ donnent, en général, l'alerte mais peuvent être confondus avec des problèmes de stress hydriques abiotiques. Ce sont les symptômes racinaires, spécifiques de la maladie, qui permettent le diagnostic précis de la rhizomanie. Le syndrome foliaire qui a donné son nom anglais au virus [8] n'apparaît qu'exceptionnellement ; dans ce cas, le limbe se

P. Valentin, G. Fonné, F. Blech, M. Gerst, C. Reinbold, O. Lemaire, D. Merdinoglu, S. Merdinoglu, C. Putz : Laboratoire de Pathologie végétale de la Station Grandes Cultures, Inra Colmar, 28, rue de Herrlisheim, PB 507, 68021 Colmar cedex, France.

Tirés part : P. Valentin

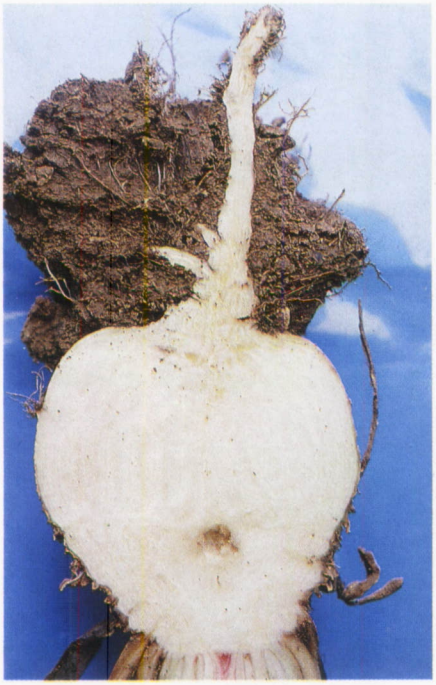

Photo 1. Étranglement du pivot et prolifération de racines blanches et brunes.

Photo 1. Constriction of the main tap root and proliferation of white and brown lateral rootlets.

Photo 2. Symptôme typique de la rhizomanie de la betterave : chevelu racinaire abondant et faisceaux conducteurs fortement marqués et en partie nécrosés.

Photo 2. Typical rhizomania disease symptom characterised by the abnormally high proliferation of rootlets causing root bearding.

Photo 4. Taches jaunes localisées le long des fines nervures. Ce type de symptôme rare est à l'origine du nom du virus (jaunisse nécrotique de nervures).

Photo 4. The term "necrotic yellow vein" was coined to describe a clear, but seldom observed, leaf symptom: yellowing along the veins. The yellowing of the veins enlarges and tends to coalesce, becoming brown and necrotic.

Clichés P. Valentin

Photo 3. Symptômes de flétrissement des feuilles de betterave en été, suite à une attaque de rhizomanie.

Photo 3. Symptoms of rhizomania in the field. During the summer, leaves of diseased sugar-beet plants may show flabbiness, wilting and mild yellowing.

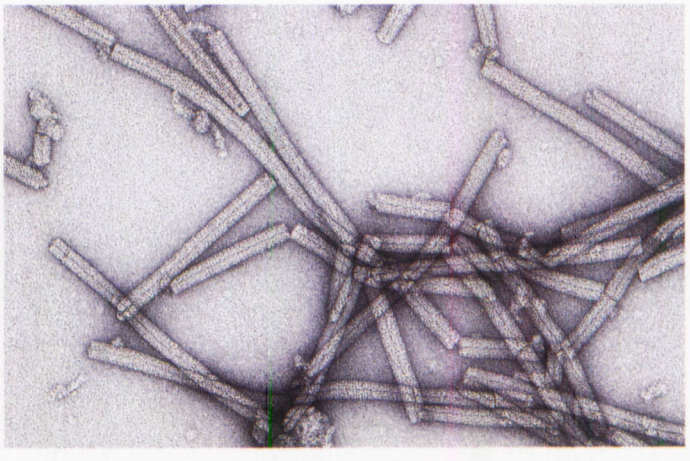

Photo 5. Vue en microscopie électronique d'une préparation purifiée de BNYVV. La largeur de la particule est de 20 nanomètres.

Photo 5. Electron micrograph of a purified preparation of BNYVV. Particle width is 20 nanometers.

gaufre et présente des taches jaunes le long des nervures qui finissent par se nécroser *(photo 4)*. Le BNYVV étant normalement localisé dans les tissus racinaires, les plantes montrent rarement des symptômes systémiques, et une plante sans symptôme apparent peut, en réalité, être infectée. Il apparaît donc difficile d'évaluer l'extension de la maladie dans les conditions du champ de culture [14].

Tolérance et résistance

L'inquiétude des producteurs a amené les sélectionneurs à rechercher des variétés tolérantes à la rhizomanie. Cette création variétale a permis, dès 1986, la diffusion de la variété Rizor, ce qui a considérablement limité les dégâts dans les zones infectées, prêtes à abandonner la culture de la betterave. En 1994, six variétés tolérantes ont été inscrites au Catalogue officiel des espèces et variétés, et les essais actuels portent sur seize autres variétés ; par ailleurs, trois génotypes de betteraves transgéniques exprimant le gène de la capside du virus de la rhizomanie ont été obtenus. La tolérance est une notion agronomique : une plante est dite tolérante lorsque, malgré l'attaque de la maladie, elle permet d'obtenir un rendement économiquement valable. De plus en plus, la notion de tolérance est remplacée par celle de résistance partielle, qui décrit plus fidèlement le comportement des variétés commerciales. Les recherches actuelles visent la résistance totale. Compte tenu de la lente et régulière propagation de la maladie, il est souhaitable que, dans quelques années, chaque variété commercialisée soit résistante à la rhizomanie. Or, nous ne possédons actuellement que peu de connaissances sur les différentes sources de résistance de ces variétés et des recherches fondamentales de génétique s'avèrent donc indispensables en la matière.

Dans cet article de synthèse, nous allons présenter d'une manière non exhaustive [15], après un bref historique des travaux de recherche français, les données actuelles concernant l'agent pathogène (le virus BNYVV), le champignon vecteur *P. betae* et son épidémiologie, ainsi que les moyens de lutte, particulièrement celui qui reste le plus utilisé : la résistance génétique.

Historique des travaux français menés à l'Inra de Colmar

En 1971, le Service agronomique de la Sucrerie d'Erstein (Bas-Rhin), alarmé par le développement d'une maladie de la betterave inconnue en Alsace, a fait appel à la Station de pathologie végétale de Colmar dirigée alors par A. Vuittenez. Les symptômes observés au champ et la présence de kystes du *P. betae* dans les radicelles des betteraves atteintes devaient conduire A. Trouvelot à assimiler cette maladie à la « rizomania », virose décrite par Canova. Cette hypothèse de travail fut vérifiée par microscopie électronique [1].

Compte tenu de l'urgence d'une solution agronomique, Vuittenez et son équipe menèrent dès 1973 des expérimentations portant sur la désinfection de sol rhizomanié en plein champ à Erstein [16]. Compte tenu de la forte chute de rendement et de l'obtention d'une production impropre à la transformation en sucre, un champ contaminé était alors considéré comme un champ perdu pour la culture betteravière. Devant l'absence d'efficacité et de persistance des produits phytosanitaires du marché, l'idée de la lutte génétique s'est imposée peu à peu. Dans le même temps, l'équipe de Colmar a abordé l'étude de la purification du virus responsable dont les caractéristiques structurales étaient inconnues [17] : elle a mis au point un outil de diagnostic sérologique puis a étudié l'aspect *in situ* du virus en microscopie électronique [18].

Le laboratoire s'est ensuite fixé deux objectifs :

– la recherche de nouveaux types de tolérance/résistance, seuls capables d'enrayer, sur le plan agronomique, le fléau économique : Vuittenez a entamé en 1978 une sélection massale en zone contaminée notamment à partir de l'origine *Alba* (connue en Italie pour sa tolérance à la rhizomanie) et d'un mélange sucrier réalisé par Le Cochec (Inra Rennes). Cette sélection de la tolérance/résistance à la rhizomanie se poursuit encore actuellement ;

– l'étude de la structure et de l'organisation moléculaire du virus et de sa transmission par le champignon vecteur : le bagage génomique du virus, la séquence des extrémités des ARN, le poids moléculaire de la protéine capside et celui de chacun des quatre ARN ont ainsi été établis. La structure fine du virus au microscope électronique par filtration optique et par reconstitution à l'ordinateur a également été définie, en collaboration avec l'Université de Bâle [19]. Ces travaux se sont prolongés dès 1983 par une équipe de l'Institut de biologie moléculaire des plantes (IBMP) de Strasbourg, dirigée par Ken Richards, qui s'est attachée au séquençage total du génome et aux études structure/fonction. Dans cette coopération qui se poursuit, notre laboratoire étudie le matériel biologique, le pouvoir pathogène, la transmission, ainsi que les mécanismes d'interactions entre l'hôte et son pathogène.

Étude des propriétés biologiques du virus

L'étude biologique du virus avait été menée au Japon dès 1971 [3]. Il convenait de définir la gamme d'hôtes du virus de la rhizomanie en Europe, principalement inféodé à la famille des chénopodiacées (betteraves, chénopodes et épinards). Sur *Chenopodium quinoa*, selon les souches inoculées, les lésions locales sont soit jaune intense soit vert clair. Avec l'équipe de Strasbourg, nous avons montré que cette différence de symptômes était liée à des modifications dans le bagage génétique de certains isolats viraux et, notamment, à la présence ou non de l'ARN 3 [20].

