



Épidémiologie moléculaire, diversité génétique et phylogéographie des begomovirus responsables de la maladie de la mosaïque du manioc à Madagascar

Mireille Harimalala

► To cite this version:

Mireille Harimalala. Épidémiologie moléculaire, diversité génétique et phylogéographie des begomovirus responsables de la maladie de la mosaïque du manioc à Madagascar. Sciences agricoles. Université de la Réunion; Université d'Antananarivo. Département de biologie et écologie végétales, 2012. Français. NNT : 2012LARE0027 . tel-04150519

HAL Id: tel-04150519

<https://theses.hal.science/tel-04150519>

Submitted on 4 Jul 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE LA REUNION

**Ecole Doctorales des Sciences, Technologies et Santé E.D. n°542
UMR Peuplements Végétaux et Bio-agresseurs en Milieu Tropical
CIRAD – Université de La Réunion**

UNIVERSITE D'ANTANANARIVO

**Faculté des Sciences
Département de Biologie et Ecologie Végétales**

Thèse en cotutelle pour l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences

**EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE, DIVERSITE
GENETIQUE ET PHYLOGEOGRAPHIE DES
BEGOMOVIRUS RESPONSABLES DE LA MALADIE DE LA
MOSAIQUE DU MANIOC A MADAGASCAR**

Par

Mireille HARIMALALA

Soutenance le 13 Décembre 2012, devant le jury composé de

Stéphane POUSSIER, Professeur, Université de La Réunion, France

Claude FAUQUET, Chercheur HDR, ILTAB, USA

Oumar TRAORE, Chercheur HDR, INERA, Burkina Faso

Bernard REYNAUD, Chercheur HDR, CIRAD Réunion, France

Alice ANDRIANJAKA, Professeur, Université d'Antananarivo, Madagascar

Jean-Michel LETT, Chercheur, CIRAD Réunion, France

Président

Rapporteur

Rapporteur

Co-directeur de thèse

Co-directrice de thèse

Examineur

UNIVERSITE DE LA REUNION

**Ecole Doctorales des Sciences, Technologies et Santé E.D. n°542
UMR Peuplements Végétaux et Bio-agresseurs en Milieu Tropical
CIRAD – Université de La Réunion**

UNIVERSITE D'ANTANANARIVO

**Faculté des Sciences
Département de Biologie et Ecologie Végétales**

Thèse en cotutelle pour l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences

**EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE, DIVERSITE
GENETIQUE ET PHYLOGEOGRAPHIE DES
BEGOMOVIRUS RESPONSABLES DE LA MALADIE DE LA
MOSAIQUE DU MANIOC A MADAGASCAR**

Par

Mireille HARIMALALA

Soutenance le 13 Décembre 2012, devant le jury composé de

Stéphane POUSSIER, Professeur, Université de La Réunion, France

Claude FAUQUET, Chercheur HDR, ILTAB, USA

Oumar TRAORE, Chercheur HDR, INERA, Burkina Faso

Bernard REYNAUD, Chercheur HDR, CIRAD Réunion, France

Alice ANDRIANJAKA, Professeur, Université d'Antananarivo, Madagascar

Jean-Michel LETT, Chercheur, CIRAD Réunion, France

Président

Rapporteur

Rapporteur

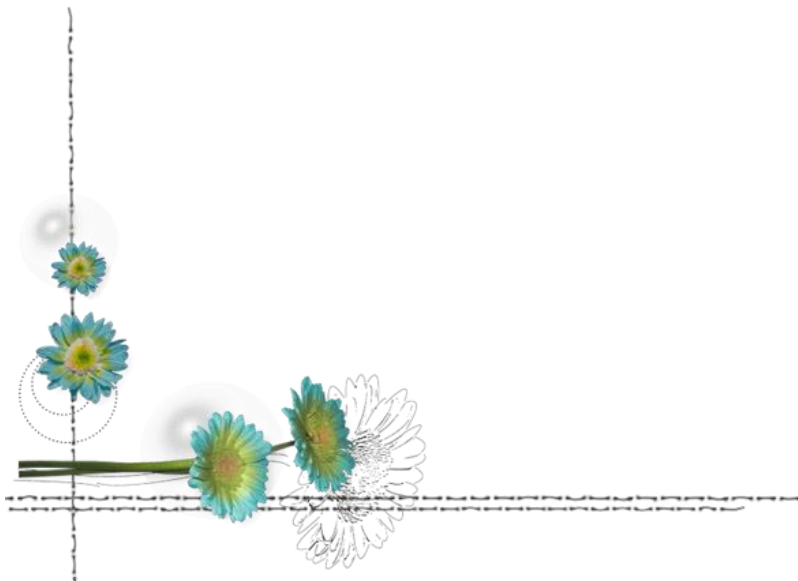
Co-directeur de thèse

Co-directrice de thèse

Examineur

A toute ma famille pour les soutiens et encouragements,

A mon mari, merci pour ta gentillesse, tes encouragements et ton amour.



REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a pu être réalisé grâce à la collaboration entre le CIRAD, UMR PVBM – Université de la Réunion et le Département de Biologie et Ecologie Végétale (DBEV) de l'Université d'Antananarivo. Je remercie les institution/partenaires notamment le CIRAD, l'Union Européenne (FEDER) et La Région Réunion pour leur contribution à la réalisation de ce travail.

Faire une thèse demande beaucoup d'investissements et de travail mais cela aura été une expérience très enrichissante. J'ai pu bénéficier d'un excellent encadrement et de bon entourage, et je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

J'adresse mes vifs remerciements aux

Pr Stéphane Poussier qui a bien accepté de présider les jury de ma thèse malgré ses occupations.

Dr Bernard Reynaud de m'avoir accueilli au sein de son unité, d'avoir toujours assuré la bonne marche de ce travail et d'avoir bien voulu être co-directeur de ma thèse.

Pr Alice Andrianjaka qui m'a initié à la recherche et au travail au labo ; merci pour les aides dans les démarches administratifs et aussi, merci d'avoir accepté de codiriger cette thèse.

Dr Claude Fauquet, qui avec ses nombreuses occupations a gentiment accepté d'être le rapporteur de cette thèse. Merci pour les précieux conseils et la forte participation pendant les comités de thèse.

Dr Oumar Traoré qui a bien accepté d'examiner ce manuscrit. C'est un grand plaisir de faire votre connaissance.

Pr Sahondramalala Ranomenjanahary qui m'a enseigné la pathologie végétale. Ca a été un plaisir de travailler avec toi et on aura sûrement l'occasion de retravailler ensemble.

Je tiens à remercier les personnes qui m'ont aidé au quotidien durant ces trois années de thèse. Je vous adresse mes profondes reconnaissances.

à Jean-Michel de m'avoir gentiment accueilli dans son équipe. J'ai apprécié travailler avec toi. J'admire la rigueur et la patience. Un grand merci pour tout !

Un grand merci également à Pierre. Ca a été un plaisir de travailler avec toi ; j'ai appris que de bonnes choses durant ces années, la précision, la rigueur,Merci pour ton aide dans les analyses de données.

On n'aurait pas pu s'en sortir sans Fred (Chiroleu). Merci beaucoup pour la bonne humeur et ton aide dans les analyses statistiques. Merci à Charlotte également !

Merci à Murielle Hoareau pour son assistance pendant les travaux au labo, merci aux autres techniciens pour les petits conseils pratiques, merci à Julie aussi !

Mes remerciements à Nathalie Becker, à Hélène Delatte, à Fred Pérrefares, à Innocent Zinga et à Jacques Dintinger. Merci à grand frère Fidèle pour ses précieux conseils et les encouragements durant ces derniers mois. Je remercie également Jerry de son aide et de son amitié.

J'exprime ma gratitude à l'égard des responsables administratifs au sein de l'Université de La Réunion, du 3P, du DBEV et du FOFIFA pour leur précieuse aide.

J'ai pu faire connaissance avec de nombreux collègues malgaches durant les missions d'échantillonnage. J'ai appris beaucoup de leurs expériences. Je remercie notamment Augustin, Hervé et Second pour leur forte participation et leur efficacité sur terrain.

Ca y est presque pour Alex, Nanou, Aline, Henriette et les autres thésard(es). Bon courage à vous tous !

Bon courage également à mes collègues malgaches du DBEV : à Johny, Lydia, Belto et les autres thésards de la promotion.

Sommaire

1. Introduction.....	1
-----------------------------	----------

2. Chapitre I	5
----------------------------	----------

Synthèse bibliographique

3. Chapitre II	29
-----------------------------	-----------

Epidémiologie moléculaire de la maladie de la mosaïque du manioc à Madagascar

Article 1 : Harimalala M., Chiroleu F., Giraud-Carrier C., Hoareau M., Andriamampianina A., Velombola S., Ranomenjanahary S., Andrianjaka A., Reynaud B., Lefeuvre P. and Lett J.M. (En préparation). Molecular epidemiology of cassava mosaic disease in Madagascar.

4. Chapitre III	42
------------------------------	-----------

Caractérisation moléculaire et analyses phylogénétiques de nouvelles espèces de bégomovirus et d'alphasatellite associées à la maladie de la mosaïque du manioc à Madagascar

Article 2 : Harimalala M., Lefeuvre P., De Bruyn A., Tiendrébéogo F., Hoareau M., Villemot J., Ranomenjanahary S., Andrianjaka A., Reynaud B. and Lett J.M. (2012). A novel cassava-infecting begomovirus from Madagascar: cassava mosaic Madagascar virus. Archives of Virology 157: 2027-2030.

Article 3 : Harimalala M., De Bruyn A., Hoareau M., Andrianjaka A., Ranomenjanahary S., Reynaud B., Lefeuvre P. and Lett J.M. (Soumis à Archives of Virology). Molecular characterization of a new alphasatellite associated with a cassava mosaic geminivirus in Madagascar.

5. Chapitre IV	54
-----------------------------	-----------

Les bégomovirus du manioc à Madagascar : diversité et facteurs associés à la dispersion

Article 4 : Harimalala M., De Bruyn A., Hoareau M., Ranomenjanahary S., Andrianjaka A., Reynaud B., Lefeuvre P. and Lett J.M. (En preparation). Genetic diversity and phylogeography of cassava mosaic begomoviruses in Madagascar.

6. Discussion générale.....	66
------------------------------------	-----------

7. Références bibliographiques	76
---	-----------

8. Annexes	88
-------------------------	-----------

Matériels supplémentaires des différents articles.

Introduction

INTRODUCTION

A l'aube du 21^{ème} siècle, la principale préoccupation de l'agriculture mondiale reste sa capacité à nourrir des populations de plus en plus nombreuses. En effet, plus de 900 millions de personnes sont sous-alimentées, la majorité de ceux-ci vivant en Afrique sub-saharienne, en Asie et dans le Pacifique (FAO, 2010). Afin de répondre à la demande croissante en denrées alimentaires, il est nécessaire d'améliorer le potentiel de production et d'assurer la qualité et la quantité des produits. Les échanges de matériels biologiques ainsi que le développement de systèmes de culture à haut rendement ont été adoptés pour faire face à cette situation. Ces pratiques ont apporté de nombreuses innovations et ont permis d'augmenter considérablement la production. Toutefois, ces changements ont aussi eu des effets négatifs sur l'équilibre des systèmes agro-écologiques.

De nombreux organismes nuisibles comme les ravageurs, les micro-organismes et les virus ont émergés sur les plantes cultivées d'importance agronomique et économique. L'émergence virale sur les cultures de subsistance a causé et continue à engendrer des dégâts importants particulièrement critique dans les pays déjà confrontés au problème d'insuffisance alimentaire. C'est notamment le cas des pays africains qui, depuis ces dernières décennies, ont connu de nombreuses épidémies virales sur des cultures vivrières aussi essentielles que le riz avec le *Rice yellow mottle virus* (Fargette et al., 2006), le maïs avec le *Maize streak virus* (Shepherd et al., 2010) et le manioc avec les begomovirus responsables de la mosaïque du manioc (CMGs pour *cassava mosaic geminiviruses*) (Legg and Fauquet, 2004) et plus récemment avec les virus responsables de la striure brune du manioc (CBSVs pour *cassava brown streak viruses*) (Legg et al., 2011).

Le manioc est le troisième aliment le plus important après le riz et le maïs dans les pays tropicaux. Sa culture assure la sécurité alimentaire d'un demi-milliard de personnes en Afrique. Le manioc est renommé pour sa grande capacité à s'adapter à des conditions difficiles comme la sécheresse. Un certain nombre d'études suggèrent des changements climatiques importants pour les années à venir (réchauffement, augmentation de la concentration en CO₂ atmosphérique et variabilité de la pluviométrie), qui seront défavorables pour la plupart des cultures vivrières (maïs, sorgho, millet, pomme de terre,

haricot et banane) (Jarvis et al., 2012). Le manioc serait susceptible de pouvoir s'adapter plus facilement à ces changements climatiques et pourrait représenter ainsi une solution évidente pour répondre aux besoins alimentaires (Rosenthal et al., 2012). Les écart importants de rendement observés semblent indiquer que des améliorations significatives de la productivité du manioc peuvent être réalisées à la fois par le contrôle des maladies et ravageurs, et par la mise en œuvre d'une agriculture intensive respectueuse de l'environnement (Bassett, 2010; Perfecto and Vandermeer, 2010; Thresh et al., 1994a; Tilman et al., 2011).

A Madagascar, le manioc représente l'aliment de base de la population paysanne. Il assure la nourriture quotidienne des populations des régions les plus touchées par les périodes de sécheresse annuelles et où la pratique d'autres cultures vivrières est presque impossible. Bien que la maladie de la mosaïque du manioc ou *cassava mosaic disease* (CMD) représente la première contrainte biotique de la culture du manioc à Madagascar (Ranomenjanahary et al., 2005) et que cette maladie ait été décrite depuis les années 1930s (Cours, 1951), peu d'informations sont disponibles concernant les agents pathogènes responsables. Des études préliminaires basées sur des tests sérologiques et moléculaires ont suggéré la présence de trois espèces de CMGs du manioc à Madagascar (Ranomenjanahary et al., 2002). Cependant, seul un inventaire complet de la pression parasitaire virale malgache et des principaux facteurs épidémiologiques de la CMD à l'échelle de Madagascar permettra d'initier avec clairvoyance un programme de lutte.

Afin d'améliorer à long terme la production de manioc à Madagascar et d'assurer la sécurité alimentaire du paysannat malgache, l'objectif de ce travail de thèse a été premièrement (1) de réaliser une surveillance épidémiologique de la CMD à l'échelle du pays et dans les principales régions productrices de manioc, et (2) de diagnostiquer au niveau moléculaire les agents pathogènes et d'identifier les principaux facteurs épidémiologiques de la CMD à Madagascar (Chapitre 2, Article 1 en préparation). Ce premier volet de la thèse a permis de diagnostiquer la présence de six espèces de bégomovirus (CMGs) et de démontrer que les infections multiples sont courantes et en corrélation avec la sévérité des symptômes. D'autre part, ces travaux ont permis de montrer que dans les régions de basse altitude (0-200m), la CMD est plus prévalente et la population de l'insecte vecteur est plus abondante.