Sur des coupes ultrafines effectuées soit dans des lésions locales sur feuilles soit dans des radicelles de betteraves du champ atteintes de rhizomanie, des particules de virus qui apparaissent libres ou sous forme d'agrégats présentant un début d'organisation en chevrons superposés ont été mises en évidence ; ce type d'agrégation constitue une particularité contribuant à la reconnaissance *in situ* du virus [21, 22] qui est, par ailleurs, absent dans de nombreuses cellules ou présent dans d'autres cas sous forme de petits agrégats, ce qui pourrait expliquer les faibles rendements obtenus lors des purifications virales.

Le virus de la rhizomanie est cependant un très bon antigène : injecté par voie intramusculaire au lapin, il permet d'obtenir un sérum polyclonal d'un titre élevé. Par test immunoenzymatique Elisa

Summary

Rhizomania of sugar beet: current knowledge

P. Valentin, G. Fonné, F. Blech, *et al.*

Rhizomania, a viral disease of sugar beet transmitted by a soil-borne fungal vector, was first discovered in Italy in 1955, and observed in France in 1970. It is now the world's major sugar beet disease and occurs in most beet-growing areas.

The common name of the disease (root madness) comes from the symptom of root bearding (Photo 2)*, caused by a proliferation of lateral rootlets. Above-ground symptoms are less specific: pale green leaves, often elongated and asymmetrical, with a upright posture; below-ground, the tap roots are constricted* (Photo 1)*. In the field during the summer, the leaves may show flabbiness and wilting* (Photo 3)*. Main leaves with typical yellow or necrotic veins are seldom observed (*Photo 4)*. Rhizomania can cause a reduction of sugar content and root weight, which can result in sugar yield dropping by up to 80%. The viral host range is restricted to* Beta *spp. and spinach.*

Scientists have devoted substantial researchs to two main areas.

• Pathogen identification (BNYVV: beet necrotic yellow vein virus), its RNA composition and structural organisation, and its transmission to plant roots by the soil-borne fungus Polymyxa betae *Keskin. The rod-shaped virus* (Photo 5) *survives in thick-walled resting spores of the vector* (Photo 7)*, and both can survive in the soil for 15 years or more.*

The life cycle of Polymyxa *has two phases* (Photo 6)*, both of which have multinucleated plasmodia as growth forms.*

1) The sporogenic phase produces resting spores (or cystospores). On germination, each resting spore releases a biflagellated primary zoospore.

2) The sporangial phase produces thin-walled sporangia that contain secondary zoospores, similar to the primary ones, responsible for the new infection process.

Reagents for viral detection have been improved both in serology and in molecular biology (cold DNA probes). Reliable diagnostic tests of the potential inoculum in infested soil have also been devised. Similarly, a Polymyxa betae *detection test using monoclonal antibodies is being developed in order to test plant germplasm resistance to the vector, determine field infestation levels, and work out relationships within the* Polymyxa *genus.*

• Control methods (chemical, prophylaxis, and the breeding of resistant cultivars). It soon appeared that the most promising solution for effective disease control was to breed resistant cultivars. Fortunately, the new sugar beet cultivar Rizor, partially resistant to the virus, has opened the way to the genetic improvement of sugar beet (Photos 8, 9 & 10)*. Resistant varieties were improved either by transgenosis or by introducing resistant genes present in wild* Beta *species. However, to maintain the level of resistance and evaluate the selection pressure of new viral isolates, many gaps in the knowledge of the epidemiology of the rhizomania pathosystem remain to be filled.*

Cahiers Agricultures 1995 ; 4 : 417-29

(Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) [23], nous avons montré que la sensibilité de détection est de 10 nanogrammes de virus par gramme de tissu de plante [24]. Notre antisérum anti-BNYVV, qui reconnaît tous les isolats du virus, a révélé que les isolats d'Italie, d'Allemagne et de Grèce étaient sérologiquement très proches de l'isolat alsacien 75/1, lui-même très voisin de la souche japonaise de référence YS. Des améliorations de l'outil sérologique de diagnostic ont été apportées ensuite par la technique des anticorps monoclonaux [25-27]. Avec de tels anticorps, il a été possible de localiser par microscopie électronique des sites antigéniques différents sur la surface même de la particule, puis, à l'aide de peptides synthétiques, de déterminer les sites antigéniques de la protéine capside elle-même [28].

Des sondes moléculaires radioactives, puis froides, cent fois plus sensibles que le test Elisa, ont été produites [29, 30]. Cependant, en test de routine, la méthode Elisa s'avère la plus utilisée, et le sérum de lapin produit au laboratoire sert pour la fabrication de trousses françaises de diagnostic.

Virus contaminants du BNYVV

Au fil des années, plusieurs virus ont été décrits comme contaminants ou accompagnateurs dans le complexe pathogène de la rhizomanie. Ainsi, la présence subliminale du virus de la mosaïque du tabac (TMV) dans le sol et dans les radicelles rhizomaniées a entraîné une contamination en France qui s'est traduite plusieurs fois par la perte en laboratoire des isolats du virus de la rhizomanie [31]. En Allemagne, la contamination des betteraves rhizomaniées avec le virus de la nécrose du tabac a souvent été constatée.

Un virus, transmis également par *P. betae*, le *beet soil borne virus* (BSBV), a été décrit en Grande-Bretagne [32, 33] et en Allemagne [34] comme sérologiquement différent de celui de la rhizomanie et ne provoquant pas de dégâts aussi considérables sur betteraves. Une réduction de 0 à 40 % du poids du pivot de betteraves inoculées mécaniquement par ce virus a été mesurée par divers auteurs [35].

Aux États-Unis, un virus, d'abord dénommé *Texas 7* puis *beet soil borne mosaic virus* (BSBMV), est associé en complexe avec le virus de la rhizomanie [36]. Il est également transmis par *P. betae*. Il ne semble pas induire de baisses de rendement ou de qualité et se manifeste par des symptômes différents de ceux de la rhizomanie. Le BSBMV est un virus à génome divisé (plusieurs types de particules virales allongées) ; sa protéine de capside est de 22,5 kilodaltons et ses ARN sont polyadénylés. Des relations sérologiques existent entre certains isolats de BSBMV et le BNYVV [37].

Le virus de la rhizomanie peut donc être associé avec d'autres virus transmis par le sol. Bien que des premières données aient été mentionnées dès 1977 au Japon [10], la preuve définitive du rôle pathogène du virus BNYVV a été apportée par Lemaire qui a cultivé *in vitro* des betteraves en présence du virus purifié et en l'absence de *Polymyxa*. Ces betteraves ont présenté un abondant chevelu racinaire et les symptômes systémiques foliaires caractéristiques [38]. Le virus seul est donc bien l'agent causal de cette pathogenèse ; le champignon, bien qu'induisant une faible réduction de la croissance des plantules atteintes, ne joue qu'un rôle de vecteur et de conservateur de la maladie dans le sol.

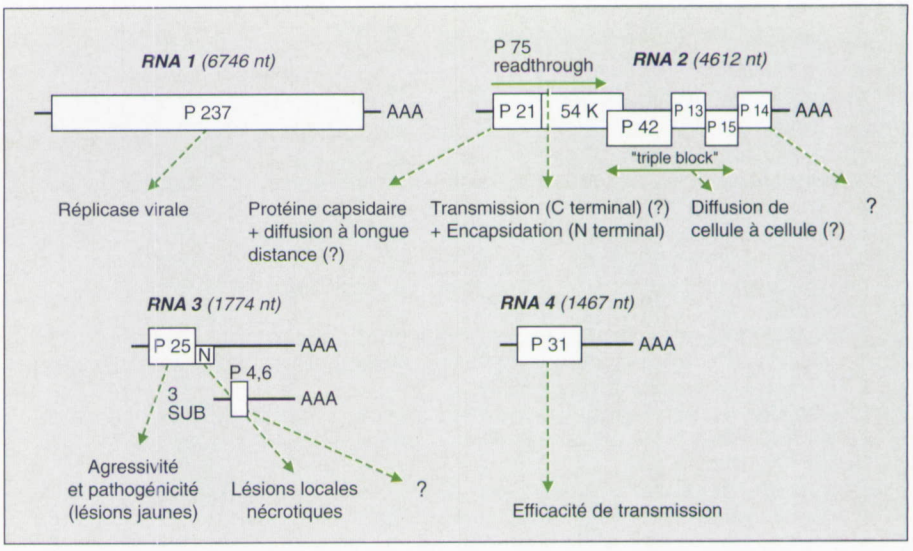

Figure 1. Organisation génomique et fonctions des différents cistrons de BNYVV.

Figure 1. Genomic organisation and functions of the various BNYVV cistrons.

L'agent pathogène

Le BNYVV est un virus à symétrie hélicoïdale qui se présente sous la forme de bâtonnets rigides *(photo 5)*. L'organisation de la nucléoprotéine ressemble par certains points à celle du TMV. Putz [39] distingue quatre longueurs de bâtonnets pour l'isolat français : 85, 100, 265 et 390 nanomètres. La capside est composée d'un seul type de sous-unité protéique de poids moléculaire 21 kilodaltons. Chacune de ces quatre particules virales contient un ARN simple brin de polarité positive. Chaque ARN possède un groupement m^7Gppp (cap) à son extrémité 5' et une séquence polyadénylée à son extrémité 3' [40]. Contrairement aux extrémités 3' très conservées qui ont probablement une structure secondaire commune en double épingle à cheveux, les séquences 5' terminales ne présentent pas d'homologies très grandes.

L'étude du génome a débuté par la production de sondes spécifiques des quatre ARN [41]. Puis le génome a été entièrement cloné et séquencé [42-44], ce qui a permis d'établir l'organisation génomique du BNYVV *(figure 1)*.

L'étude de ses propriétés biologiques et de son organisation moléculaire a montré que le virus de la rhizomanie est un virus à génome divisé, représentant un modèle intéressant pour l'étude des fonctions de son génome viral [45, 46]. L'analyse des relations structure/fonctions a abouti à attribuer au BNYVV un ensemble d'une dizaine de gènes répartis de la façon suivante.

L'ARN-1

Constitué de 6 746 nucléotides, il contient une seule phase de lecture ouverte (ORF pour *open reading frame*), codant pour une protéine P 237 (237 kDa). Cette protéine présente des homologies de séquence avec de nombreuses protéines non structurales impliquées dans la réplication d'autres virus. Inoculé à des protoplastes de *C. quinoa*, l'ARN-1 est capable de s'autorépliquer, ce qui confirme que la protéine P 237 possède les propriétés d'une ARN polymérase ARN)-dépendante.

L'ARN-2

Long de 4 612 nucléotides, il contient 6 ORF. La première code pour la protéine de capside ou coque protéique de 21 kilodaltons. Ce premier cistron se termine par un unique codon stop (le codon ambre UAG) dont la translecture permet l'expression d'une protéine dite de *readthrough* ou protéine P 75 [47]. Son domaine de translecture comporte 54 kilodaltons. Par l'obtention de mutants de délétion et par l'utilisation de la technique de marquage à l'or colloïdal, deux fonctions ont pu être définies pour cette protéine :

– une bonne encapsidation des ARN viraux grâce à son extrémité N-proximale [48, 49] ;

– la transmission du virus par le vecteur *P. betae*, par son extrémité C-terminale [50].

Il a été possible de préciser par tests biologiques réalisés avec des mutants que la limite de la région nécessaire à une bonne encapsidation se situe entre les nucléotides 1384 et 1405 et que la séquence KTER d'acides aminés (K = lysine ; T = thréonine ; E = acide glutamique ; R = arginine) située à la surface de la protéine native est essentielle à la transmission du virus par son vecteur.

Les trois cistrons suivants constituent un *triple gene block*, trois phases de lecture ouvertes chevauchantes qui sont impliquées dans le mouvement du virus de cellule à cellule par augmentation de la porosité des plasmodesmes des tissus infectés *via* les protéines de 42, 13 et 15 kilodaltons [51]. Le *triple gene block* est une organisation d'ORF qui a été décrite chez les potexvirus, les carlavirus et les hordeivirus.

Glossaire

Inoculation mécanique : passage manuel d'un virus à sa plante-hôte par frottement sur la feuille d'un jus brut ou purifié de virus à l'aide d'une poudre abrasive.
Extrémités 5' et 3' terminales : les nucléotides sont liés entre eux par des liaisons « phosphate » entre le (3') OH d'un nucléotide et le (5') OH du nucléotide suivant. Ce type de liaison permet la constitution de chaines nucléotidiques de longueur indéfinie, mais commençant toutes par un nucléotide avec une extrémité (5') OH libre et se terminant par un nucléotide avec un (3') OH libre.
ARN polyadénylé : addition post-transcriptionnelle d'un grand nombre de résidus de désoxyadénosine monophosphate à l'extrémité 3' d'un ARN, formant une queue dite poly A.
Groupement m^7 Gppp ou coiffe : structure méthylée particulière de l'extrémité des ARN de certains virus et des ARN messagers de l'hôte, appelée coiffe ou *cap*.
Phase de lecture ouverte ou *ORF* : suite de codons, c'est-à-dire d'ensembles de trois nucléotides, permettant la synthèse d'une protéine par traduction du message génétique par une enzyme. Une phase de lecture commence par un codon AUG, dit codon d'initiation, et se termine par un codon UAG, dit codon d'arrêt ou codon ambre.
Translecture ou *readthrough* : lors de la synthèse d'une protéine, le ribosome rencontre à la fin de la lecture un codon d'arrêt. Il existe différents codons d'arrêt. Dans le cas du codon UAG, le ribosome peut continuer s'il est alimenté par un ARNt qui supprime cet arrêt ; c'est la translecture. Il en résulte une synthèse simultanée de deux types de protéines.
Motif de *nucleotide binding* : structure stéréochimique particulièrement favorable aux liaisons « hydrogène » entre nucléotides et protéines.
ARN subgénomiques : ARN intermédiaires que certains virus produisent dans les plantes infectées et qui proviennent de la réplication d'une partie de leur ARN génomique ou de leur fragmentation spécifique. Ces ARN sont traduits dans la cellule-hôte pour donner chacun une protéine virale.
Décalage du cadre de lecture ou *frameshift* : il consiste à partir, non pas du premier nucléotide du premier codon, mais du deuxième, ce qui décale d'un cran toute la séquence traduite.
Hélicase : enzyme faisant partie du complexe de réplication et de transcription (synthèse d'un ARN nouveau à partir d'un ARN ou d'un ADN de départ). Cet enzyme est codé par le virus.
ARN polymérase ARN-dépendante : enzyme de réplication qui copie l'ARN génomique en un ARN complémentaire.

La P 42 présente comme les hélicases un motif *nucleotide binding* capable de fixer les ARN et les ADN simple et double brins ; elle peut être retrouvée dans les fractions enrichies en membranes préparées à partir de plantes infectées.
La protéine de 14 kilodaltons produite par le sixième et dernier cistron est exprimée *in vivo* à partir d'un ARN subgénomique et elle agit en *cis* sur la réplication de l'ARN-2 et en *trans* sur la traduction de la protéine de la coque.

L'ARN-3

Long de 1 774 nucléotides, il code pour une protéine de 25 kilodaltons impliquée dans la symptomatologie. Lorsque le virus est transmis naturellement aux racines de betterave par l'intermédiaire du vecteur, les quatre ARN génomiques sont toujours présents et de taille constante [52]. Dans ce cas, l'ARN-3 est responsable de la prolifération des radicelles. En revanche, dans des conditions d'inoculation mécanique des feuilles d'une plante hôte non naturelle telle que *C. quinoa*, les ARN-3 et /ou 4 peuvent subir des délétions spontanées, voire disparaître [53]. Sur une telle plante hôte, l'ARN-3 joue un rôle très important dans la symptomatologie puisqu'il induit l'apparition de lésions de type sévère, jaunes. En effet, les feuilles inoculées avec les ARN-1 et 2 seuls présentent des lésions chlorotiques pâles, alors que la présence d'ARN-3 dans l'inoculum induit la formation de lésions chlorotiques jaune vif. Par immunomarquage, la localisation nucléaire de la P 25 a pu être démontrée et s'expliquerait par la présence d'une séquence riche en acides aminés basiques KRIRFR (K = lysine ; R = arginine ; I = isoleucine ; F = phénylalanine) et par une région riche en cystéine qui pourrait former un motif en doigt de zinc et interviendrait au niveau de la transcription. La présence de la protéine P 25 dans les noyaux pourrait expliquer son rôle dans l'expression des symptômes. Tous les mutants de délétion touchant la région codante de la P 25 conduisent à la disparition des lésions jaunes. Il en est de même de plusieurs mutants présentant un décalage du cadre de lecture (décalage appelé *frameshift)* de cette même protéine P 25.
Une deuxième protéine virale, de 6,5 kilodaltons, est responsable d'un changement de la symptomatologie ; elle est également codée par l'ARN-3. Elle est extrêmement hydrophobe et induit l'apparition de lésions nécrotiques sur les feuilles de *C. quinoa* lorsqu'elle est exprimée ; pour cette raison, elle a été appelée protéine N [54].
Enfin, en utilisant des transcrits infectieux de l'ARN-3, ainsi que les techniques de mutagenèse dirigée, et en tirant partie du fait que l'ARN-3 n'est pas indispensable au virus pour sa multiplication dans les feuilles, les séquences indispensables à la réplication de l'ARN-3 ont pu être caractérisées. Il s'agit des 300 premiers nucléotides et des 70 derniers, ce qui permet à un transcrit dépourvu de toute la région interne de l'ARN-3 (75 % de la séquence) d'être répliqué.

L'ARN-4

Long de 1 467 nuclétides, il code pour une protéine de 31 kilodaltons et joue un rôle important dans la transmission du virus par *P. betae* [55, 56]. Cette fonction a été mise en évidence en comparant les taux de transmission d'isolats artificiels, issus de transcrits infectieux. Un dispositif de simulation de la transmission naturelle a été mis au point en utilisant des plantules de betteraves comme plantes pièges. Les isolats naturels F 5 contenant les quatre ARN, S 2 (2 ARN) et artificiels 1 234 (contenant les ARN-1, 2, 3 et 4) et S 124 (ARN-1, 2, 4) sont transmis dans 85 % des cas alors que les isolats S 12 (ARN-1 et

2) et S 123 (ARN-1, 2, 3) ne sont transmis que dans 5 % des cas. Ces résultats montrent l'importance du rôle de l'ARN-4 dans la transmission [3]. Il reste à présent à préciser quel est le type d'interaction moléculaire qui lie la protéine P 31 à un récepteur membranaire spécifique du champignon *P. betae*.

L'ensemble des isolats de BNYVV semble se répartir en deux groupes géographiques majeurs, sur base des techniques de transcription inverse et d'amplification de certaines séquences codantes des ARN-2, 3 et 4 [57]. Aucune relation n'a pu être établie entre cette distinction des groupes A et B sur la base de leurs séquences et d'éventuelles différences de pouvoir pathogène. Des études se déroulent à cet égard dans le cadre d'une collaboration internationale sous l'animation de l'Institut international de recherches betteravières (IIRB). Il n'est pas exclu que des ARN supplémentaires soient présents dans les isolats obtenus tant au Japon qu'en France, notamment dans la région de Pithiviers connue pour son taux élevé de betteraves atteintes de manière systémique. Pour l'instant, la preuve qu'il ne s'agit pas d'ARN subgénomiques n'a pas été apportée.