Enfin, nous avons aussi pu voir que la propagation des CMGs est essentiellement due à l'utilisation des boutures de manioc contaminées lors de la replantation des parcelles.

Dans le but de déterminer la diversité des bégomovirus impliqués dans la CMD à Madagascar, nous avons dans un deuxième temps entrepris la caractérisation moléculaire de génomes complets de CMGs. Cette activité en biologie moléculaire a permis l'identification de (1) une nouvelle espèce de bégomovirus impliquée dans la CMD et (2) un ADN satellite associé à certains isolats de CMG dans le nord de Madagascar.

La nouvelle espèce de bégomovirus bipartite, provisoirement nommé Cassava mosaic Madagascar virus (CMMGV) apparaît comme génétiquement distincte des CMGs africains (Chapitre 3, Article 2 accepté dans *Archives of Virology*). L'analyse phylogénétique basée sur les séquences du génome complet démontre que l'ADN-A du CMMGV est très divergent des EACMV-like mais apparenté aux bégomovirus monopartites décrits sur tomate dans les îles du sud-ouest de l'Océan Indien. Nous avons aussi décrit pour la première fois l'association naturelle d'un ADN satellite avec un CMG (Chapitre 3, Article 3 soumis à *Archives of Virology*). Cette nouvelle espèce d'ADN satellite, provisoirement appelée Cassava mosaic Madagascar alphasatellite (CMMGA) présente les caractéristiques typiques des molécules alphasatellites avec une région codante pour la protéine Rep, une région riche en adénine et la tige boucle des nanovirus. La séquence nucléotidique la plus proche est celle du Coton leaf curl Gezira alphasatellite isolée sur coton au Soudan (CLCuGA-[SD: SH7: 96]; HM446369) avec une similarité nucléotidique de 80%.

Enfin, nous avons poursuivi notre effort de description et d'analyse de la diversité des populations de CMGs présentes sur le manioc à Madagascar, afin de (1) définir leurs liens de parenté avec les CMGs d'Afrique continentale, (2) retracer leur histoire évolutive dans un contexte spatio-temporel et (3) comprendre comment les conditions biotiques ou abiotiques ont influencé la distribution actuelle des populations (Chapitre 4, Article 4 en préparation). Nos résultats de clonage et de séquençage de génomes complets ont permis de démontrer la présence de six espèces de CMGs infectant le manioc à Madagascar. Les analyses phylogénétiques et phylogéographiques de l'ACMV, une des espèces majoritaires à Madagascar, suggèrent une introduction unique d'Afrique continentale vers Madagascar au début des années 90. Enfin, les analyses phylogéographiques associées à des analyses

statistiques ont permis de montrer que la variabilité génétique des isolats malgaches d'ACMV est fortement corrélée avec la distance géographique et que la diffusion de l'ACMV est largement influencée par le facteur humain.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

Chapitre I

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Le manioc : une plante originaire du Nouveau Monde

Le manioc *Manihot esculenta* Crantz (Famille des *Euphorbiaceae*) est une plante pérenne cultivée pour ses racines tubéreuses (Silvestre and Arraudeau, 1983). Les espèces les plus connues du genre *Manihot* sont *M. esculenta* et *M. glaziovii*. La première est cultivée pour la consommation des tubercules même si les feuilles sont également consommées (légume vert). La deuxième sert principalement pour la consommation des feuilles et a largement été utilisée dans les programmes d'amélioration variétale. Le manioc est une plante qui présente une forte adaptabilité à des sols très pauvres. Cependant, il préfère les sols légers, meubles, profonds, à pente faible et riches en humus et en matières minérales. Sa végétation exige 25 à 30°C. Sa culture s'étend dans les régions tropicales et subtropicales, généralement entre les 30° de latitude Nord et Sud et jusqu'à 2000 m d'altitude (Silvestre and Arraudeau, 1983).

Considéré comme originaire d'Amérique du Sud (Bertram and Schaal, 1993; Colombo et al., 1998), notamment du nord-est du Brésil (Rogers and Appan, 1973), le manioc a été introduit en Afrique de l'Ouest par les portugais vers le milieu du XVI^e siècle (Fauquet and Fargette, 1990; Jones, 1959) (Figure 1). Il a tout d'abord été cultivé dans les colonies portugaises du Golfe du Bénin, de São Tomé-et-Principe et de l'embouchure du Congo. Mais sa culture ne s'est réellement développée qu'à la fin du XIX^{ème} siècle (Silvestre and Arraudeau, 1983). Importé à l'île Bourbon (île de La Réunion) en 1738, puis à l'île de France (île Maurice) en 1739, le manioc a été introduit à Madagascar une cinquantaine d'année plus tard (Cours, 1951). En effet, Mayeur a signalé sa culture dans l'Imerina central (région des Hauts-Plateaux) en 1785 (Mayeur, 1785).

Les îles du sud ouest de l'océan Indien ont représenté la tête de pont de l'introduction du manioc en Afrique de l'Est. Il a alors été signalé au Zanzibar en 1799, au Lac Victoria en 1862 et en Ouganda en 1878 (Silvestre and Arraudeau, 1983). La culture du manioc a ensuite été introduite en Asie notamment à Ceylan (1786) et à Calcutta (1794). Cependant, des

introductions antérieures ont été signalées en Inde par les portugais et aux Philippines par les espagnols au XVI^e siècle.

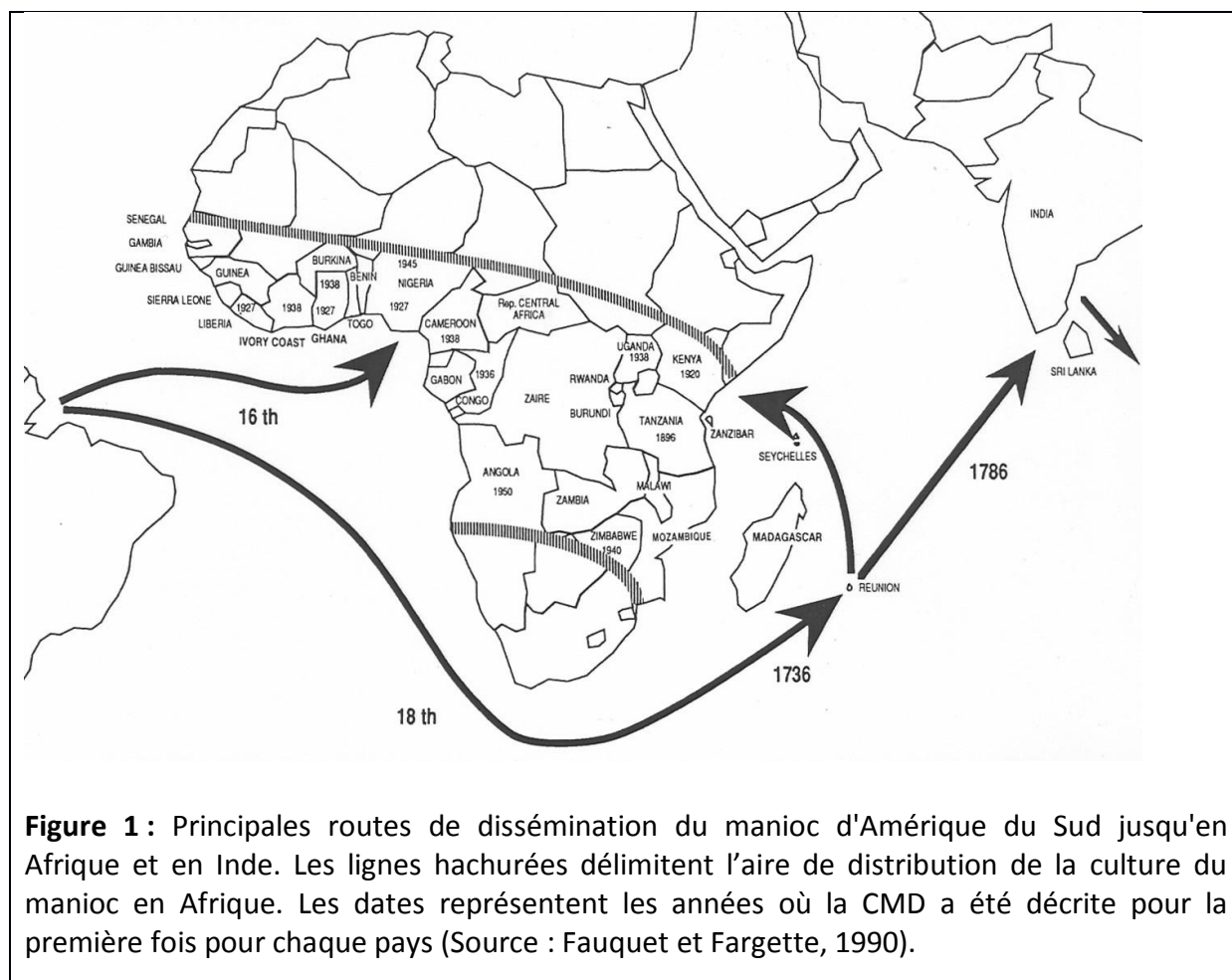


Figure 1 : Principales routes de dissémination du manioc d'Amérique du Sud jusqu'en Afrique et en Inde. Les lignes hachurées délimitent l'aire de distribution de la culture du manioc en Afrique. Les dates représentent les années où la CMD a été décrite pour la première fois pour chaque pays (Source : Fauquet et Fargette, 1990).

2. La culture du manioc en Afrique

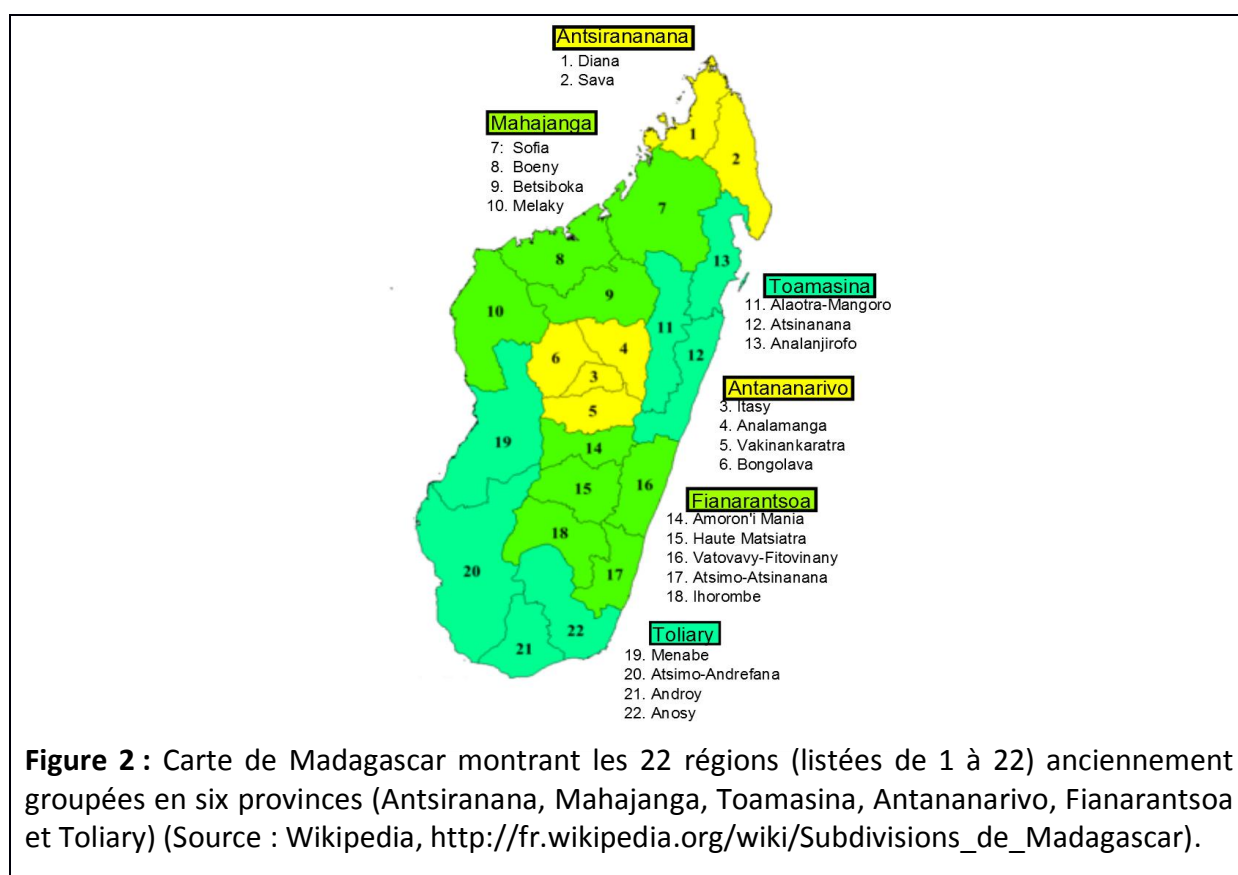
2.1. Le manioc est un aliment de base

Le manioc constitue l'alimentation de base pour de nombreuses populations africaines. Avec une production égale à 121 millions de tonnes (MT), le continent africain assure plus de la moitié de la production mondiale estimée à 230 MT (FAOSTAT, 2010). Le rendement moyen en tubercules est de 10 tonnes/Ha.

A Madagascar, le manioc est le deuxième aliment de base après le riz. Il représente en moyenne 14% de la consommation calorique malagasy (Dostie et al., 1999). Le manioc substitue le riz pendant la période de soudure (entre le semis et la récolte) dans les régions urbaines tandis qu'il constitue l'aliment principal et quotidien dans les régions arides et

rurales. Sa culture est répandue dans toutes les régions de l'île et concerne environ 88% des ménages malagasy (INSTAT, 2011). Néanmoins, les régions les plus productrices sont celles de Fianarantsoa et de Toliary (INSTAT, 2006 ; Figure 2). Les régions les plus consommatrices sont les régions des Antandroy au sud (région Androy) (Dostie, Randriamamonjy, and Rabenasolo, 1999). La majorité de la production nationale est destinée à l'autoconsommation. Les ventes constituent à peine le quart de la production (Rapport INSTAT, 2011). En 2010, la production annuelle du pays est estimée à 3MT pour une surface cultivée de 360.000 Ha. Le rendement moyen est de 8,3 tonnes à l'hectare.