Le virus de la rhizomanie se comporte donc comme un virus à génome quadripartite dans les conditions de transmission naturelle et comme un virus à génome bipartite associé à deux ARN satellites lorsqu'il est inoculé mécaniquement [58]. Les ARN-1 et 2 codent pour des fonctions essentielles (réplication, encapsidation et mouvement du virus) alors que les ARN-3 et 4 sont impliqués plus précisément dans des mécanismes propres à la maladie tels que la transmission et l'amplification de la multiplication virale dans les racines de betterave [59].

En 1984, Shirako et Brakke [60] ont proposé la création d'un nouveau groupe de virus appelé furovirus *(fungus-borne rod-shaped virus)* dont le *soil borne wheat mosaic virus* (SBWMV) est le membre type et dont le BNYVV est un membre possible, mais de plus en plus contesté. Ce groupe des furovirus a été décrit en détail par Brunt en 1988 [61] : tous les virus (8 à 11) supposés appartenir à ce groupe ont une structure à symétrie hélicoïdale et sont transmis par des plasmodiophoromycètes. En revanche, leur organisation génétique est très variable, peut-être même trop variable pour pouvoir les classer dans un seul groupe.

Le vecteur de la rhizomanie : *Polymyxa betae*

P. betae décrit par Keskin en 1964 [6] est un champignon appartenant à la classe des plasmodiophoromycètes, ordre des plasmodiophorales ; il colonise essentiellement les cellules de l'assise pilifère et du cortex des racines des chénopodiacées et de quelques amaranthacées et portulaccacées [62].

Le schéma de son cycle biologique *(photo 6)* constitue la référence en la matière. Lorsque les conditions sont favorables pour la germination des cystosores, elles libèrent des zoospores piriformes biflagellées. Au contact d'un poil absorbant des radicelles de l'hôte, la zoospore perfore la paroi végétale grâce à son stylet, et son contenu cellulaire est alors déversé dans le poil par l'ouverture ainsi pratiquée dans la paroi de l'hôte, l'enveloppe restant à l'extérieur du poil [63]. C'est à ce stade que le virus, s'il est présent dans le vecteur, est transmis [64]. Une masse cœnocytique appelée plasmode est formée dans le poil, suite aux mitoses successives du noyau de la zoospore. Le plasmode se déplace alors dans la cellule corticale et se différencie en plasmode plurilobé, puis en zoosporange. Une papille se différencie à l'endroit où le zoosporange est en contact avec la paroi cellulaire ; les zoospores secondaires formées dans le zoosporange sont émises par cette papille, soit à l'extérieur de la racine soit dans une cellule voisine.

Les plasmodes peuvent également se différencier en cystosores, formes de résistance du champignon constituées de spores de 4 à 5 microns de diamètre *(photo 7)*. Les conditions favorisant l'évolution du plasmode en zoosporange ou en cystosore sont encore ignorées, mais certaines conditions optimales de multiplication du champignon sont connues. L'eau est un facteur essentiel dans la mobilité des zoospores. Une température de 25 °C et un pH compris entre 7 et 8 favorisent son développement. La présence de rhizomanie, la sévérité de l'attaque et sa dissémination sont liées à l'activité du champignon vecteur, notamment à la germination de ses spores de repos et à la production de zoospores secondaires. Cette germination est elle-même très liée aux conditions d'humidité et de température du sol. Ainsi à 15 °C, le cycle du champignon est de vingt et un jours, contre seulement quatre jours à 25 °C, sa température optimale de développement [65]. Des isolats de *P. betae* qui diffèrent par leur agressivité et leur capacité vectrice ont pu être mis en évidence. Trois principaux biotypes de *P. betae* diffèrent dans leur gamme d'hôtes ; l'un est capable d'infecter toutes les espèces de chénopodiacées, l'autre uniquement quelques espèces et le troisième infecte seulement *Silene alba*, une caryophyllacée [66]. Du point de vue épidémiologique, seuls *Atriplex patula*, *Chenopodium album* et *Silene alba*, les trois mauvaises herbes les plus fortement colonisées, pourraient jouer un rôle dans la dissémination de la maladie. Cependant, d'une part, les isolats de *P. betae* issus de ces plantes ne passent pas ou très peu sur la betterave cultivée, d'autre part, ils ne sont pas capables de transmettre le virus à la betterave. On peut donc en conclure que les mauvaises herbes ne jouent aucun rôle dans la propagation de la maladie. Une approche moléculaire de caractérisation génétique des *Polymyxa*, par analyse des profils de restriction de l'ADN ribosomique, a permis d'établir des différences entre *P. betae* et *P. graminis* et de classer les isolats de ce dernier en deux sous-groupes sans qu'une corrélation entre ces différences moléculaires et des propriétés biologiques n'ait été mise en évidence [67]. Cette étude a permis de développer une sonde moléculaire qui reconnaît spécifiquement *P. betae*, malgré les difficultés liées à l'impossibilité d'obtenir le champignon en culture pure [68].

L'approche sérologique n'est pas aisée. Des anticorps polyclonaux puis monoclonaux ont été obtenus dans notre laboratoire mais, contrairement aux sondes, ils ne reconnaissent que certains stades du champignon et le bruit de fond est élevé. Des travaux pour améliorer la sensibilité de la technique et la développer en un test de routine, de type Elisa, se poursuivent.

Le BNYVV est transmis par *P. betae* de manière « persistante », c'est-à-dire pendant toute la durée de vie du vecteur. Ce terme, utilisé pour la transmission des virus par insectes, a été repris dans le cas de la rhizomanie pour illustrer le fait que les particules virales sont transportées à l'intérieur des zoospores et des cystosores de *P. betae*. La présence du virus à tous les stades du cycle du champignon a été

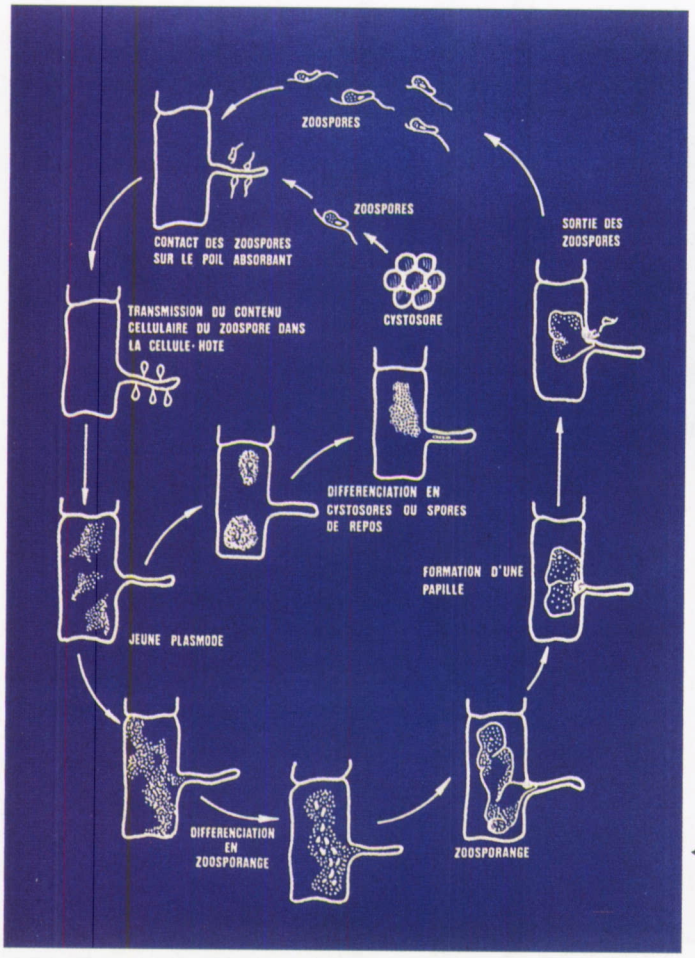

Photo 6. Cycle du champignon vecteur du BNYVV : le *Polymyxa betae,* un parasite obligatoire.

Photo 6. Life cycle of the BNYVV vector: the fungus *Polymyxa betae;* an obligate parasite.

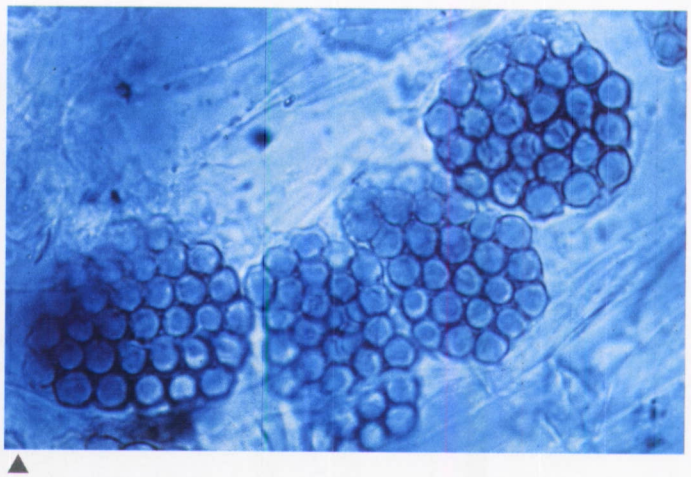

Photo 7. Cystosores (amas de spores de repos) de *Polymyxa betae* dans les cellules de radicelles de betteraves contaminées.

Photo 7. Resting spore clusters of *P. betae* present in the rootlet cells of diseased sugar beets.

démontrée par la technique du marquage à l'or colloïdal de coupes fines effectuées dans les radicelles rhizomaniées. Le virus est acquis par le champignon lors de sa phase de développement au détriment du contenu cellulaire et il semble qu'ensuite, lors des segmentations en spores, le virus contaminant soit rejeté vers les membranes et les parois [69]. Le *Polymyxa* virulifère serait moins agressif que le *Polymyxa* sans virus, si l'on s'en réfère au nombre de spores de repos produites dans le système racinaire de plantules de betterave cultivées sur sol contaminé [70], contrairement aux résultats des travaux américains [71]. Enfin, une étude a montré que le taux de colonisation du *Polymyxa* sans virus sur une radicelle déjà infectée par le BNYVV n'était que de 7 % de celui observé sur radicelle saine de betterave [34].