La transformation du manioc en produits dérivés est importante et les possibilités de transformation sont diverses (farine, colle, édulcorant, sirop de glucose, fécule, amidon,...). Cela constitue une source de revenus pour les petites entreprises mais aussi pour les paysans producteurs. D'ailleurs, la transformation des matières premières est une possibilité de conservation du produit. A Madagascar, la transformation du manioc n'est pas développée. A part la fabrication de fécule et de tapioca (féculerie de Marovitsika), aucune autre industrie de transformation n'est signalée.



2.2. Les contraintes biotiques de la culture du manioc

La culture du manioc subit de nombreuses contraintes dues aux facteurs abiotiques (climat) et biotiques (ravageurs, et agents pathogènes). En Afrique, les contraintes les plus importantes sont les maladies dues aux agents pathogènes dont les bactéries, les champignons et les virus

2.2.1. Les principaux ravageurs des cultures

L'attaque des ravageurs constitue une contrainte non négligeable sur la culture du manioc (James et al., 2000). Les acariens verts *Mononychellus tanajoa* (Bondar) vident les tissus foliaires de leur contenu cellulaire, provoquent des taches chlorotiques ou chlorose intégrale sur les feuilles mais aussi le rabougrissement et la déformation foliaire. Les cochenilles farineuses *Phenacoccus manihoti* (Matile-Ferrero) provoquent la déformation foliaire, la défoliation prématurée et l'arrêt de croissance pouvant entraîner des pertes de rendement en tubercules (James and Fofanah, 1992). Les aleurodes *Bemisia tabaci* (Gennadius) sont considérés à la fois comme ravageurs directs, en s'alimentant de la sève élaborée et en favorisant le développement de la fumagine, et également comme ravageurs indirects en transmettant certains virus (Cf. paragraphe 4).

2.2.2. La bactériose vasculaire du manioc ou cassava bacterial blight

Introduite en Afrique depuis les années 1970, la bactériose vasculaire du manioc dont l'agent causal est *Xanthomonas campestris* pv. *manihoti* sévit dans la majorité des aires de culture du manioc (Boher and Verdier, 1994). Les symptômes sont des taches nécrotiques et brunes, qui se développent entre les nervures des feuilles (Msikita et al., 2000). En se développant, ces lésions provoquent la nécrose et le flétrissement des feuilles, puis la défoliation, et enfin la mort de la plante. Les symptômes de gommose sur feuilles, sur pétioles et sur tiges peuvent apparaître (présence de gouttes d'une gomme brunâtre). C'est une maladie spécifique du manioc. La propagation se fait par l'utilisation des boutures infectées ou après pénétration des bactéries par des lésions sur tiges et feuilles.

2.2.3. Les maladies fongiques

Les maladies fongiques provoquent des dégâts sur les feuilles, les tiges et les racines de la plante. De nombreux champignons ont été identifiés comme responsables de ces maladies (Msikita et al., 2000; Ranomenjanahary, 2008). Les champignons du genre *Cercospora* sont responsables de la cercosporiose dont les symptômes apparaissent sur les feuilles : taches brunes (*C. henningsii*), brulures (*C. vicosae*) et taches blanches (*C. caribae*). *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *manihoti* est l'agent causal de l'antracnose. Ce pathogène attaque la surface des tiges et des feuilles. Les symptômes de l'antracnose sont des chancres sur les tiges et à la base des pétioles foliaires, provoquant dans les cas les plus extrêmes la défoliation et la mort de la plante. La maladie a été détectée à Madagascar en 1936 (Bouriquet, 1946).

2.2.4. Les maladies virales

De nombreuses espèces virales ont été décrits comme pathogènes du manioc dans le monde dont huit en Afrique subsahariennes (Thresh et al., 1994b). Les plus importantes maladies virales en Afrique sont la maladie de la mosaïque du manioc (*cassava mosaic disease*, CMD) due à des membres du genre *Begomovirus*, de la famille *Geminiviridae* (*cassava mosaic geminiviruses*, CMGs, cf. paragraphe 3) et la maladie de la striure brune (*cassava brown streak disease*, CBSD) causée par deux virus du genre *Ipomovirus* de la famille *Potyviridae*. A Madagascar, seule la CMD a été détectée.

2.2.4.1. La maladie de la mosaïque du manioc

2.2.4.1.1. *Historique de la maladie*

La maladie de la mosaïque du manioc a été décrite pour la première fois en 1894 par Warburg dans l'actuelle Tanzanie (Warburg, 1894). Ensuite, elle a été détectée dans plusieurs pays d'Afrique subsaharienne au début du XX^e siècle, notamment en Sierra Leone (Deighton, 1936), en Côte d'Ivoire (Hédin, 1931), au Ghana (Dade, 1930), au Nigeria

(Golding, 1936), en Ouganda (Hall, 1928), et au Cameroun (Dufrenoy and Hédin, 1929). A Madagascar, la CMD a été décrite pour la première fois en 1932 comme une maladie d'importance mineure (François, 1937). En Inde et au Sri Lanka, la maladie était connue dès 1956 (Abraham, 1956). La propagation de la maladie est liée à la fois à l'utilisation de boutures infectées, lors de la multiplication végétative de la plante (transmission verticale), et à la transmission par insecte vecteur, l'aleurode *Bemisia tabaci* (Hemiptera : *Aleyrodidae*) qui transmet les virus de plante à plante (transmission horizontale).

Les symptômes de la CMD sont principalement des mosaïques foliaires (Figure 3) qui varient selon la sévérité de la maladie et le type de plante (résistante ou sensible à la CMD) (Hillocks and Thresh, 2000). Mais aucune différence évidente de symptômes n'a été observée selon l'espèce virale qui infecte la plante. Par contre, l'accentuation des symptômes par des phénomènes de synergie entre des membres appartenant à deux espèces virales a été décrite à plusieurs reprises (Cf. paragraphe 3.7.) (Ariyo et al., 2005; Fondong et al., 2000; Patil and Fauquet, 2009; Pita et al., 2001a).



Figure 3 : Symptômes foliaire de la maladie de la mosaïque du manioc.

Les principales conséquences de la CMD sont les pertes de rendement en tubercules. Les nombreux travaux réalisés dans le but d'estimer les pertes économiques liées à la CMD ont montré que celles-ci varient entre 20% et 95%, selon les cultivars, l'incidence de la maladie et les types d'infections (infections simples ou mixtes) (Legg and Fauquet, 2004). En Afrique,

les pertes de récoltes ont été estimées entre 19 et 27 millions de tonnes (MT) en 2003 pour une production totale de 97 MT (FAOSTAT, 2003).

2.2.4.1.2. L'épidémie de CMD à Madagascar dans les années 1930s

La CMD était présente à Madagascar bien avant les années 30 mais l'incidence était faible et son impact sur le rendement était insignifiant (François, 1937). Les symptômes étaient des mosaïques à peine visible avec une légère distorsion foliaire. En 1934, la situation semble avoir rapidement changée, avec la description d'une épidémie de CMD dans une région à l'ouest du lac Alaotra (Ambatondrazaka, région des Hauts-Plateaux) (Cours et al., 1997). Cette épidémie semble s'être rapidement propagée dans les principales régions productrices de manioc de Madagascar (Cours, 1951). Les principales caractéristiques de l'épidémie étaient une incidence élevée, une sévérité forte, et un impact important sur la croissance des plantes. En deux ans, l'épidémie de CMD a fait disparaître la variété traditionnelle la plus cultivée et de nombreux cultivars locaux entraînant une pénurie de manioc. Face à cette épidémie, Cours (1951) a développé un programme d'amélioration variétale qui a débouché sur la vulgarisation de matériel résistant à la CMD (cf. paragraphe 5.2.).

2.2.4.1.3. La pandémie de CMD en Afrique dans les années 1980-1990s

Vers les années 1990s, une forme sévère de la maladie s'est rapidement propagée en Ouganda (Legg and Fauquet, 2004). Les cultivars les plus vulnérables ont rapidement été éliminés et l'abandon des cultures a engendré une grave famine (Thresh and Otim-Nape, 1994b) et des pertes estimées à 60 millions de dollars par an entre 1992 et 1997 (Otim-Nape et al., 1997). La maladie s'est ensuite propagée dans les pays avoisinants dont le Soudan, le Kenya, la Tanzanie et La République Démocratique du Congo (Legg and Fauquet, 2004; Otim-Nape et al., 2000).

Les premières observations de symptômes sévères de CMD ont été suivies par l'identification d'une souche suspectée d'être l'agent causal de la forme sévère de la maladie : la souche ougandaise de l'EACMV (EACMV-UG). L'analyse moléculaire de l'EACMV-UG a démontré son origine recombinante (Deng et al., 1997; Zhou et al., 1997). En effet,

l'EACMV-UG est issu d'une recombinaison entre un EACMV et un ACMV au niveau de la partie centrale de l'ORF de la protéine de capsid. Le suivi en Ouganda du front épidémique a cependant permis de montrer que la sévérité de la maladie était associée à l'infection mixte entre deux virus l'EACMV-UG et l'ACMV (Harrison et al., 1997; Pita et al., 2001a). La synergie entre l'ACMV et l'EACMV-UG a pu être démontrée expérimentalement, et la production de symptômes plus sévères qu'en infection simple, est liée à l'effet conjugué de deux suppresseurs du *post transcriptional gene silencing* (PTGS ; cf. paragraphe 3.7) (Vanitharani et al., 2004). Les données actuelles suggèrent que les facteurs clés de cette pandémie de CMD sévère ont été (1) la propagation rapide de la maladie par une abondante population d'aleurodes vecteurs (Legg and Fauquet, 2004; Legg et al., 2002) (cf. paragraphe 4), (2) la forte incidence de la CMD associée avec des symptômes sévères, et (3) l'infection mixte entre l'EACMV-UG et l'ACMV et les phénomènes de synergie (Pour revue Patil and Fauquet, 2009). Cependant, la présence de la souche ougandaise en coinfection avec d'autres virus (ACMV, EACMV ou SACMV) dans les pays d'Afrique du Sud en l'absence d'épidémie sévère (Berry and Rey, 2001), suggère la possible intervention d'autres paramètres épidémiologiques (Legg and Fauquet, 2004).

3. La famille Geminiviridae

3.1. Généralités et classification

Les géminivirus sont des virus à ADN circulaire simple brin encapsidé dans une particule icosaédrique associée en doublets, de 18-20nm de diamètre et d'environ 30nm de longueur (Bock, 1975) (Figures 4 et 5). Sur la base de leur organisation génomique, de leur gamme d'hôtes et d'insectes vecteurs, la famille *Geminiviridae* est divisée en quatre genres : *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* et *Begomovirus* (Brown et al., 2011) (Figure 5).

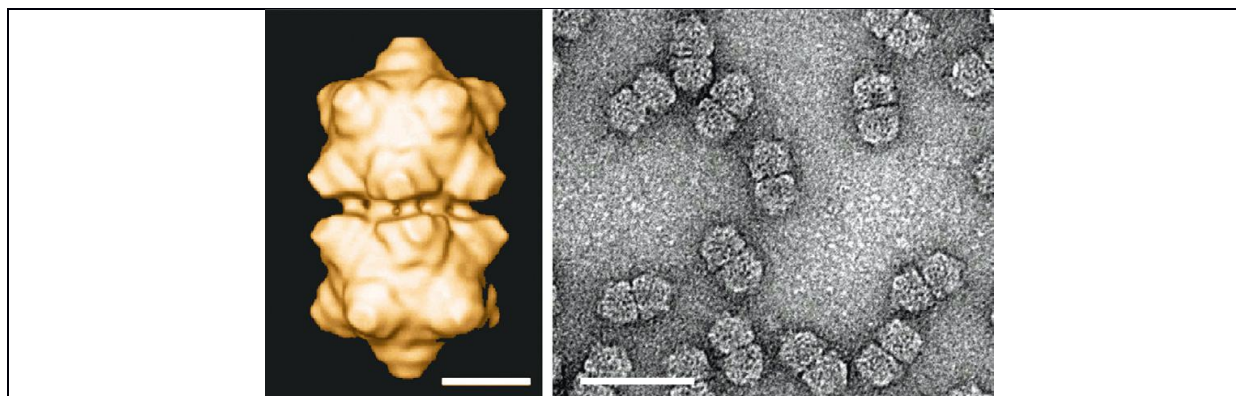
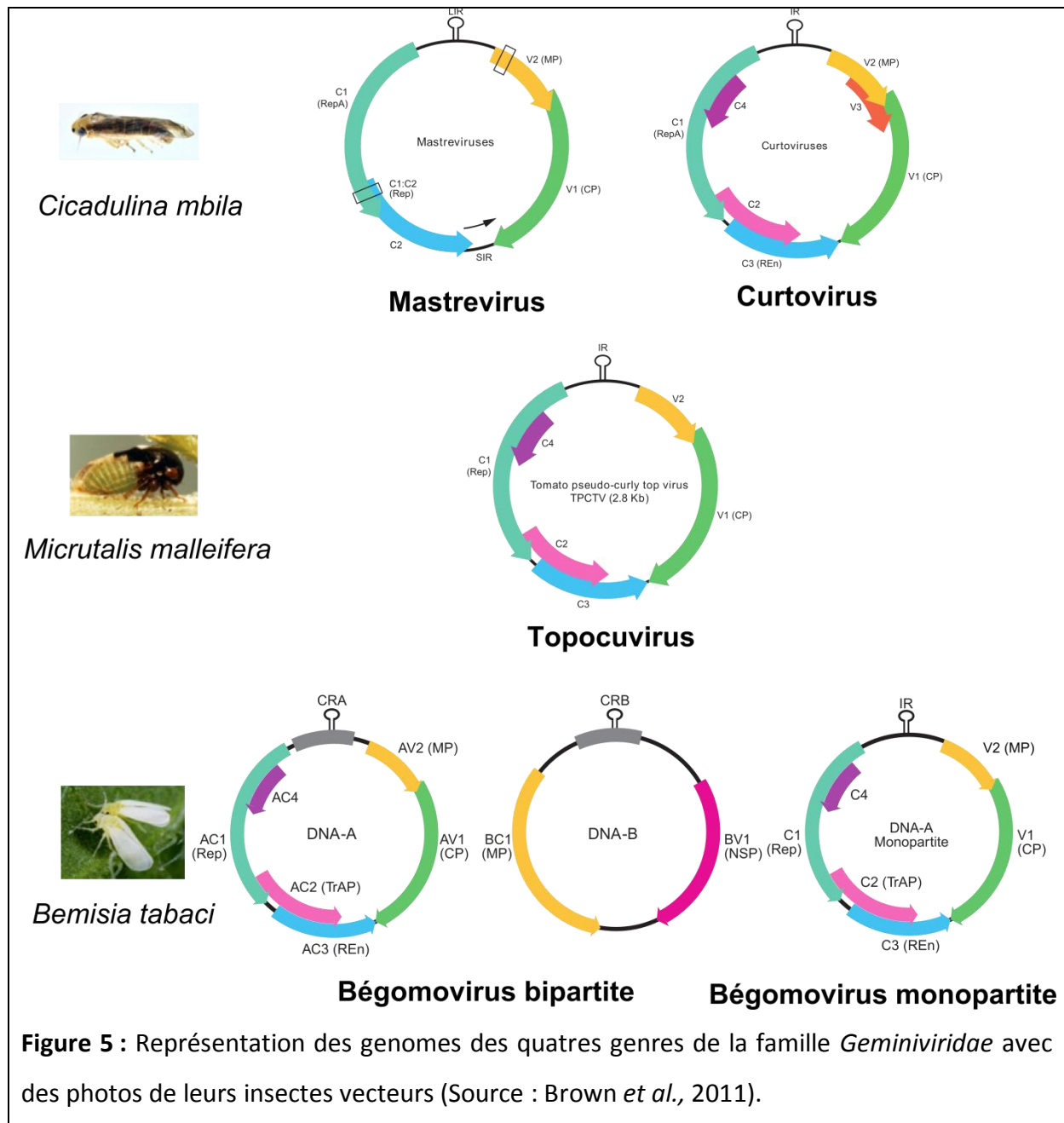


Figure 4 : (A gauche) Reconstruction par cryo-microscopie électronique du MSV (*Maize streak virus*) (Zhang et al., 2001). L'échelle représente 10nm. (A droite) Particules purifiées de MSV montrant leur forme icosaédrique associée en doublets. L'échelle représente 50nm (Source : Brown et al., 2011).

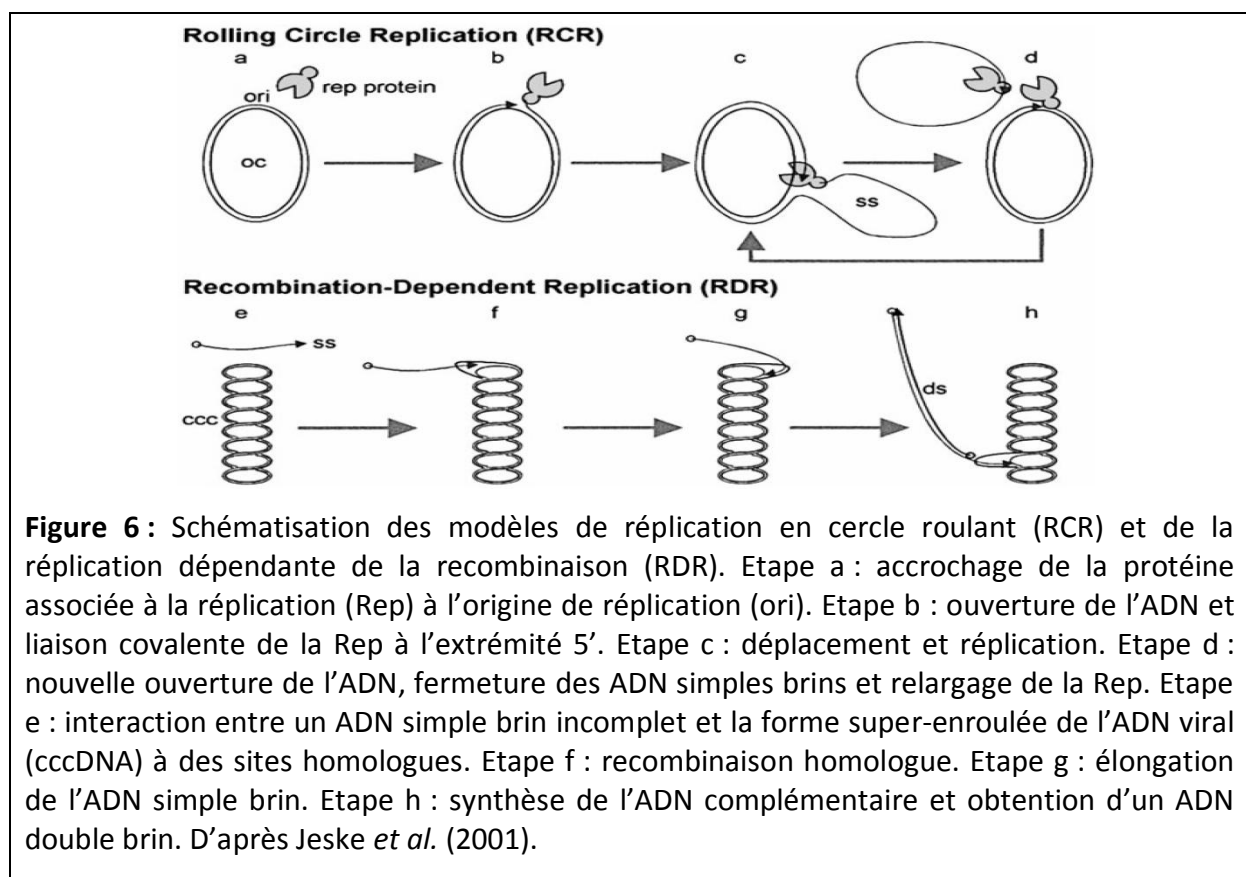
Les virus du genre *Mastrevirus* infectent principalement les plantes monocotylédones. L'espèce type est le *Maize streak virus*. Les mastrévirus possèdent un seul composant génomique (monopartite) qui code pour quatre protéines. Les virus du genre *Curtovirus* infectent les plantes dicotylédones. Sept espèces virales à génome monopartite codant pour six à sept protéines ont été décrites. Le virus type est le *Beet curly top virus* (BCTV). Les mastrévirus et les curtovirus sont transmis par cicadelles (*Hemiptera : Cicadellidae*) selon le mode circulant non propagatif et persistant. L'unique espèce du genre *Topocuvirus* est le *Tomato pseudo-curly top virus* qui est transmis par un membracide (*Micrutalis malleifera ; Hemiptera : Membracidae*). Il possède un génome monopartite codant pour six protéines. Les virus du genre *Begomovirus* infectent les plantes dicotylédones et sont transmis par l'aleurode *Bemisia tabaci* (*Hemiptera : Aleyrodidae*). L'espèce type est *Bean golden mosaic virus*. Le génome viral est monopartite (ex. *Tomato yellow leaf curl virus*) ou bipartite (ex. *African cassava mosaic virus*). Les virus monopartites et bipartites sont communs dans l'Ancien Monde tandis que dans le Nouveau-Monde, seuls des virus bipartites ont été décrits.



3.2. Réplication des géminivirus

Les géminivirus, qui codent seulement pour quelques protéines, utilisent les facteurs cellulaires de la plante hôte (comme l'ADN polymérase cellulaire) pour leur réplication. Elle s'effectue dans le noyau des cellules de la plante infectée et se fait selon le mécanisme du cercle roulant (Figure 6) rencontré chez les bactériophages et la plupart des plasmides. Dans un premier temps, la forme répliquative du virus (intermédiaire de réplication) est synthétisée à partir de l'ADN circulaire simple brin viral (forme encapsidée), par l'intermédiaire de la

polymérase cellulaire (Saunders et al., 1992). Dans un second temps, la protéine virale Rep se fixe sur les itérons (motifs répétés) dans la région intergénique et clive ($\downarrow$) le brin viral au niveau de l'origine de réplication (site spécifique TAATATT $\downarrow$ AC). La réplication est initiée à partir de l'extrémité 5' du brin d'ADN. L'ADN simple brin synthétisé et libéré du complexe de réplication est encapsidé au niveau du noyau des cellules. Ce modèle de réplication en cercle roulant a été confirmé par microscopie électronique (Jeske et al., 2001). Ces expériences associées à l'électrophorèse bidimensionnelle ont par ailleurs permis l'identification d'intermédiaires additionnels de réplication compatibles avec un modèle de réplication dépendante de la recombinaison (RDR) (Jeske, 2009).



3.3. Organisation génomique du genre Begomovirus

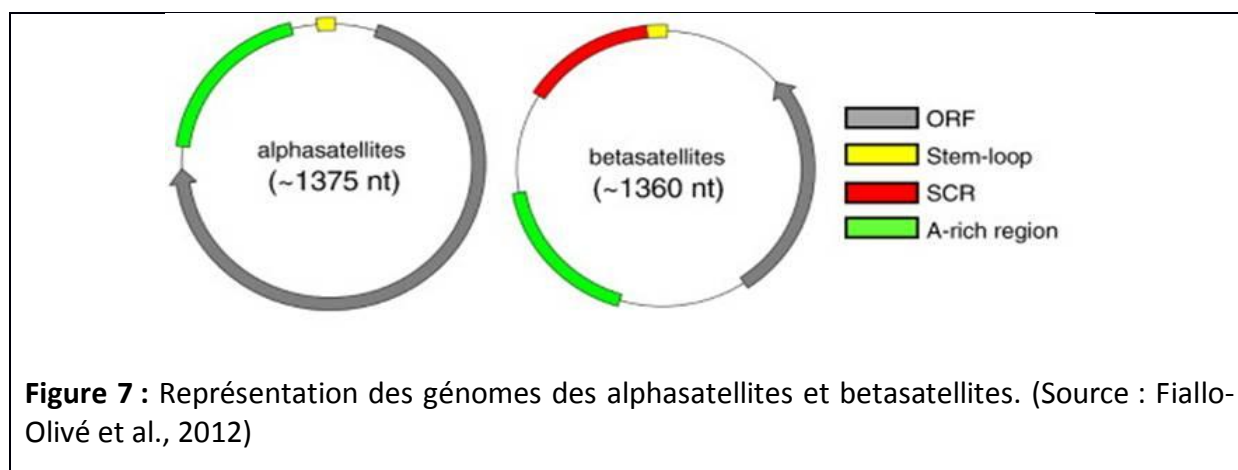
Les bégomovirus monopartites possèdent un unique composant génomique, appelé ADN-A *like*, d'une taille d'environ 2800 pb tandis que le génome des bégomovirus bipartites est constitué de deux composants, appelé ADN-A et ADN-B, de taille similaire. Chacun des composants possède des gènes codant pour plusieurs protéines. L'ADN-A porte une région intergénique (*intergenic region* ou IR) et six cadres ouverts de lecture (régions codantes) ou

ORFs (*open reading frames*) dont certains sont chevauchants (Brown et al., 2011). Dans le sens viral, la protéine de capsid CP (ORF AV1/V1) est responsable de l'encapsidation et représente l'unité de base dans la constitution de la particule virale. La protéine MP (ORF AV2/V2) est associée au mouvement du virus. Les bégomovirus bipartites du Nouveau Monde ne possèdent pas l'ORF AV2. Dans le sens complémentaire, la protéine Rep (ORF AC1/C1) est associée à la réplication. La protéine TrAP (ORF AC2/C2) est une protéine activatrice de la transcription et est responsable de la transactivation des ORFs AV1 et BC1 (Sunter and Bisaro, 1997). La TrAP est également impliquée dans la suppression du mécanisme de *post-transcriptional gene silencing* (PTGS) (Vanitharani et al., 2005; Voinnet et al., 1999). La protéine REn (ORF AC3/C3) est une protéine activatrice de la réplication (Hanley-Bowdoin et al., 1999). La protéine codée par l'ORF AC4/C4 semble être un déterminant majeur dans l'expression des symptômes, et un également un suppresseur du PTGS. L'ADN-B porte deux ORFs qui codent pour deux protéines. La protéine MP (ORF BC1) est impliquée dans le mouvement de cellule à cellule de l'ADN viral tandis que la protéine NSP (ORF BV1) est impliquée dans le transport de l'ADN viral du noyau vers le cytoplasme à travers la membrane nucléaire (Sanderfoot et al., 1996). L'ADN-A et l'ADN-B possèdent une région intergénique d'environ 200 pb dans laquelle se trouve la région commune et la tige boucle (5' TAATATTAC 3').

3.4. Association des bégomovirus avec des ADN satellites

Certains bégomovirus notamment les monopartites de l'Ancien Monde sont associés à des ADN circulaires satellites ayant une taille d'environ 1300 pb (Briddon et al., 2004). Ces ADN satellites participent à l'infection virale, sans être pour autant nécessaires à celle-ci. Deux classes principales d'ADN satellites ont été identifiées : les alphasatellites (ADN-1) et les betasatellites (ADN- β) (Briddon and Stanley, 2006) (Figure 7). Les alphasatellites possèdent un ORF codant pour une protéine associée à la réplication (Rep), leur permettant de se répliquer de façon autonome. Cependant, ils dépendent du virus assistant pour l'encapsidation et le mouvement (Briddon and Stanley, 2006; Nawaz-ul-Rehman et al., 2009). Leur génome comporte également une région riche en adénine (A) et une tige boucle similaire à celle des nanovirus (5' TAGTATTAC 3'). Les alphasatellites semblent jouer un rôle dans l'atténuation des symptômes (Briddon and Stanley, 2006).

Les betasatellites possèdent un ORF C1 codant pour la protéine β C1 qui est impliquée dans le développement et l'intensité des symptômes (Briddon and Stanley, 2006; Saunders et al., 2004), une région riche en A, une région commune et une tige boucle (5' TAA/GTATTAC 3'). Les betasatellites dépendent du virus assistant à la fois pour l'encapsidation, le mouvement et la réplication. Il a été démontré qu'ils jouent un rôle direct dans le développement et la gravité des symptômes, en facilitant à la fois sa propre accumulation dans la plante et celle du bégomovirus assistant (Briddon et al., 2001; Saunders et al., 2000). Les betasatellites sont déterminants dans la pathogénicité du virus assistant, en intervenant dans la suppression du mécanisme de défense de la plante hôte (PTGS *suppressor*) (Mansoor et al., 2003). Les données actuelles suggèrent que les alphasatellites ont des points de similitude avec les nanovirus alors que l'origine des betasatellites reste inconnue (Briddon and Stanley, 2006).