La durée de conservation des spores de *Polymyxa* dans le sol dépasse dix-huit années pendant lesquelles le potentiel infectieux de la spore reste intact [64].

Épidémiologie

L'épidémiologie en pathologie végétale est la science de l'évolution, dans le temps et dans l'espace, d'une population de pathogènes dans une population de plantes. Dans le cas de la rhizomanie, les études ont porté sur la quantification de l'inoculum (*P. betae* porteur du virus BNYVV) en relation avec le développement de la maladie, lequel est mesuré *in fine* par la réduction du rendement en sucre de la betterave contaminée.

Le virus ne survit effectivement que dans les spores de repos aux parois épaisses. Des travaux japonais [10] puis hollandais [72] ont tenté de mesurer la quantité d'inoculum nécessaire pour déclencher la maladie, puis de suivre son évolution en fonction de différents niveaux d'inoculum. Ils ont montré que 10 à 15 % de la population de *Polymyxa* était porteuse du virus, qu'une unité infectieuse était composée de 10 à 100 spores de repos. Il fallait donc mettre au point une méthode simple d'estimation d'un tel potentiel infectieux à partir d'un échantillon de sol, avant la culture de betteraves. Tuitert [73] a proposé une technique dite du nombre le plus probable d'unités infectieuses de *P. betae* virulifères, qui consiste à analyser l'infection de plantules-pièges de betteraves après semis dans une série de dilutions de 1 à 100 000 fois d'un sol rhizomanié. Cette méthode permet d'établir une corrélation non linéaire entre le potentiel infectieux de BNYVV dans un sol donné avant semis et l'importance des dégâts à la récolte dans un champ artificiellement infesté. Ainsi, en cas de contamination d'un sol par 50 grammes d'inoculum (le plus fort) par mètre carré, une rapide augmentation de l'inoculum a été détectée (près de 10 000 fois), qui se traduit par une diminution de rendement de 10 % la première année et 66 % la deuxième année de culture consécutive de betterave. La dispersion horizontale

de l'inoculum et la dissémination de la maladie par le mouvement des zoospores du vecteur et par la croissance racinaire dans le sol sont limitées à de faibles distances (voisines de 5 cm).
En revanche, le déplacement de sol lors des travaux agricoles est l'occasion de dissémination à plus grande distance. Cette dissémination des spores peut se faire par épandage de fumier et de lisier provenant d'animaux nourris avec des betteraves rhizomaniées. Elle est surtout favorisée par les transports de terre adhérant aux roues des tracteurs et remorques, des outils aratoires ou même aux produits agricoles comme les plants de pomme de terre, bulbes ou plants de pépinière. Les eaux de drainage (particulièrement aux Pays-Bas) et le vent qui emporte des poussières de terre figurent également au rang des « transporteurs » de spores de repos du *Polymyxa*. Enfin, la tare de terre qui colle aux betteraves est acheminée vers les sucreries, puis terre et déchets – verts et radicelles – retournent vers les exploitations agricoles. Il s'agit probablement là, compte tenu du volume de terre en jeu, de la source de contamination la plus importante [74], au niveau d'un bassin de production, liée à son industrie de transformation. La terre des betteraves rhizomaniées y est dispersée et diluée dans la terre non contaminée. Dès lors, une politique spéciale de gestion de la terre et des déchets a été mise en place dans la plupart des pays.
Notons enfin que les risques de transmission du virus de la rhizomanie par la semence sont très faibles [75].

Méthodes de lutte

Dans un premier temps, l'idée de la lutte contre la rhizomanie par l'emploi de méthodes culturales, chimiques ou biologiques a prévalu. Ce n'est que peu à peu, face à leur inefficacité et à l'extension croissante de la maladie, que la stratégie de la tolérance/résistance génétique de la betterave face au virus BNYVV a été progressivement mise en œuvre [76].

Méthodes culturales et chimiques

L'approche par les méthodes culturales s'est basée sur l'optimisation de l'irrigation, l'allongement des rotations, le semis précoce, le sous-solage, etc. ; elle n'a pas permis de réduire l'intensité de la maladie et, actuellement, plus aucune préconisation « d'hygiène culturale » contre la rhizomanie n'est proposée. Il s'agissait en l'occurrence de diminuer le potentiel infectieux (on ne disposait d'aucune méthode de mesure de son importance), soit en diminuant la quantité d'eau disponible pour le cycle du champignon, soit en tentant de donner une avance végétative à la betterave avant que le champignon ne se développe.
La technique de plantation par plants en pots de papier *paper-pots*, utilisée au Japon, s'est avérée trop coûteuse en Europe. De plus, la reprise des betteraves ainsi transplantées est trop liée aux aléas climatiques et nécessite, en particulier, une pluie dans la semaine qui suit la plantation.
La lutte fongicide a été préconisée dès l'apparition de cette maladie. Mais, en dehors de la fumigation du sol par le bromure de méthyle, méthode lourde, onéreuse et polluante, l'efficacité de nombreux produits connus pour leur action fongicide ou fongistatique s'est avérée particulièrement faible vis-à-vis de la rhizomanie [77, 78]. C'est pourquoi, en dehors de l'utilisation de variétés tolérantes/résistantes, la profession a préféré abandonner la culture de la betterave dans les zones fortement contaminées.

La lutte biologique

Elle a été tentée au moyen d'un champignon hyperparasite, *Trichoderma* sp., connu pour ses capacités antagonistes vis-à-vis d'autres champignons phytopathogènes. *T. harzianum* est capable de s'introduire dans les spores de repos de *P. betae* [79, 80]. Des essais préliminaires d'incorporation de *Trichoderma* sp. dans des sols naturellement infestés ou d'enrobage de graines de betterave avec du *Trichoderma* sp. ont montré une action beaucoup trop faible pour être réellement efficace.

Méthodes d'approche des résistances polygéniques

La première méthode utilisée s'est attachée à construire, au sein de plusieurs populations sources, des associations de gènes d'efficacité accrue par rapport au matériel de départ. Chaque population correspond à un mécanisme élémentaire de résistance partielle, repéré et sélectionné grâce à des tests particuliers. Les différentes composantes sont ensuite associées progressivement pour donner des géniteurs diversifiés, portant des résistances de haut niveau et peu susceptibles d'être contournées rapidement. La sélection en champ contaminé, menée à Erstein de 1978 à 1984 par Vuittenez [81] et ensuite par Merdinoglu et Valentin [82], a permis d'obtenir des génotypes de plus en plus résistants au virus de la rhizomanie. En effet, au fil des croisements, la quantité de virus mesurée par le test Elisa diminue, alors que le taux de sucre et le poids racinaire augmentent. Il existe même une très forte corrélation inverse entre la diminution de la quantité de virus, notamment au niveau du pivot et surtout du collet dans les betteraves rhizomaniées, et leur teneur finale en sucre [76, 83].
Il s'avère que la résistance partielle est liée à une différence de translocation du virus dans la plante et même de multiplication virale [76, 84], bien que la contamination ait toujours lieu. En l'absence d'une méthode simple de mesure de l'attaque des populations de betterave par *P. betae* et de la sensibilité générale de l'espèce *Beta vulgaris* à ce champignon, peu de programmes de sélection sont basés sur la résistance à *Polymyxa*. Des espèces sauvages *(Beta patellaris* et *B. procumbens)* sont connues pour être totalement résistantes, mais des croisements interspécifiques sont délicats à réaliser.
Il est apparu évident au laboratoire de pathologie végétale de Colmar que les moyens mis en œuvre par les sélectionneurs étaient nettement plus importants que ceux du laboratoire, malgré l'aide substantielle reçue dans le cadre d'un contrat GIE Betterave-Inra. La mission d'un laboratoire public étant de mettre à la disposition des sélectionneurs des outils de tri, des tests d'évaluation et des géniteurs de résistance, ce laboratoire s'est donc attaché à définir les conditions optimales d'infection homogène en serre d'un lot à tester et celles d'une méthode de tri (test Elisa).
Un système de culture de betteraves avec semis en septembre en serre chauffée, vernalisation en février-mars et plantation des planchons en tunnels de pollinisation, permet en une année un tri et un croisement de sélection pour une plante réputée bisannuelle. Cette accélération du processus permet de réduire de moitié le temps nécessaire à la création variétale pour la résistance à la rhizomanie *(photo 8)*.

Photo 8. Sélection sous serre, en sol contaminé, après une culture de deux mois : à gauche, variété sensible ; à droite, variété tolérante ayant produit un vrai pivot.

Photo 8. Breeding for disease resistance: beets after two months' growth on infected soils in the greenhouse; on the left: susceptible cultivar; on the right: partially-resistant cultivar with a well-formed taproot.

Photo 9. Vue d'une parcelle d'expérimentation (haplodiploïdisation) du programme « Résistance à la rhizomanie » au Centre Inra de Colmar.

Photo 9. Experimental (haplodiploidisation) plot of the programme for breeding rhizomania resistance in sugar beet at Inra Colmar, France.

Photo 10. Champ d'essai contaminé en Alsace (collaboration avec la sucrerie d'Erstein) : récolte d'une betterave de variété sensible et une d'une obtention de l'Inra Colmar.

Photo 10. Field experiment set up to test the new cultivars on a heavily infested soil near Erstein, France: comparison of a susceptible and a partially-resistant cultivar obtained by Inra Colmar, France.

Un généticien américain a fait état d'une variété de la firme Holly Sugar qui posséderait un gène dominant de résistance [85]. Cette variété a probablement servi comme géniteur dans l'amélioration du matériel européen, et plusieurs nouvelles variétés sont arrivées sur le marché avec un bon degré de résistance. Cependant, elles ne sont pas encore utilisées de façon systématique, alors que leurs semences ne coûtent pas plus cher. Les betteraviers estiment qu'en moyenne, en champ sain, les rendements de ces nouveaux génotypes sont inférieurs de 4 à 5 % aux meilleures variétés actuellement sur le marché. En champ contaminé, les nouvelles variétés résistantes présentent toujours de 5 à 10 % de betteraves rhizomaniées et les sucreries estiment qu'elles ont un rendement en jus sucré pur inférieur de 10 % par rapport à celui des variétés non résistantes. Il convient donc d'améliorer la qualité industrielle des variétés résistantes actuelles, car à l'avenir, devant l'avancée inexorable de la maladie au champ, la culture de variétés résistantes sera probablement le seul recours. Cependant, en l'absence de connaissances relatives à la vitesse de dissémination de la maladie, liée essentiellement aux retours d'eau et de terre des sucreries, aux techniques culturales et à la nature du sol, l'agriculteur préfère cultiver une variété sensible, estimant qu'il ne prend aucun risque jusqu'à une contamination pouvant atteindre 5 %.

Les spores de résistance nouvellement formées dans les racines de betteraves résistantes au BNYVV sont moins virulifères que celles formées dans les racines de plantes sensibles. Un degré élevé de résistance au BNYVV sera nécessaire pour réduire le potentiel infectieux du champ qui, seul, assurera le maintien de la résistance génétique.

Résistance totale

Une méthode consistant à transférer les associations de gènes efficaces dans un matériel agronomiquement performant permettrait de ne perdre aucun facteur essentiel au cours des générations successives de rétrocroisements.

Le recensement des sources de résistance à la rhizomanie a été effectué. Il a fait apparaître une résistance totale chez certains écotypes de *Beta maritima* et des résistances partielles très variables dans l'espèce *Beta vulgaris* [76]. Il faudrait donc tenter, par croisement, d'obtenir une résistance par interaction complexe entre les différentes sources de résistance. La complémentarité des gènes impliqués permet d'envisager la création de résistance à spectre d'action élargi, ouvrant ainsi des voies pour la sélection. Les croisements entrepris montrent que, par cette voie, des hybrides résistants peuvent être produits *(photos 9 et 10)* ; un programme plus large d'hybridations suivis de rétrocroisements est en cours et devrait permettre la compréhension des mécanismes de résistance.

Le marquage moléculaire du matériel génétique par la technique RFLP ou RAPD est l'outil choisi pour repérer les segments chromosomiques impliqués dans les propriétés de résistance génétique [86, 87].

L'émergence de souches « agressives » du virus de la rhizomanie sur les variétés partiellement résistantes constitue une menace, d'autant plus que ces variétés restent fragiles en présence de fortes doses d'inoculum. Ce risque, augmenté par les échanges internationaux, est lié à la variabilité de l'aptitude pathogène, de la transmissibilité et des propriétés antigéniques de souches de BNYVV ; il incite à la poursuite de la caractérisation des isolats au niveau moléculaire.

Transformation génétique de la betterave pour la résistance à la rhizomanie

Une autre voie d'approche menée par plusieurs laboratoires européens a permis d'obtenir dès 1991 des betteraves transgéniques exprimant soit la protéine de capside du BNYVV [88] soit un ARN antisens complémentaire du gène codant pour cette protéine. Ces méthodes de lutte par transgénose n'ont pas encore donné de résultats exploitables. Ceci explique pourquoi le moyen de lutte le plus efficace et le plus répandu actuellement est encore l'amélioration génétique par croisements classiques de la betterave pour la résistance à la rhizomanie.

Plusieurs laboratoires européens ont tenté avec succès de transposer à la betterave la stratégie « capside » appliquée à d'autres modèles plantes/virus, en introduisant dans le génome de la betterave le gène viral codant pour la capside et en le faisant s'exprimer dans la plante. L'expression de la protéine capsidaire confère un taux parfois élevé de protection contre l'infection virale. Dans le cas de la rhizomanie, où la plupart des isolats ont de fortes parentés sérologiques, cette stratégie paraît particulièrement adaptée. Dans un premier temps, la protéine capsidaire du BNYVV a été exprimée dans des cellules de betteraves en suspension. La capacité du BNYVV à infecter des protoplastes isolés de cellules n'exprimant pas la protéine capsidaire a été comparée à celle des protoplastes transformés ; les résultats intéressants obtenus ont conduit à la mise en œuvre de betteraves transgéniques.

Conclusion

La rhizomanie de la betterave a connu un développement très rapide. Inconnue pratiquement jusqu'en 1983, sauf en Italie, Allemagne, France et Japon, elle s'est révélée être présente dans toutes les zones betteravières du monde et devenir le fléau n° 1 de cette culture.

Le progrès des connaissances concernant le virus BNYVV a été exceptionnel. Inconnue il y a vingt ans, son organisation moléculaire est pratiquement élucidée au nucléotide près ; seules les fonctions exactes de quelques gènes restent à préciser. Il en va bien différemment de l'étude du champignon *Polymyxa* qui vit dans la rhizosphère, véritable « boîte noire » dont peu de paramètres sont connus. Ce champignon, parasite obligatoire, est d'une étude difficile, ce qui explique que nos connaissances sur la transmission du virus et sur les interactions plante-champignon restent fragmentaires.

Au niveau de la lutte contre la rhizomanie, on peut affirmer que les progrès en sélection pour la tolérance/résistance ont permis de préserver la culture de la betterave dans les régions touchées par la maladie. Dans quelques années, toutes les variétés commercialisées seront résistantes à la rhizomanie. Les progrès de la génétique ainsi que l'amélioration des techniques culturales ont permis de passer en vingt ans de 5 à 10 tonnes de sucre blanc par hectare de betterave, un record de production atteint dès 1993.

Le niveau actuel de résistance des variétés de betterave est cependant insuffisant pour permettre une décroissance significative de l'inoculum dans les sols durant la période de végétation. La prochaine génération de lignées résistantes, en préparation chez les sélectionneurs, possédera des niveaux de résistance bien plus élevés et sera sous contrôle génétique plus simple. Des recherches fondamentales sont nécessaires pour estimer la stabilité des résistances en jeu ; en attendant, on ne peut qu'espérer que ces nouvelles variétés seront plus résistantes à de nouvelles souches virales que celles d'orge d'hiver face à de nouvelles souches du virus de la mosaïque jaune de l'orge. Les chercheurs orientent leurs travaux vers l'identification de souches de virus qui seraient capables de contourner la résistance variétale, vers l'étude des mécanismes de la vection et, surtout, s'attachent à la construction d'une carte génétique de la betterave en collaboration avec des sélectionneurs privés.

Cette carte devrait permettre de procéder beaucoup plus rationnellement au choix des géniteurs lors des croisements. Elle sera particulièrement utile pour les travaux de sélection à la résistance pour une maladie qui s'annonce aussi grave que l'était la rhizomanie il y a vingt ans : la pourriture de la betterave au champ, due à un champignon du sol, le rhizoctone brun : *Rhizoctonia solani* ■

Remerciements

Les auteurs souhaitent remercier M. Vuittenez pour avoir lancé l'étude de la rhizomanie en France, M. et Mme Kuszala et M. Stocky pour leur aide au laboratoire, ainsi que l'équipe du Service agronomique de la sucrerie d'Erstein : MM. Mehl, Schneider et Lang, dirigée par M. Philippe Gross pour leur précieux soutien, notamment pour l'expérimentation variétale.

Références

1. Putz C, Vuittenez A. Observations de particules virales chez des betteraves atteintes d'une maladie semblable à la rhizomanie en Alsace. *Ann Phytopathol* 1974 ; 6 : 129-38.

2. Asher MJC. Rhizomania in England: an account of the first recorded outbreak. *Br Sugar Beet Rev* 1987 ; 55 : 4-7.

3. Tamada T, Baba T, Abe H. A virus isolated from sugar beet showing "rizomania" like symptoms and its transmission in soil. *Bull Sugar Beet Research Suppl* 1971 ; 13 : 179-86.

4. Duffus JE, Whitney RC, Larsen RC, Lin HY, Lewellen RT. First report in the western hemisphere of rhizomania of sugar beet caused by beet necrotic yellow vein virus. *Pl Dis* 1984 ; 68 : 251.

5. Gao JL, Deng F, Zhai HQ, Ling XS, Liu HY. The occurrence of beet necrotic yellow vein virus in China. *Acta Phytopathol Sin* 1983 ; 13 : 1-4.

6. Keskin B. *Polymyxa betae* n. sp, ein Parasit in den Wurzeln von *Beta vulgaris* Tournefort, besonders während der Jugendentwicklung der Zuckerrübe. *Arch Mikrobiol* 1964 ; 49 : 348-74.

7. Canova A. Ricerche virologische nella rizomania della bietola. *Ann Acad Agric Bologna* 1966 ; 78 : 37-46.

8. Tamada T, Baba T. Beet necrotic yellow vein virus from rizomania-affected sugar beet in Japan. *Ann Phytopathol Soc Jpn* 1973 ; 39 : 325-32.

9. Tamada T. Beet necrotic yellow vein virus. CMI/AAB Descript. *Plant Viruses* 1975 ; 144.

10. Fujisawa I, Sugimoto T. Transmission of beet necrotic yellow vein virus by *Polymyxa betae. Ann Phytopathol Soc Jpn* 1977 ; 43 : 583-6.