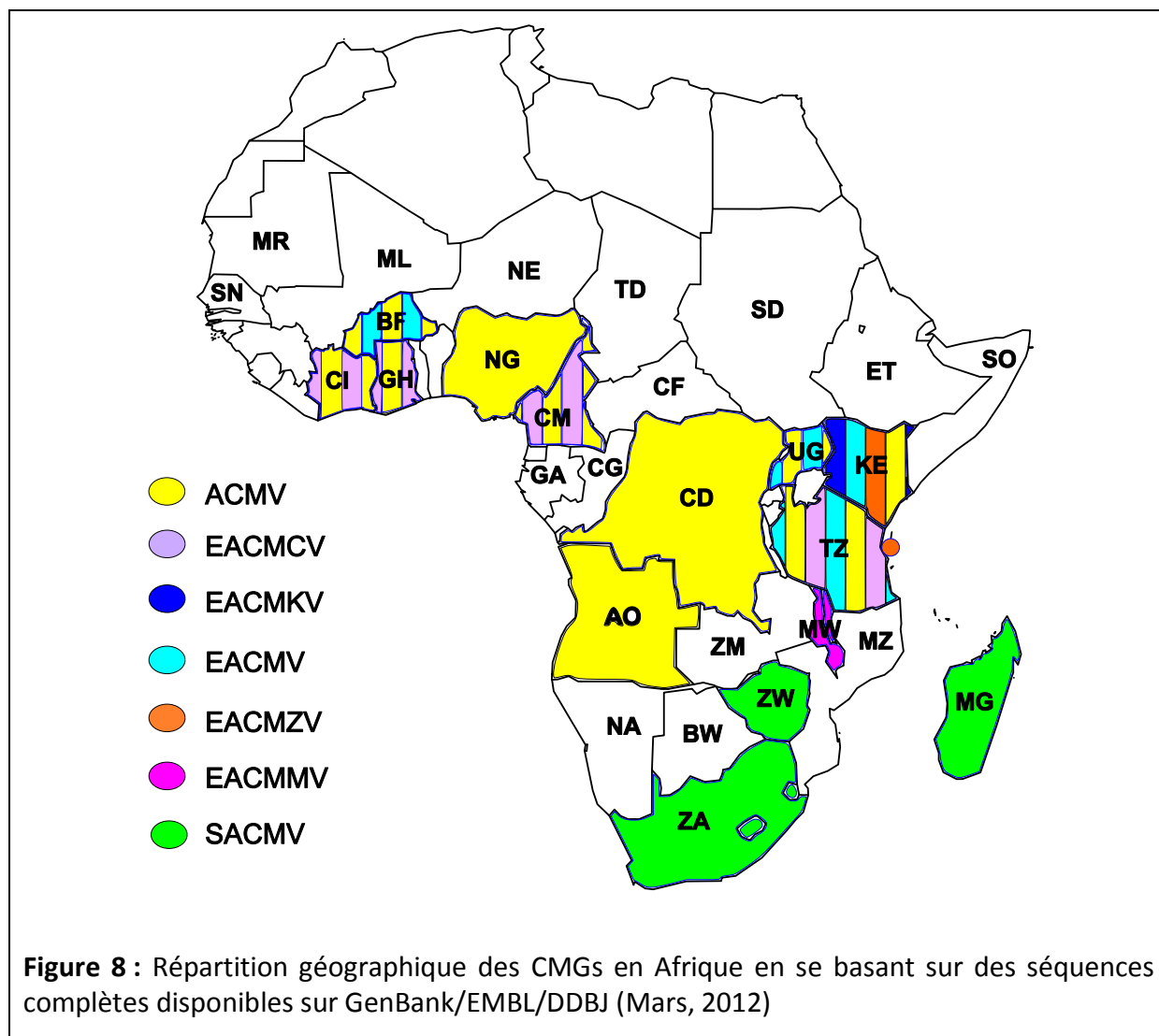
3.5. Les bégomovirus du manioc : cassava mosaic geminiviruses (CMGs)

Initialement, la CMD a été associée à une seule espèce virale l'*African cassava mosaic virus* (ACMV) (Bock and Harrison, 1985). Des tests de diagnostics sérologiques utilisant des anticorps monoclonaux ont permis de distinguer trois groupes d'isolats : (1) le groupe A (ou groupe ACMV) de l'Afrique de l'Ouest, du Burundi, de l'Ouest du Kenya, du Tchad, d'Ouganda et du Cameroun ; (2) le groupe B (ou groupe EACMV pour *East African cassava mosaic virus*) de l'Afrique de l'Est, de l'Est du Kenya, de Madagascar, de Malawi, de Tanzanie, de Zimbabwe (Swanson and Harrison, 1994), d'Ouganda (Zhou et al., 1997), de Zambie (Ogbe et al., 1997), du Nigeria (Ogbe et al., 1999) et du Cameroun (Fondong et al., 1998) et (3) le groupe C (groupe ICMV pour *Indian cassava mosaic virus*) de l'Inde et du Sri Lanka (Harrison et al., 1987). Plus tard, les trois groupes d'isolats ont été divisés en trois espèces

différentes (ACMV, EACMV et ICMV) sur la base du séquençage nucléotidique de leurs génomes complets (Hong et al., 1993; Swanson and Harrison, 1994). Les premières études réalisées sur la répartition géographique de ces trois espèces virales suggéraient une distribution distincte : l'ACMV principalement présent en Afrique de l'Ouest, l'EACMV principalement présent en Afrique de l'Est et l'ICMV en Inde et au Sri Lanka (Harrison et al., 1995). En 1998, une quatrième espèce virale a été décrite en Afrique du Sud et nommée *South African cassava mosaic virus* (SACMV) (Berrie et al., 1998). Ces deux dernières décennies, avec l'avènement de nouvelles stratégies de clonage et de séquençage qui ont facilité l'obtention de génomes complets, de nouvelles espèces de CMGs ont été décrites en Afrique avec l'*East African cassava mosaic Malawi virus* (EACMMV) (Zhou et al., 1998), l'*East African cassava mosaic Cameroon virus* (EACMCV) (Fondong et al., 2000), l'*East African cassava mosaic Zanzibar virus* (EACMZV) (Maruthi et al., 2004) et l'*East African cassava mosaic Kenya virus* (EACMKV) (Bull et al., 2006). Les analyses de recombinaison ont montré que ces nouvelles espèces, communément appelées EACMV-like, étaient principalement le fruit d'évènements de recombinaison entre l'EACMV et le SACMV (Ndunguru et al., 2005) (cf. paragraphe 3.6). En Asie, une deuxième espèce a été décrite et nommée *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV) (Saunders et al., 2002). Basé sur le seuil de distinction taxonomique des bégomovirus de 89% (Fauquet et al., 2008), au total, neuf espèces de CMGs sont officiellement décrites dans le 9^{ème} rapport de l'*International Committee on Taxonomy of Viruses* (Brown et al., 2011)(Figure 8).

3.6. Rôle majeur de la recombinaison dans l'évolution des CMGs

Même si le phénomène de recombinaison est connu depuis longtemps chez les géminivirus (Padidam et al., 1999), l'augmentation du nombre de séquences de génomes complets de géminivirus (Fauquet et al., 2008) et le développement de méthodes de détection des évènements de recombinaison (Martin et al., 2005), ont permis de démontrer que la recombinaison jouait un rôle primordial dans la diversification des géminivirus (Lefevre et al., 2007a).



Dans le cas des CMGs, la recombinaison a été détectée dans la plupart des espèces décrites. C'est notamment le cas pour les *EACMV-like* qui sont issus de recombinaison multiples entre les génotypes EACMV et SACMV (Ndunguru et al., 2005). D'autres CMGs comme l'ACMV et l'ICMV semblent beaucoup plus réfractaires à la recombinaison (Patil and Fauquet, 2009; Pita et al., 2001b). En effet, la comparaison des séquences nucléotidiques des isolats d'ACMV avec les séquences complètes d'autres espèces de bégomovirus suggère l'absence d'évènements de recombinaison (Ndunguru et al., 2005). La tendance des *EACMV-like* à se recombiner favorise naturellement la diversification génétique des isolats au sein des espèces mais aussi l'apparition de nouvelles espèces ou souches avec des propriétés biologiques et épidémiologiques différentes des virus parentaux. C'est notamment le cas de la souche sévère ougandaise de l'EACMV (EACMV-UG), qui est le fruit d'un évènement de

recombinaison entre l'EACMV et l'ACMV, avec l'échange de la portion centrale de l'ORF AV1 de l'EACMV par celle de l'ACMV (Deng et al., 1997; Zhou et al., 1997). L'EACMV-UG a été associé en infection mixte avec l'ACMV à l'épidémie sévère de CMD qui a sévit en Ouganda dans les années 1990s et qui s'est rapidement répandu dans les pays voisins pour traverser l'Afrique d'Est en Ouest (Legg and Fauquet, 2004).

La pseudo-recombinaison est la réassociation entre un isolat d'un virus avec un isolat d'un autre virus. Le phénomène de pseudo-recombinaison a été reporté entre variants de la même espèce. C'est le cas de l'ADN-A de la souche EACMV-UG2 trouvé associé avec l'ADN-B de l'EACMV-UG3 et causant de très sévères symptômes (Pita et al., 2001a). La pseudo-recombinaison a aussi été reportée entre membres d'espèces différentes (Bull et al., 2006).

1.1. Synergie virale et sévérité des symptômes

La synergie virale est l'interaction positive entre des virus qui coinfectent une plante, celle-ci pouvant entraîner des symptômes plus sévères. Des études effectuées en Ouganda au moment de l'épidémie de CMD sévère ont montré que les plantes coinfectées par l'ACMV et l'EACMV-Ug expriment des symptômes plus sévères que celles qui sont infectées par l'ACMV (Harrison et al., 1997). Des études sur le mécanisme de la synergie au niveau moléculaire ont montré que chaque virus possède deux supprimeurs de PTGS appelés AC2 et AC4 mais qui ont des capacités différentes selon le virus (ex : AC4 de l'ACMV est plus fort que l'AC4 de l'EACMV). Aussi, les virus coinfectants combinent ces deux supprimeurs de PTGS : AC2 pour les EACMVs et AC4 pour l'ACMV. L'AC4 de l'ACMV assure une immédiate suppression de PTGS pour favoriser la réplication des deux virus, qui en effet augmentent leur charge virale. A leur tour, les virus produits fournissent plus de protéines AC2 pour l'EACMV qui a un effet suppresseur de PTGS plus efficace à long terme (Vanitharani et al., 2004). Le même synergisme causant une forte sévérité de symptômes a été reporté au Cameroun quand les plantes sont coinoculées par l'ACMV et l'EACMCV (Fondong et al., 2000).

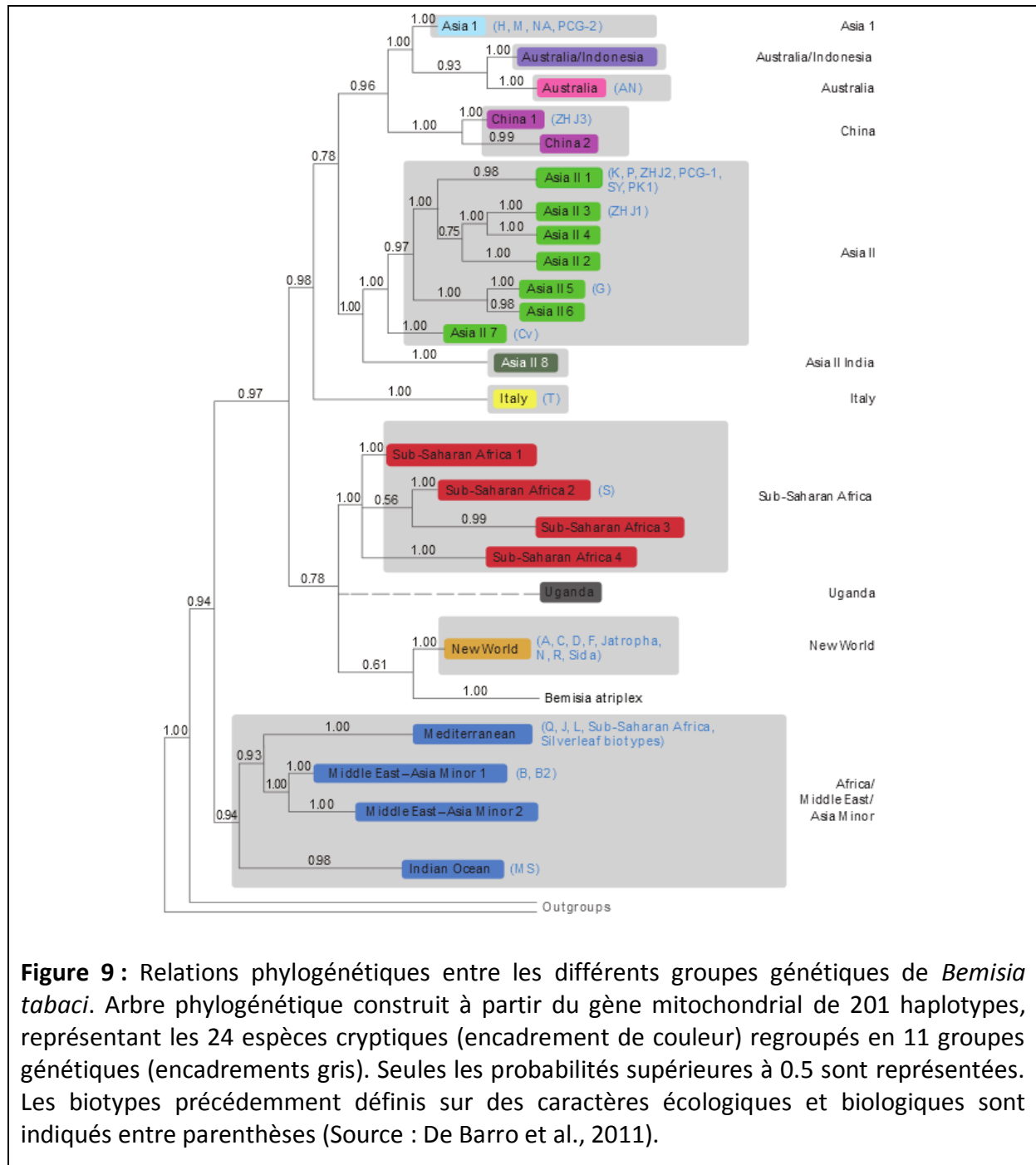
2. L'insecte vecteur *Bemisia tabaci*

Bemisia tabaci (Famille *Aleyrodidae*) a été décrit pour la première fois en 1889 (Gennadius, 1889). Présent partout, sauf en Antarctique, il est considéré comme l'un des plus importants ravageurs des cultures (Global Invasive Species Database, <http://www.issg.org>). *B. tabaci* est un insecte très polyphage (Oliveira et al., 2001) et vecteur d'un grand nombre de virus appartenant aux genres *Crinivirus*, *Ipomovirus*, *Torradovirus*, *Carlavirus* et *Begomovirus* (Navas-Castillo et al., 2011). Les begomovirus sont transmis selon le mode circulant et persistant (Czosnek et al., 2001). *B. tabaci* est considéré comme un complexe d'espèces cryptiques comportant de nombreuses populations biologiquement et génétiquement différentes nommées « biotypes » (Brown et al., 1995). Des données biologiques sur la gamme d'hôtes, la capacité à induire des changements physiologiques chez l'hôte, la résistance aux insecticides, la capacité de dispersion et de transmission des begomovirus et les profils génétiques ont permis d'identifier au moins 36 biotypes (Figure 9) (De Barro et al., 2011). L'étude des relations phylogénétiques entre ces différents groupes ont révélé l'existence de 11 groupes génétiques et de au moins 24 espèces morphologiquement indiscernables (De Barro et al., 2011).

Les études de la diversité génétique des populations de *B. tabaci* sur manioc en Afrique ont montré l'existence de groupes génétiquement distincts (Berry et al., 2004; Legg et al., 2002). Deux populations, nommées Ug1 et Ug2, présentant une répartition géographique distincte ont ainsi été identifiées en Ouganda (Legg et al., 2002). L'abondance de la population du génotype Ug2 dans les zones d'épidémie sévère de CMD a permis aux auteurs de suggérer que cette population serait associée à l'épidémie de CMD en Ouganda. En outre, une étude complémentaire réalisée à large échelle sur manioc et basée sur l'utilisation d'échantillons collectés en Afrique de l'Ouest et en Afrique Australe (Cameroun, Zambie, Mozambique, Zimbabwe, Swaziland et Afrique du Sud) a permis d'identifier cinq biotypes présentant une structuration géographique distincte (haplotypes) (Sub-Saharan I, II, III, IV et V) (Berry et al., 2004).

Une approche similaire a permis d'identifier deux biotypes de *B. tabaci* dans la région du Sud Ouest de l'océan Indien : le biotype Ms indigène détecté à Madagascar, à La Réunion, aux Seychelles et à Maurice (sur tomate, Poinsettia *Euphorbia heterophylla*, patate douce,

Jatropha gossypifolia et haricot), et le biotype B invasif détecté uniquement à La Réunion et à Maurice (sur coton et tomate) (Delatte et al., 2005a). A notre connaissance, la diversité des populations de *B. tabaci* sur manioc dans les îles du sud ouest de l'océan Indien n'a pas encore fait l'objet d'études.



3. Les méthodes de lutte contre la CMD

Les principales méthodes utilisées pour lutter contre la CMD sont la prophylaxie et l'assainissement du manioc, la création de variétés résistantes par sélection - croisement et la transformation génétique.

3.1. Les méthodes prophylactiques

Les méthodes prophylactiques rassemblent toutes les techniques qui visent à assurer le développement des plants cultivés dans des conditions saines (Legg and Fauquet, 2004). Les cinq principales méthodes prophylactiques sont (Thresh, 2006) : (1) la quarantaine pour éviter l'introduction de virus ou de leurs vecteurs dans des régions indemnes, (2) l'élimination des plants potentiellement contaminés de la culture précédente, (3) l'élimination de toutes les adventices des cultures ou plantes non cultivées susceptibles d'être des plantes hôtes alternatives des virus dans et autour du champ, (4) l'utilisation de boutures ou de plants non virosés pour le prochain repiquage (sélection sanitaire) et (5) l'arrachage des plants malades (*roguing*) pour réduire la propagation de la maladie. La sélection sanitaire des boutures et l'arrachage des plants malades sont des méthodes qui permettent de réduire les sources d'inoculum présent dans l'agro-écosystème et qui semblent être faciles à mettre en place par les agriculteurs. Néanmoins, l'arrachage des plants malades n'est pas une méthode populaire chez les agriculteurs car elle demande un investissement personnel qui s'accompagne souvent d'une diminution du rendement à court terme. Des travaux récents ont montré que la sélection de boutures saines est une stratégie efficace pour lutter contre les pertes de rendement en situation post-épidémique de la CMD sévère dans l'ouest du Kenya (Mallowa et al., 2011).

L'assainissement des plantes à multiplication végétative passe principalement par deux techniques : la thermothérapie et la culture de méristèmes (Astier et al., 2001). La thermothérapie est basée sur le traitement des boutures par la chaleur (Chant, 1959; Kaiser and Louie, 1982). Le principe de cette stratégie d'assainissement est d'inactiver les virus par des traitements thermiques sub-létaux. Les plants de manioc atteints de la CMD sont traités

à l'air chaud à une température de 37°C pendant 87 à 105 jours, tandis que les boutures sont mises dans un bain marie de 50 à 55°C pendant une dizaine de minutes. La culture *in vitro* de méristèmes indemnes de virus alors qu'issus d'une plante virosée est basée sur l'absence de virus dans les cellules méristématiques (Morel and Martin, 1955). Cette importante découverte a été largement exploitée dans le monde pour de nombreuses espèces à multiplication végétative afin d'éliminer de nombreux virus (Faccioli and Marani, 1998). D'autres études ont montré l'efficacité de la combinaison des deux méthodes pour produire des plants indemnes en virus (Kaiser and Teemba, 1979).

Dans le cas des maladies à transmission vectorielle comme la CMD, le contrôle des populations du vecteur est une des possibilités de lutte. Le principe est de réduire la dissémination des CMGs en contrôlant la population de l'insecte vecteur. Les principales méthodes de contrôles consistent à utiliser les insecticides et les ennemis naturels du vecteur. Par faute de moyens, les insecticides sont souvent difficilement accessible aux agriculteurs (Thresh and Cooter, 2005).

3.2. La sélection des variétés résistantes

La lutte contre les maladies par la sélection et l'utilisation de variétés résistantes aux virus représente la meilleure stratégie pour assurer une production acceptable en quantité et en qualité. Cette méthode reste largement acceptée par la société contrairement à l'utilisation de plantes transgéniques. La création des variétés résistantes nécessite la recherche de gènes ou de facteurs de résistances aux virus. Cette démarche consiste à étudier le comportement d'une collection de ressources génétiques d'origines très diverses vis-à-vis du virus concerné. Ces collections peuvent comporter des cultivars d'origines diverses et des formes « sauvages » de l'espèce ou d'espèces voisines. On considère comme facteur de résistance toute propriété d'une plante susceptible de perturber le développement du cycle biologique d'un virus au niveau de la plante ou de l'agrosystème.

Le développement des programmes de résistance du manioc à la CMD a commencé dans les années 1930s en parallèle en Tanzanie et à Madagascar. L'objectif principal a été d'augmenter le nombre de variétés résistantes disponibles en introduisant des génotypes

venant des autres régions/pays et en élaborant des programmes d'amélioration de la résistance variétale (Thresh and Cooter, 2005).

A Madagascar, une large collection de génotypes constitués par des variétés locales et des variétés introduites (Afrique, Asie et Océanie) ont été créées à la Station du Lac Alaotra (Cours et al., 1997). Des programmes de sélection et d'amélioration variétale y ont été effectués à partir de 1935. Les critères de sélection ont été principalement la résistance à la CMD et à la pourriture racinaire, mais aussi la vigueur végétative, le potentiel de rendement en tubercules et la teneur en amidon. De nouvelles variétés ont alors été créées par croisement intraspécifique entre des variétés à caractères intéressants et appréciées localement, mais aussi par croisement interspécifique en utilisant le *Manihot glaziovii* et le *M. pringlei*. Les premiers hybrides *M. esculenta* x *M. glaziovii* obtenus ayant présenté des niveaux intéressants de résistance, la sélection récurrente par *backcross* a été poursuivie afin d'obtenir des variétés à haut rendement, présentant de bonne qualité de tubercules et résistantes à la maladie. Enfin, dans les années 1940s, les nouvelles variétés améliorées ont été distribuées aux agriculteurs pour être multipliées.

Dans les années 1950s, des variétés sélectionnées en Tanzanie ont été envoyées au Nigeria pour alimenter le programme d'amélioration variétale de l'IITA. Dans les années 1970s, ce programme est devenu le programme d'amélioration variétale du manioc le plus important en Afrique. Les croisements du *M. glaziovii* avec *M. esculenta* et la sélection des hybrides résistants ont donné naissance aux variétés TMS (Tropical *Manihot* Series). Par la suite, ces variétés ont été croisées avec des variétés locales résistantes nommées TME (Tropical *Manihot esculenta*) collectées au Nigeria et dans d'autres régions d'Afrique de l'Ouest. Le croisement entre TME x TMS a donné des hybrides intéressants qui ont ensuite été distribués au Nigeria et dans plusieurs pays de l'Afrique de l'Est et du Sud (Kenya, Madagascar, Rwanda, Tanzanie et Ouganda) (Thresh and Cooter, 2005).

3.3. La transformation génétique pour la résistance

La possibilité offerte par les techniques du génie génétique de transférer rapidement, dans un génotype amélioré, un seul gène ou quelques gènes tout en conservant les autres

caractères d'intérêts, a ouvert des perspectives nouvelles explorées pour la lutte contre les virus.

L'idée d'utiliser un gène dérivé du génome du virus pour limiter l'infection virale (résistance dérivée du pathogène) a été formulée dans les années 1980s sous la forme d'un concept général pour tous les pathogènes (Wilson, 1993). Les résultats actuels sur les plantes transformées exprimant des gènes viraux permettent de différencier deux situations principales de résistance dérivée du pathogène. La première repose sur l'interaction directe du produit du transgène avec un élément du cycle virale. La deuxième concerne l'activation d'un mécanisme général de défense de la plante (ARN interférence ou *Silencing*), basée sur l'expression de séquences homologues de l'acide nucléique viral, conduisant à la dégradation spécifique et précoce de l'ARN messenger viral et des transcrits du gène transformant.

Concernant plus spécifiquement le modèle de la résistance du manioc aux agents pathogènes responsables de la CMD, plusieurs techniques ont été expérimentées : la réponse d'hypersensibilité de la plante (Zhang et al., 2003), la stratégie de l'ARN anti-sens (Zhang et al., 2005), l'introduction d'un gène toxique non viral activée par le virus (Hong et al., 1996) et l'introduction d'un gène viral (Chellappan et al., 2004). En 2003, Zhang *et al.* ont reporté l'utilisation de la technique basée sur la réponse d'hypersensibilité des plantes au virus pour limiter la propagation des virus. Les séquences codantes *barnase*¹ et *barstar* (extraites de *Bacillus amyloliquefaciens*) ont été insérées dans le génome d'une plante de manioc et mises sous contrôle du promoteur bidirectionnel de l'ACMV. En absence de géminivirus, le promoteur présente une faible activité. Les transgènes de *barnase* et de *barstar* s'expriment à un niveau similaire et aucune ARNase active n'est produite. Quand la plante est infectée par l'ACMV, la synthèse des protéines Rep (ORF AC1) et TrAP (ORF AC2) entraîne une augmentation du rapport *barnase/barstar* causant la production de ARNase active. Cette libération d'ARNase entraîne localement la mort des cellules végétales empêchant la propagation du virus. Cette technique a été testée sur la variété TMS 60444

¹ La *barnase* (*bacterial ribonuclease*) est une protéine à activité ribonucléasique, qui est létale pour les cellules quand elle s'exprime sans son inhibiteur *barstar*.

transformée et une réduction de la réplication virale entre 86-99% a été observée en comparant les plantes transgéniques et les plantes non transgéniques.

La technologie de l'ARN anti-sens a été utilisée pour développer du manioc transgénique résistant à l'ACMV (Zhang et al., 2005). La stratégie consiste à faire produire par des plantes transgéniques des ARNm anti-sens capables d'interférer avec les ARNm produits lors du cycle viral. Le choix des ARNm cibles a porté sur les protéines impliquées dans la réplication virale et dans la régulation de la transcription (Rep, TrAP et REn). L'utilisation de cette technique a révélé une forte réduction ou inhibition de la réplication de l'ACMV pour la plupart des lignées transgéniques. Les symptômes sont atténués et une diminution de la sévérité a été observée.

Les protéines inactivant les ribosomes (RIPs, ribosome-inactivating proteins) sont des protéines toxiques qui existent naturellement et qui manifestent une activité antivirale (Astier et al., 2001). Hong et al. (1996) ont montré que des plantes de *Nicotiana benthamiana* transgéniques, porteur de la dianthine (RIP isolée de *Dianthus caryophyllus*, *Caryophyllaceae*) mise sous contrôle du promoteur du brin sens de l'ACMV (ADN-A), expriment des lésions nécrotiques sur les feuilles lorsqu'elles sont inoculées avec l'ACMV. Les analyses des tissus suggèrent une accumulation virale réduite et des symptômes atténués.

Le mécanisme de *silencing* post-transcriptionnel (*post transcriptional gene silencing*, PTGS) est un mécanisme de défense naturelle des plantes contre les virus. Il vise à dégrader à la fois l'ARNm de la cellule hôte et l'ARNm viral (Vance and Vaucheret, 2001). Il en résulte la formation des courtes séquences d'ARN interférents (*short interfering RNAs*: siRNAs) d'environ 21-25 nucléotides. Ces siRNAs vont ensuite être impliquées dans le mécanisme de dégradation des molécules d'ARN transcrites. Il a été démontré que les bégomovirus du manioc sont capables d'induire le mécanisme de PTGS chez les plantes infectées et donc la production des ARN interférents (Chellappan et al., 2004). L'activation du PTGS et l'accumulation des ARN interférents a ainsi été corrélée avec la réduction de la sévérité des symptômes. La nouvelle stratégie de résistance dérivée du pathogène, basée sur l'utilisation de ce mécanisme de PTGS contre les CMGs, a été exploitée par Chellapan et al. (2004) pour transformer une variété de manioc sensible (TMS 60444) en une variété possédant un haut

niveau de résistance à plusieurs espèces de CMGs. Le gène AC1 de l'ACMV a été intégré dans la plante pour fournir la résistance à son virus homologue et à deux autres CMGs (EACMCV et SLCMV). L'accumulation de l'ADN viral chez ces plantes transgéniques a été réduite jusqu'à 98% par rapport aux plantes témoins. Des expériences similaires ont été effectuées par la suite (Taylor et al., 2012). Ainsi, l'intégration des gènes AC1 et AC2 de l'ACMV dans les plantes de la variété sensible (TMS 60444) a été efficace pour générer des plantes transgéniques résistantes à l'ACMV et à l'EACMV-UG.

Chapitre II

**Epidémiologie moléculaire de la
maladie de la mosaïque du manioc à
Madagascar**

Chapitre II

Epidémiologie moléculaire de la maladie de la mosaïque du manioc à Madagascar

Le manioc est une culture importante pour de nombreuses populations des régions tropicales, plus particulièrement les populations africaines. Il constitue l'un des aliments de base et contribue à la sécurité alimentaire de centaines de millions de personnes. Toutefois, sa culture rencontre des problèmes majeurs liés aux contraintes biotiques et notamment aux maladies virales. La maladie de la mosaïque du manioc est considérée comme la plus importante contrainte de production du manioc en Afrique (Legg and Fauquet, 2004). La CMD est causée par des bégomovirus qui sont transmis à la fois par l'utilisation de boutures de manioc infectées (transmission verticale) et par leur insecte vecteur *Bemisia tabaci* (*Aleyrodidae*) (transmission horizontale).