11. Anonyme ITB. Variétés tolérantes à la rhizomanie. *Le Bett Franç* 1993 ; 628 : 27.

12. Wieninger L, Roessner G. Zum Verhalten rizomania-geschädigter Rüben in der Saftreinigung. *Zuckerindustrie* 1983 ; 108 : 758-60.

13. Heïjbroek W. The development of rhizomania in two areas of the Netherlands and its effect on sugar beet growth and quality. *Neth J Pl Path* 1989 ; 95 : 27-35.

14. Putz C, Richard-Molard M. Connaissances actuelles concernant la rhizomanie.*CR 1er Coll Internat Virol Inra Colmar* 1984 : 5-12.

15. Putz C, Merdinoglu D, Lemaire O, Stocky G, Valentin P, Wiedemann S. Beet necrotic yellow vein virus, causal agent of sugar beet rhizomania. *Rev Plant Pathol* 1990 ; 69 : 247-54.

16. Legin R, Vuittenez A, Putz C, Spindler C. Étude de la contagion naturelle de la rhizomanie de la betterave en Alsace : évaluation de la nature et de l'importance des dégâts au champ, par culture en terrain fortement infesté ou assaini par traitements fumigants. 12e Coll SFP, *Ann Phytopathol* 1977 ; 9 : 97-8.

17. Putz C, Kuszala Maria. La rhizomanie de la betterave sucrière en Alsace. Recherche d'une nouvelle méthode de purification du *Beet Necrotic Yellow Vein Virus. Ann Phytopathol* 1978 ; 10 : 247-62.

18. Stocky G, Vuittenez A, Putz C. Mise en évidence *in situ* de particules en bâtonnets, correspondant probablement au virus de la rhizomanie, dans les tissus de diverses chénopodiacées inoculées expérimentalement, ainsi que dans le champignon *Polymyxa betae* K., myxomycète parasitant les racines de plantes malades. 11e Coll SFP. *Ann Phytopathol* 1977 ; 9 : 536-7.

19. Putz C. *Étude du virus des nervures jaunes et nécrotiques de la betterave* (Beet Necrotic Yellow Vein Virus), *agent de la rhizomanie.* Thèse de doctorat d'État es Sciences, 10 février 1981, Université Louis Pasteur Strasbourg, 250 p.

20. Kuszala M, Ziegler V, Bouzoubaa S, Richards K, Putz C, Guilley H, Jonard G. Beet necrotic yellow vein virus : different isolates are serologicaly similar but differ in RNA composition. *Ann Appl Biol* 1986 ; 109 : 155-62.

21. Putz C, Vuittenez A. The intracellular location of beet necrotic yellow vein virus. *J Gen Virol* 1980 ; 50 : 201-4.

22. Giunchedi L, Langenberg WG, Marani F. Appearance of beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in host cells. *Phytopath Medit* 1981 ; 20 : 112-6.

23. Clark MF, Adams AN. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J Gen Virol* 1977 ; 34 : 475-83.

24. Putz C, Kuszala M, Valentin P. Identification methods of beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) and related viruses in beets. *CR 48e Congrès d'hiver IIRB Bruxelles* 1985 : 391-6.

25. Heberle-Bors E, Merten OW, Himmler G, Reiter S, Messner P. Monoclonal antibodies for ELISA of BNYV (rhizomania) virus in sugar beet *(Beta vulgaris). CR 1er Coll intern IIRB Inra* 1984 : 111-23.

26. Torrance L, Pead MT, Buxton G. Production and some characteristics of monoclonal antibodies against beet necrotic yellow vein virus. *Ann Appl Biol* 1988 ; 113 : 519-30.

27. Grassi G, Cerato C, Benso P, Borgatti S. Monoclonal and conventional antibodies for the detection of beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in sugar beet. *Phytopath Medit* 1988 ; 27 : 125-32.

28. Commandeur U, Koenig R, Manteuffel R, Torrance L, Lüddecke P, Francks R. Location size and complexity of epitopes on the coat protein of beet necrotic yellow vein virus studied by means of synthetic overlapping peptides. *Virology* 1994 ; 198 : 282-7.

29. Sakamoto H, Lemaire O, Merdinoglu D, Guesdon JL. Comparison of dot blot hybridization using ^{32}P labelled or acetoxyaminofluorene labelled cDNA probes and Enzyme-linked Immunosorbent Assay (Elisa) for detecting beet necrotic yellow vein virus. *Molec Cell Probes* 1989 ; 3 : 159-66.

30. Lemaire O, Merdinoglu D, Wiedemann S, Putz C. Utilisation de réactifs immunochimiques et de sondes moléculaires pour l'identification du virus de la rhizomanie de la betterave et de son vecteur. Colloque Biotechnica. *Les réactifs pour la détection des agents phytopathogènes.* Bordeaux 1989 [résumé] : 10 p.

31. Putz C, Kuszala M, Kuszala J, Burckard J, Van Regenmortel M . Présence du virus de la mosaïque du tabac dans les betteraves sucrières atteintes de rhizomanie. Détection par la méthode immunoenzymatique Elisa. *Agronomie* 1981 ; 1: 49-52.

32. Ivanovic M, Macfarlane I. A tubular virus associated with infection of sugar beet by *Polymyxa betae* K. *Rothamst Exp Stat* 1981 : 190-1.

33. Henry CM, Jones RAC, Coutts RHA. Occurence of a soil-borne virus of sugar beet in England. *Plant Pathol* 1986 ; 35 : 585-91.

34. Schlösser E. Rizomania XII. Effect of BNYVV and BSBV on the development of *Polymyxa betae* Keskin. *Med Fac Landbouww Rijksuniv Gent* 1990 : 1065-71.

35. Kaufmann A, Koenig R, Rohloff H. Influence of beet soilborne virus on mechanically inoculated sugarbeet. *Plant Pathol* 1993 ; 42 : 413-7.

36. Heidel GB, Rush CM. Distribution of beet necrotic yellow vein virus, beet distortion mosaic virus, and an unnamed soil-borne sugar beet virus in Texas and New Mexico. *Plant Disease* 1994 ; 78 : 603-6.

37. Wisler GC, Liu HY, Duffus JE. Beet necrotic yellow vein virus and its relationship to eight sugar beet furo-like viruses from the United States. *Plant Disease* 1994 ; 78 : 995-1001.

38. Lemaire O. *Contribution à l'étude des propriétés biologiques des ARN du virus de la rhizomanie* (beet necrotic yellow vein virus) *et de leur rôle dans l'étiologie de la maladie.* Thèse de doctorat de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg 1988 ; 131 p.

39. Putz C. Composition and structure of beet necrotic yellow vein virus. *J Gen Virol* 1977 ; 35 : 397-401.

40. Putz C, Pinck M, Fritsch C, Pinck L. Identification of the 3' - and 5' - ends of beet necrotic yellow vein virus RNAs. *FEBS Lett* 1983 ; 156 : 41-6.

41. Richards K, Jonard G, Guilley H, Ziegler V, Putz C. *In vitro* translation of beet necrotic yellow vein virus RNAs and studies of sequence homology among the RNA species using cloned cDNA probes. *J Gen Virol* 1985 ; 66 : 345-50.

42. Bouzoubaa S, Guilley H, Jonard G, Richards K, Putz C. Nucleotide sequence analysis of RNA-3 and -4 of beet necrotic yellow vein virus, isolates F2 and G1. *J Gen Virol* 1985 ; 66 : 1553-64.

43. Bouzoubaa S, Ziegler V, Beck D, Guilley H, Richards K, Jonard G. Nucleotide sequence of beet necrotic yellow vein virus RNA-2. *J Gen Virol* 1986 ; 67 : 1689-700.

44. Bouzoubaa S, Quillet L, Guilley H, Jonard G, Richards K. Nucleotide sequence of beet necrotic yellow vein virus RNA-1. *Virology* 1987 ; 68 : 615-26.

45. Quillet L, Guilley H, Jonard G, Richards K. *In vitro* synthesis of biologically active beet necrotic yellow vein virus RNA. *Virology* 1989 ; 172 : 293-301.

46. Niesbach-Klösgen U, Guilley H, Jonard G, Richards K. Immunodetection *in vivo* of beet necrotic yellow vein virus-encoded proteins. *Virology* 1990 ; 178 : 52-61.

47. Ziegler V, Richards K, Guilley H, Jonard G, Putz C. Cell-free translation of beet necrotic yellow vein virus : readthrough of the coat protein cistron. *J Gen Virol* 1985 ; 66 : 2079-87.

48. Schmitt C, Balmori E, Jonard G, Richards K, Guilley H. *In vitro* mutagenesis of biologically active transcripts of beet necrotic yellow vein virus RNA 2: evidence that a domain of the 54-kDa readthrough protein is important for efficient virus assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 5715-9.

49. Haeberlé AM, Stussi-Garaud C, Schmitt C, Garaud JC, Richards KE, Guilley H, Jonard G. Detection by immunogold labelling of P 75 readthrough protein near an extremity of beet necrotic yellow vein virus particles. *Arch Virol* 1994 : 195-203.

50. Tamada T, Kusume T. Evidence that the 75K readthrough protein of beet necrotic yellow vein virus RNA-2 is essential for transmission by the fungus *Polymyxa betae. J Gen Virol* 1991 ; 72 : 1497-504.

51. Gilmer D, Bouzoubaa S, Hehn A, Guilley H, Richards K, Jonard G. Efficient cell-to-cell movement of beet necrotic yellow vein virus requires 3' proximal genes located on RNA 2. *Virology* 1992 ; 189 : 40-7.

52. Koenig R, Burgermeister W, Weich H, Sebald N, Kothe C. Uniform patterns of beet necrotic yellow vein virus in sugar beet roots, but not in leaves from several plant species. *J Gen Virol* 1986 ; 67 : 2043-6.