Suite à la pandémie de CMD sévère en Afrique de l'Est et centrale dans les années 1990s (Legg, 1999; Legg and Fauquet, 2004; Otim-Nape et al., 2000; Patil and Fauquet, 2010), de nombreuses études portant sur l'épidémio-surveillance de la CMD et le diagnostic des bégomovirus responsables de cette maladie ont été effectuées dans de nombreux pays de l'Afrique Sub-saharienne. Elles ont permis d'évaluer l'ampleur de la CMD sévère en analysant les différents paramètres épidémiologiques associés comme l'incidence de la maladie et la sévérité des symptômes (Gibson et al., 1996; Sseruwagi et al., 2004), l'abondance des populations de *B. tabaci* (Legg and Ogwal, 1998), le mode de propagation de l'infection et la cartographie de la présence de la maladie (Legg, 1999). Aussi, les premières observations de symptômes sévères de CMD ont rapidement été suivies par l'identification d'un variant recombinant suspecté d'être l'agent causal de la forme sévère de la maladie (EACMV-UG) (Deng et al., 1997; Zhou et al., 1997). Le suivi en Ouganda du front épidémique a cependant permis de montrer que la sévérité de la maladie était associée à l'infection mixte et à la synergie entre deux virus l'EACMV-UG et l'ACMV (Harrison et al., 1997; Pita et al., 2001a). La description d'une interaction synergique similaire au Cameroun entre l'ACMV et l'EACMCV (Fondong et al., 2000) a permis de démontrer que la synergie

virale représente vraisemblablement un phénomène biologique clef dans l'émergence des nouvelles maladies à bégomovirus (Legg and Fauquet, 2004).

Les objectifs de ce chapitre de thèse ont été (1) de réaliser une surveillance épidémiologique de la CMD à l'échelle de Madagascar et dans les principales régions productrices de manioc, et (2) d'identifier les principaux facteurs épidémiologiques associés (Article 1 en préparation pour *Plant Pathology*). Pour se faire, nous avons conduit plusieurs campagnes d'échantillonnages à Madagascar entre 2009 et 2011. Au-delà de la récolte d'échantillons analysés moléculairement par la suite, la sévérité, la présence d'aleurodes ainsi que d'autres paramètres épidémiologiques ont été enregistrés.

Le diagnostic PCR a permis de détecter la présence d'une diversité inédite de six espèces de CMGs dans les échantillons de manioc : l'*African cassava mosaic virus* (ACMV), l'*East African cassava mosaic Cameroon virus* (EACMCV), l'*East African cassava mosaic Kenya virus* (EACMKV), l'*East African cassava mosaic virus* (EACMV), le *South African cassava mosaic virus* (SACMV) et une nouvelle espèce virale nommée *Cassava mosaic Madagascar virus* (CMMGV ; cf. chapitre III, Article 2 accepté dans *Archives of Virology*).

L'analyse de ces données nous a permis de corrélérer la prévalence de la CMD et l'abondance de *Bemisia tabaci* avec l'altitude, et identifier que la contamination des plantes était principalement associée à l'utilisation de boutures de manioc contaminées. Par ailleurs, 21% des échantillons de manioc collectés se sont révélés être co-infectés par les membres de deux (15%), trois (5%), voire quatre (1%) espèces de CMGs. Bien que ces espèces virales puissent être trouvées en infection simple ou mixte, la prévalence pour chaque virus semble être différente. En effet, l'EACMCV est plus fréquemment trouvé en infection mixte en comparaison de l'ACMV et du SACMV. Nos analyses démontrent aussi que la sévérité des symptômes de CMD est significativement plus élevée en infection mixte par rapport aux infections simples.

En ce qui concerne la répartition géographique des virus, l'ACMV est plutôt prévalent en altitude (>800m), notamment dans la région des Hauts-Plateaux et dans la zone côtière Est, tandis que les EACMV-like sont plus prévalents dans les zones côtières de basse altitude (0-200m). L'existence d'infections mixtes et le recouvrement des aires de distributions des

CMGs à Madagascar suggèrent des conditions très favorables d'évolution des CMGs par recombinaison.

Nos travaux en épidémiologie moléculaire fournissent des informations essentielles sur les paramètres épidémiologiques de la CMD à Madagascar et pour orienter les futurs programmes de gestion et de lutte contre cette maladie. Néanmoins, des analyses moléculaires plus fines seront nécessaires pour identifier la diversité génétique des CMGs, définir leurs liens de parenté avec les CMGs d'Afrique continentale, et retracer leur histoire évolutive.

Molecular epidemiology of cassava mosaic disease in Madagascar

M. Harimalala^{1,2,3}, F. Chiroleu¹, C. Giraud-Carrier¹, M. Hoareau¹, A. Andriamampianina⁴, S. Velombola⁴, S. Ranomenjanahary⁴, A. Andrianjaka³, B. Reynaud¹, P. Lefeuvre¹ and J.-M. Lett^{1*}

¹CIRAD, UMR PVBMT, Pôle de Protection des Plantes, 7 Chemin de l'IRAT, 97410 Saint-Pierre, Ile de La Réunion, France

²Université de La Réunion, UMR PVBMT, Pôle de Protection des Plantes, 7 Chemin de l'IRAT, 97410 Saint-Pierre, Ile de La Réunion, France

³Université d'Antananarivo, Faculté des Sciences, BP 906 Antananarivo, Madagascar

⁴FOFIFA, Laboratoire de Pathologie Végétale, BP 1444, Ambatobe, Madagascar

*Author for correspondence; E-mail: lett@cirad.fr

Abstract

While cassava is the staple food for hundreds of millions of African people, its cultivation is seriously constrained with the cassava mosaic disease (CMD) in Madagascar and in Africa in general. In this study, we identified the viral species involved in CMD in Madagascar and determined the epidemiological characteristics associated. To do this, countrywide surveys were carried out to collect cassava leaf samples and to assess epidemiological parameters of CMD. Molecular diagnosis of cassava mosaic geminiviruses (CMGs) in Madagascar revealed an unprecedented diversity of six species: *African cassava mosaic virus* (ACMV), *East African cassava mosaic Cameroon virus* (EACMCV), *East African cassava mosaic Kenya virus* (EACMKV), *East African cassava mosaic virus* (EACMV), *South African cassava mosaic virus* (SACMV) and the new species *Cassava mosaic Madagascar virus* (CMMGV). Distinct geographical distributions were observed for the six species. While ACMV was more prevalent in central highlands, EACMV and EACMKV were prevalent in lowlands and coastal regions. Both EACMCV and SACMV occurred in almost all the localities visited. PCR diagnosis revealed that mixed infection (up to four co-infected viruses) occurred in 21% of the samples and were associated with an increase of the symptom severity score. Pairwise comparisons of virus associations suggested that EACMCV was more often than expected found in mixed infection while ACMV and SACMV were rather found in single infection. Higher abundance of *Bemisia tabaci* was observed for lowlands. Nevertheless, infected cuttings remain the primary source of CMD propagation (95%) in Madagascar.

Keywords: cassava mosaic geminiviruses, molecular diagnosis, altitude, mixed infection, severity, prevalence, infected cuttings, whitefly abundance

Introduction

Cassava is the third most important source of calories in the tropics, after rice and maize (FAO, 2008). It is a staple food for hundreds of millions of African people and concerns mainly poor farmers which are both producers and consumers. This plant is renowned for its high tolerance to drought and productivity on poor soils. Annual production is estimated to 121 million tons (MT) in Africa mainland and 3 MT in Madagascar (FAOSTAT, 2010).

Although cassava has an important agronomic potential, this crop faces up to biotic constraints

such as pests and virus diseases which impede its production. Among these, two distinct virus diseases top as the major constraints on cassava production in Africa: the cassava mosaic disease (CMD) and the cassava brown streak disease (CBSD). These viral diseases have been reported to occur since 1894 (Warburg, 1894) and in 1930s (Storey, 1936) respectively, and have become increasingly damaging in recent years (Legg et al., 2011). CMD severe epidemic has first been reported in Uganda in the late 1980s (Otim-Nape et al., 1994). High incidence of disease associated with severe CMD symptoms and abundance of whitefly vector

have been observed. Epidemic has devastated Uganda's cassava production and caused important losses estimated to USD 60 million between 1992 and 1997 (Otim-Nape et al., 1997). The disease later spread to the neighbouring countries causing pandemic in eastern and central Africa in the 1990s (Legg & Fauquet, 2004, Otim-Nape et al., 2000). Yield loss is estimated at over one-third of the total production of cassava in Africa (Legg et al., 2006). In Madagascar, CMD was at an endemic stage before 1934 (François, 1937) and its impact on yield was insignificant. From 1934, an increase in CMD incidence and severity were observed and spread of the disease occurred at first around the areas of Alaotra (in central highlands). Then after, it has affected all the cassava-growing regions of the country within two years (Cours et al., 1997).

CMD is caused by a complex of cassava mosaic geminiviruses (CMGs, Family *Geminiviridae*, Genus *Begomovirus*) which are transmitted by the whitefly *Bemisia tabaci* (Genn.) or by the use of infected cuttings (for review (Patil & Fauquet, 2009)).

Since the report of the pandemic in Africa, numerous studies on the etiology of CMD were carried out to identify epidemiological characteristics and CMG species associated with this disease. Seven CMG species with *African cassava mosaic virus* (ACMV), *East African cassava mosaic Cameroon virus* (EACMCV), *East African cassava mosaic Kenya virus* (EACMKV), *East African cassava mosaic Malawi virus* (EACMMV), *East African cassava mosaic virus* (EACMV), *East African cassava mosaic Zanzibar virus* (EACMZV) and *South African cassava mosaic virus* (SACMV) have been recognized to occur in Africa (Brown et al., 2011). Recently, two putative new CMG species, the *African cassava mosaic Burkina Faso virus* (ACMBFV) (Tiendrébéogo et al., 2012) and the *Cassava mosaic Madagascar virus* (CMMGV) (Harimalala et al., 2012) have been reported.

While the CMD continues to damage cassava in Madagascar, few epidemiological data are available and molecular data of CMGs are lacking. Nevertheless, serological methods suggested the occurrence of three CMG species with ACMV, EACMV and SACMV (Ranomenjanahary et al., 2002). Consequently,

molecular epidemiology becomes necessary to (1) update the information on the status of cassava culture and CMD in Madagascar and to (2) determine epidemiological characteristics associated with CMD. Thus, countrywide surveys were carried out in Madagascar and epidemiological parameters associated with CMD were assessed. Cassava leaf samples collected were used for molecular diagnosis of the CMGs involved. Statistical analyses were performed using molecular data obtained and epidemiologic data recorded on fields. Our study revealed that altitude and co-infection are the main factors driving respectively the prevalence and the severity of the disease while propagation of the disease is mainly due to poor cutting health.

Materials and methods

Epidemiological surveys of cassava mosaic disease in Madagascar

Surveys were conducted between 2009 and 2011 throughout Madagascar in 134 localities. The locality name, the geographical coordinates (latitude, longitude) and the altitude of sampling sites were recorded. Several parameters associated with CMD were assessed. The prevalence of disease was evaluated by counting symptomatic plants among 30 plants chosen along a diagonal transect (Sseruwagi et al., 2004). The abundance of whitefly population was assessed by counting the number of adult whiteflies on the five youngest apical leaves of the plant (Fargette, 1985). The CMD symptom severity scores were rated using a scale ranging from 0 (no symptom) to 5 (very severe symptom) (Cours, 1951). The origin of infection was recorded before sampling cassava leaves: whitefly-derived infections cause disease symptoms only on the upper-most leaves, whereas cutting-derived infections also cause symptoms on the lowest first-formed leaves (Sseruwagi et al., 2004). Note that cutting-derived infections may be followed by whitefly-derived infections. Thus, the real proportion of the cutting-derived infections and the whitefly-derived infections may change accordingly. Cassava leaf samples displaying different severity scores (mild symptom, severe symptom and sometimes healthy plant) were collected and conserved by dehydration.

Molecular diagnosis of cassava mosaic geminiviruses

Total DNA was extracted from cassava leaves using the DNeasy® Plant kit (Qiagen). Based on nucleotide sequences of CMGs available on GenBank (September 2009), sets of primer pairs were designed (Table 1). A degenerate primer pair was used for CMG detection while specific primer pairs were used for the specific detection of ACMV, EACMCV, EACMKV, EACMV, SACMV, the Uganda strain of EACMV (EACMV-UG) and the new species CMMGV (Harimalala et al., 2012). PCR reactions and visualizations of amplicons were performed as described previously (Delatte et al., 2005).

Geographical distribution of CMGs in Madagascar

Geographical distribution of CMGs in Madagascar was established using the SIG software ArcGIS. Map of Madagascar was divided into square pixels of 100km x 100km arranged in a grid. Geographic coordinates recorded during samplings (longitude and latitude) were used to position virus onto the

grid. For each square, the prevalence of each CMG species was determined by calculating the ratio of the number of virus of each species to the total of virus detected.

Statistical approach for data analysis

Statistical analyses were performed using the R software (v.2.15.0, R Development Core Team, 2012). The altitude recorded during samplings were grouped into three intervals with low altitude (0-200m), mid-altitude (200-800m) and high altitude (>800m). Then, the effect of the altitude class on the prevalence of CMD, on the distribution of *B. tabaci* and on the distribution of virus species was tested by pairwise comparisons of proportions using Fisher's Exact test with Holm's correction at level 5%. Pairwise comparisons of proportions method using BH *p*-value adjustment (Benjamini & Hochberg, 1995) was used to detect whether any virus tended to be more present in single rather than in mixed infection or conversely. The relation between the types of infection (number of mixed-infected virus) and the severity scores was determined using Fisher's exact test.