53. Koenig R, Burgermeister W. Mechanical inoculation of sugarbeet roots with isolates of beet necrotic yellow vein virus having different RNA compositions. *J Phytopathol* 1989 ; 124 : 249-55.

54. Jupin I. *Contribution à l'identification des séquences virales impliquées dans la pathogénicité du virus des nervures jaunes et nécrotiques de la betterave (BNYVV) : apport de la transcription* in vitro *et de la mutagenèse dirigée.* Thèse de Docteur de l'Université Louis Pasteur 1990 ; 310 p.

55. Lemaire O, Merdinoglu D, Valentin P, Putz C, Ziegler-Graff V, Guilley H, Jonard G, Richards K. Effect of beet necrotic yellow vein virus composition on transmission by *Polymyxa betae* (Kesk.). *Virology* 1988 ; 162 : 232-5.

56. Tamada T, Abe H. Evidence that beet necrotic yellow vein virus RNA 4 is essential for efficient transmission by the fungus *Polymyxa betae. J Gen Virol* 1989 ; 70 : 3391-8.

57. Kruse M, Koenig R, Hoffmann A, Kaufmann A, Commandeur U, Solovyev AG, Savenko I, Burgermeister W. Restriction fragment length polymorphism analysis of reverse transcription-PCR products reveals the existence of two major strain groups of beet necrotic yellow vein virus. *J Gen Virol* 1994 ; 75 : 1835-42.

58. Burgermeister W, Koenig R, Weich H, Sebald W, Lesemann DE. Diversity of the RNAs in thirteen isolates of beet necrotic yellow vein virus in *Chenopodium quinoa* detected by means of cloned cDNA. *Phytopathol* 1986 ; 115 : 229-42.

59. Tamada T, Shirako Y, Abe H, Saito M, Kiguchi T, Harada T. Production and pathogenicity of isolates of BNYVV with different numbers of RNA components. *J Gen Virol* 1989 ; 70 : 3399-409.

60. Shirako Y, Brakke MK. Two purified RNAs of soil-borne wheat mosaic virus are needed for infection. *J Gen Virol* 1984 ; 65 : 119-27.

61. Brunt AA, Richards KE. Biology and molecular organization of furoviruses. *Adv Virus Research* 1988 ; 36 : 1-32.

62. Keskin B. *Polymyxa betae* (Plasmodiophoraceae) Vegetative Vermehrung in Wurzelhaar der Zuckerrübe. *Encyclopaedia Cinematographica, Ed Wolf G* 1967 : 1-8.

63. Keskin B, Fuchs W.H. Der Infektionsvorgang bei *Polymyxa betae. Arch Mikrobiol* 1969 ; 68 : 218-26.

64. Abe H, Tamada T. Association of beet necrotic yellow vein virus with isolates of *Polyymxa betae* Keskin. *Ann Phytopath Soc Jpn* 1986 ; 52 : 235-47.

65. Blunt SJ, Asher MJC, Gilligan CA. Infection of sugar beet by *Polymyxa betae* in relation to soil temperature. *Plant Pathol* 1991 ; 40 : 257-67.

66. Barr KJ, Asher MJC. The host range of *Polymyxa betae* K in Britain. *Plant Pathol* 1992 ; 41 : 64-8.

67. Ward E, Adams MJ, Mutasa S, Collier CR, Asher MJC. Characterization of *Polymyxa* species by restriction analysis of PCR-amplified ribosomal DNA. *Plant Pathol* 1994 ; 43 : 872-7.

68. Mutasa ES, Ward E, Adams MJ, Collier CR, Chwarszczynska DM, Asher MJC. A sensitive DNA probe for the detection of *Polymyxa betae* in sugar-beet roots. *Plant Pathol* 1993 ; 43 : 379-90.

69. Rysanek P, Stocky G, Haeberlé AM, Putz C. Study on sugar beet rhizomania: immunogold labelling of beet necrotic yellow vein virus particles inside its fungal vector, *Polymyxa betae* K. *Agronomie* 1992 ; 12 : 651-9.

70. Kastirr V, Pfeilstetter E, Burgermeister N. Virus content and virulence of *Polymyxa betae* Keskin isolates obtained from different regions in europe. *J Phytopathol* 1994 ; 141 : 369-74.

71. Gerik JS, Duffus JE. Differences in vectoring ability and aggressiveness of isolates of *Polymyxa betae. Phytopathol* 1988 ; 78 : 1340-3.

72. Tuitert G, Hofmeester Y. Epidemiology of beet necrotic yellow vein virus in sugar beet at different initial inoculum levels in the presence or absence of irrigation : disease incidence, yield and quality. *Eur J Plant Pathol* 1994 ; 100 : 19-53.

73. Tuitert G. *Epidemiology of rhizomania desease of sugar beet.* PhD Thesis. Wageningen Agricultural University, Netherlands 1994 ; 168 p.

74. Arnold M, Kuszala M, Valentin P, Putz C. Traitements des effluents de sucreries contre la rhizomanie.*CR 1er Coll Internat Virol IIRB Inra Colmar* 1984 : 45-52.

75. Merdinoglu D, Valentin P, Lemaire O, Putz C. La rhizomanie de la betterave est-elle transmissible par la semence ? *CR Acad Agric* 1987 ; 73 : 117-26.

76. Merdinoglu D. *Contribution à l'amélioration génétique de la betterave sucrière* (Beta vulgaris) *pour la résistance à la rhizomanie.* Thèse de Docteur. Université Paris Sud 1990 ; 124 p.

77. Schaüfele WR. Versuche zur chemischen Bekämpfung von *Polymyxa betae. CR 50e Congrès d'Hiver IIRB, Bruxelles* 1987 : 97-110.

78. Allaham AW, Stocky G. *Contribution à l'étude de la contagion naturelle de la rhizomanie de la betterave : acquisition, transmission et conservation du virus des nervures jaunes et nécrotiques de la betterave par le champignon* Polymyxa betae *K (Plasmodiophoromycetae).* Thèse de doctorat d'Université Paris VI 1983 ; 158 p.

79. D'Ambra V, Mutto S. Parasitismo di *Trichoderma harzianum* su cistosori di *Polymyxa betae. J Phytopathol* 1986 ; 115 : 61-72.

80. Camporota P, Bordei V, Richard-Molard M. Lutte biologique contre *Polymyxa betae* (Keskin) au moyen de *Trichoderma* sp. Résultats préliminaires *in vivo. Agronomie* 1988 ; 8 : 223-5.

81. Vuittenez A. Une nouvelle virose de la betterave en France : la rhizomanie. Premiers résultats de 6 années de recherche à la Station de Pathologie végétale Inra de Colmar.*CR Acad Agric Fr* 1980 ; 66 : 376-90.

82. Merdinoglu D, Valentin P, Geyl L, Merdinoglu-Wiedemann S, Lemaire O, Putz C. Amélioration génétique de la betterave pour la résistance à la rhizomanie. *CR Acad Agric Fr* 1993 ; 79 : 85-98.

83. Giunchedi L, Poggi-Pollini C. Immunogold-silver localization of beet necrotic yellow vein virus antigen in susceptible and moderately resistant sugar beets. *Phytopath Medit* 1989 ; 28 : 1-6.

84. Giunchedi L, De Biaggi M, Poggi Pollini C. Correlation between tolerance and beet necrotic yellow vein virus in sugar-beet genotypes (1). *Phytopathol Medit* 1987 ; 26 : 23-8.

85. Lewellen RT, Skoyen IO, Erichsen AW. Breeding sugarbeet for resistance to rhizomania : evaluation of host-plant reactions and selection for and inheritance of resistance. *CR 50e Congrès d'hiver IIRB, Bruxelles* 1987 : 139-56.

86. Pelsy F, Butterlin G, Merdinoglu D. Marquage moléculaire d'un gène majeur de résistance au *beet necrotic yellow vein virus. CR 58e Congrès IIRB, Beaune* 1995 (sous presse).

87. Merdinoglu D, Pelsy F, Butterlin G, Soreau P. Recherche de marqueurs génétiques de caractères d'intérêt agronomique par RAPD chez la betterave.*CR 58e Congrès IIRB, Beaune* 1995 (sous presse).

88. Perez P, Gerentes D, Kallerhoff J, Hosemans D, Ben Tahar S, Perret S. Biotechnologies et rhizomanie. *CR 53eCongrès d'hiver IIRB, Bruxelles* 1990 : 47-52.

Résumé

Apparue il y a vingt-deux ans en France, la rhizomanie de la betterave, maladie à virus transmis par un champignon du sol, est devenue en peu de temps le fléau n°1 de la culture de betterave dans tous les pays producteurs du monde. Un effort de recherche considérable s'est alors déployé sur la caractérisation précise de l'agent pathogène (le virus appelé *beet necrotic yellow vein virus* et son vecteur *Polymyxa betae* Keskin), ce qui a permis de mettre au point des tests de diagnostic très fiables. L'accent s'est également porté sur les méthodes de lutte.

Cet article présente une synthèse des principaux résultats obtenus dans la connaissance de la maladie, de son agent infectieux et de son vecteur.

L'apparition, dès 1986, d'une variété Rizor partiellement tolérante a constitué le premier remède efficace contre la maladie et a confirmé l'espoir mis dans l'amélioration génétique de la betterave pour la résistance. Actuellement, la création de variétés résistantes passe par la transgénose ou utilise, dans des croisements, la résistance totale d'espèces sauvages du genre *Beta* au virus de la rhizomanie ou à son champignon vecteur. Dans le cadre de la lutte génétique contre la rhizomanie, une approche plus fondamentale des mécanismes de résistance mis en jeu ainsi que la constitution d'une carte génétique de la betterave vont permettre de mieux gérer les croisements à entreprendre et l'analyse de leur descendance.