Table 1: Pairs of primer used to amplify viral DNA from cassava leaf samples collected in Madagascar

Virus species/variant	Primer names	Sequences of primers (5' - 3')	Expected size of amplicons (bp)
CMGs	VD1863-A-CMG	TCRTCAATGACGTGTGTACCA	528
	C6D2391-A-CMG	TTTCCAYCCVAACATTCA	
ACMV	VD590-ACMV-A	CCTTGGTATCTGTAAGGTR	820
	C1410-ACMV-A	CAACAACGACCATTCTGCT	
EACMCV	F1197-EACMCV-A	ACATGATGCACTGCATCT	522
	R1719-EACMCV-A	GAGGACAAGAATTCCAATC	
EACMKV	F316-EACMV-EACMKV-A	GGTTCTACGGTGTAAGAG	1956
	R2272-EACMKV-SACMV-A	CAACAATCCGCCAATGAC	
EACMV	F316-EACMV-EACMKV-A	GGTTCTACGGTGTAAGAG	2173
	R2489-EACMV-A	TGCCTCATCTCCATGTTC	
EACMV-UG	V590-ACMV-EACMV-UG-A	CCTTGGTATCTGTAAGGTGA	1681
	R2271-EACMV-UG-A	CCAGCATTTAGCTCAGGT	
SACMV	F441-SACMV-A	CAAGGCACAAACAAGCGT	712
	R1153-SACMV-A	CACTCCAGGTTACGGAGC	
CMMGV	F461-CMMGV-A	CAGGCACAAGCAAGTTCA	1127
	R1588-CMMGV-A	AGACGTATCGACCTAAGC	

The following IUB group codes were used to identify redundancies: R=A/G, Y=C/T, V=A/C/G

Results

Molecular diagnosis revealed diversity of CMGs

On the 708 cassava leaves samples collected during the survey, 449 (63%) were detected as infected by CMG using the degenerated PCR primer pair. The positive samples were then diagnosed by PCR using specific primer pairs. Six CMG species were identified as occurring in Madagascar which ACMV (30%; n=133), EACMCV (18%, n=82), EACMKV (15%; n=68), EACMV (3%; n=14), SACMV (35%; n=159) and CMMGV (0.2%; n=1). The latter was identified only in a single sample and is also described in Harimalala et al. (2012). EACMV-UG was not detected in any of the leaf samples tested.

Geographical distribution of CMGs in Madagascar

After having positioned samples over a geographical grid (Figure 1), distributions of CMG species was analyzed. It was apparent that ACMV was more prevalent in central highlands and eastern coastal although it also occurred in northern, western and southern coastal areas. EACMV occurred mostly in the western coastal part of the country and was absent in the eastern region. EACMCV was detected almost everywhere in Madagascar with a high prevalence in the northern region. EACMKV was detected everywhere with low prevalence except for the south western coastal region where it infects most of the samples. Finally, the SACMV species was detected throughout the country and with high prevalence in the north western region, eastern and the south eastern lowlands.

Effect of altitude on distribution of CMGs

As the analysis of the CMG species distribution apparently indicates differential population composition depending on the altitude, we group the viruses from each species in three altitude classes (Figure 2) with low altitude (0-200m),

mid-altitude (200-800m) and high altitude (>800m) before testing for statistical differences between viruses species. ACMV was more prevalent in high altitude (>800m) with 58% (77/133) of the samples, collected at this altitude, being infected by this virus species. ACMV was also present in 31% and 11% of the samples collected respectively in low- (0-200m) and in mid-altitude (200-800m) (respectively 41/133 and 15/133). Conversely, EACMV-like viruses and SACMV were more prevalent in samples collected in low altitude with 66% of the EACMCV (54/82), 93% of the EACMV (13/14), 75% of the EACMKV (51/68) and 72% of the SACMV (114/159) being detected in this altitude class. Pairwise comparisons using Fisher's exact test confirmed that the altitude distribution of ACMV was very significantly different ($P < 0.001$) of that of the other CMG species.

Occurrence of mixed infection of CMG species and effect on severity scores

While single infection consisted of 53% (237/449) of the samples tested, the use of specific primer pairs revealed the occurrence of mixed infection of CMGs in 21% of the samples tested (94/449). Mixed infection consisted of double (15%; 67/449), triple (5%; 22/449) and quadruple infections (1%; 5/449). For the remaining 118 samples, no viruses were detected with any of the seven specific primer pairs.

The relation between the types of infection (single or mixed infection) and the severity scores was studied (Figure 3). While most of the single infected samples (153/179) presented severity scores from 1 to 3, most of the double- (38/43) and triple- (7/12) infected samples presented severity scores from respectively 2 to 4 and 3 to 4. Plants infected by four virus species were severely attacked (score=4). Fisher's exact test confirmed that mixed infection by several viruses was correlated with an increase in the severity score ($P = 0.02$). Note that there were symptom-free samples which were infected by one or two viruses.

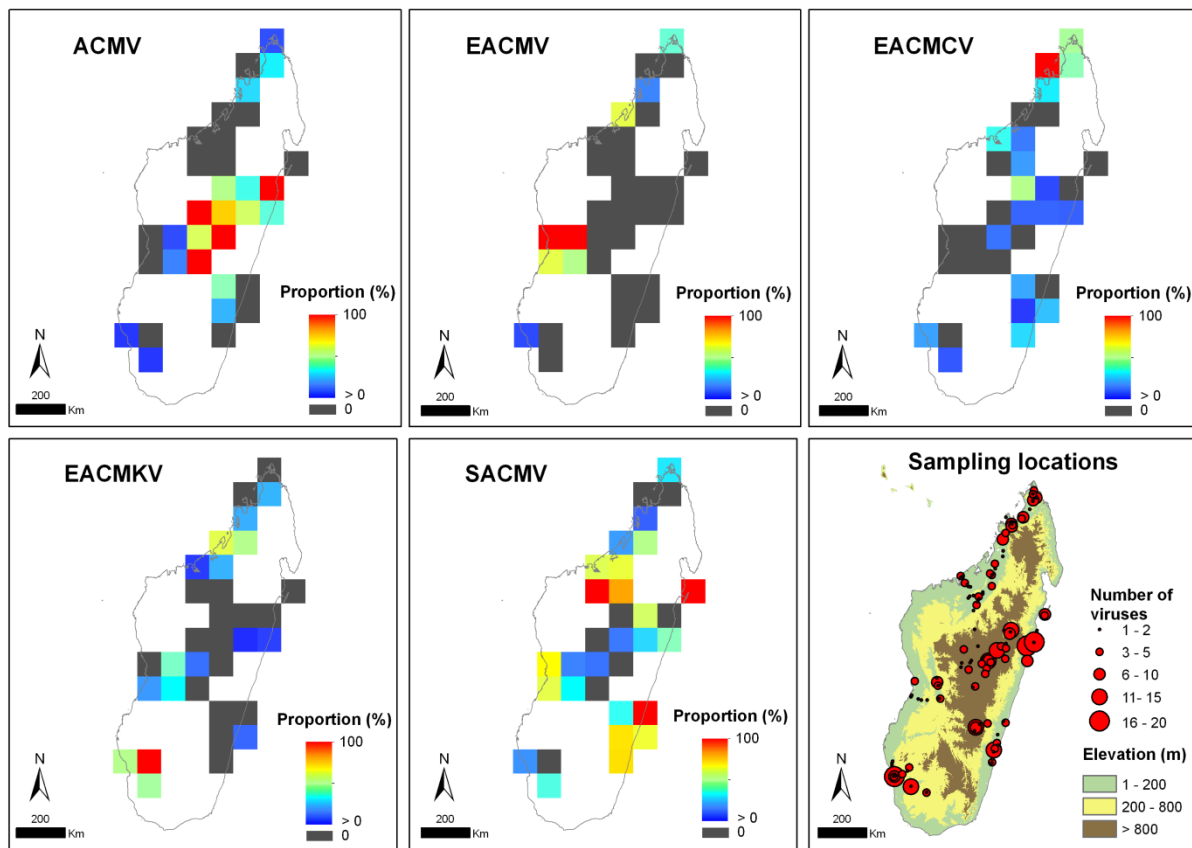


Figure 1: The geographical distribution of CMG species in Madagascar. The first five maps represent the geographical distribution of the five CMG species detected with ACMV, EACMV, EACMCV, EACMKV and SACMV. Each map was divided into a grid with a 100km x 100km resolution. Each square was coloured according to the proportion of virus species detected (%) calculated by the ratio of the number of virus to total of virus. The sixth map showed the sampling locations, the number of viruses detected for each location and the three classes of altitude (low altitude: 0-200m; mid-altitude: 200-800m and high altitude: >800m).

CMGs may be found in single and mixed infection with different proportions

Each of the five virus species detected by PCR was found as well in single or in mixed infection. However, the proportion of virus found in single or in mixed infection varied from one virus species to another (Table 2). We have therefore tested for evidence of differences in the proportion of mixed infections. Interestingly, ACMV ($P=0.02$) and SACMV ($P<0.001$) occurred more frequently in single infection (54% and 60% respectively). EACMCV was more frequently found in mixed infection (67% of the samples tested). Nevertheless, no statistical differences were observed between EACMV, EACMKV and EACMCV. While the EACMV present a higher proportion of single infections (57%), the low number of viruses detected doesn't provide enough statistical power.

Effect of the altitude on the prevalence of CMD

After grouping samples in altitude and prevalence class, it was apparent that the prevalence of CMD decreased with increasing altitude (Figure 4). Respectively 91% and 85% of fields presenting with high (68-100%) and medium (34-67%) CMD prevalence were found in the low altitude class (0-200m). Conversely, most of the low prevalence fields (0-33%) were recovered in mid-altitude (200-800m; 38%) and in high altitude (>800m; 43%). Pairwise comparisons using Fisher's exact test confirmed that prevalence observed in the low altitude was very significantly different of that observed in mid- and high altitude ($p\text{-value}<0.001$).

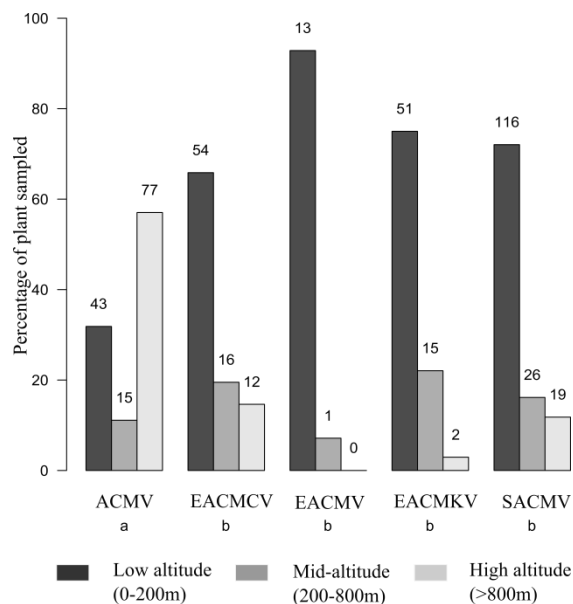


Figure 2: Distribution of cassava begomovirus species depending on the altitude. The recorded values for altitude were grouped into three classes with low altitude (0-200m; dark grey-coloured bars), mid-altitude (200-800m; middle grey-coloured bars) and high altitude (>800m; light grey-coloured bar). The height of each bar corresponds to the number of plants infected by a CMG species from a given class of altitude. The number of plants is given at the top of each bar. The virus species having different letters under their name are very significantly different ($P < 0.001$) regarding the altitude class proportions.

Effect of altitude on the abundance of *B. tabaci*

During the surveys, the whitefly abundance was assessed on the five upper leaves of collected plants (Table 3). Statistical analysis revealed significant differences in whitefly prevalence depending on the altitude class ($P < 0.001$). In low altitude (0-200m), 60% of the plants sampled were colonized by at least one whitefly. Although 58% of the plants sampled in mid-altitude (200-800m) were not colonized, the remaining 33% were still colonized by 1 to 5 whiteflies. Conversely, in high altitude (>800m), there was no whitefly detected on most of the plants (92%).

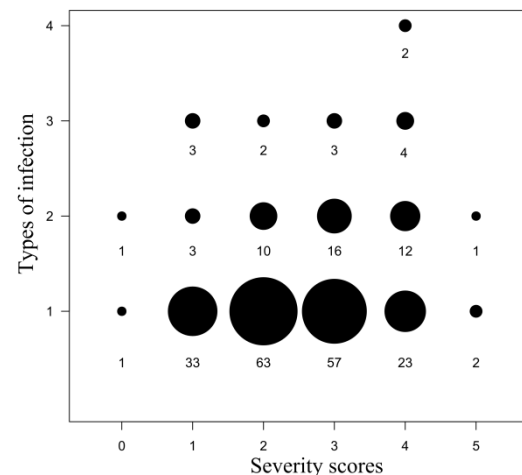


Figure 3: Relation between the cassava mosaic disease symptom severity scores and the types of infection. The x-axis displays the different severity scores ranging from no symptom (0) to very severe symptom (5) while the y-axis displays the different types of infection with single (1), double (2), triple (3) and quadruple (4) infections. The area of each circle is proportional to the number of plants (number under each circle) included in each class.

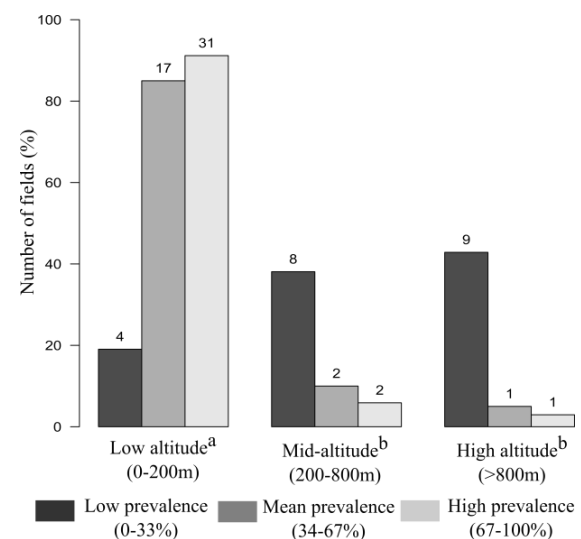


Figure 4: The effect of the altitude on the prevalence of cassava mosaic disease. The recorded values for altitude were grouped into three classes which are low altitude (0-200m), mid-altitude (200-800m) and high altitude (>800m). The calculated values of prevalence for each field were grouped into three classes with low prevalence (0-50%, dark grey), medium prevalence (50-75%, middle grey) and high prevalence (76-100%, light grey). The height of each bar corresponds to the number of fields belonging to a given class. The number of fields belonging to a class is given at the top of each bar. The classes of altitude followed by the same letter are not significantly different according to the classes of prevalence (pairwise comparisons of proportions using Fisher's exact test with Holm's correction at $P < 0.05$).

Table 2: Proportion of CMG species found in single and in mixed infection

Types of infection	Virus species				
	ACMV	EACMCV	EACMV	EACMKV	SACMV
Single infection (%)	73 (54)	27 (33)	8 (57)	34 (47)	97 (60)
Mixed infection (%)	62 (46)	55 (67)	6 (43)	36 (53)	64 (40)
Significance*	a	b	ab	ab	a

*The numbers having different letters are significantly different at $P=0.05$

The origin of CMD infection

The assessment of the origin of infection on fields allowed to identify that cutting-derived infection concerned globally 95% of the diseased plants (253/265). The remaining diseased plants (5%, 12/265) were infected via the transmission by the whitefly (Supplementary table 1). As mentioned above (cf. Materials and Methods), the cutting-derived infections may implicate post-infection via whitefly. Thus, estimation of the real proportions of whitefly- (N_{tw}) and cutting-derived (N_{tc}) infections is necessary. N_{tw} corresponds to the whitefly-only-derived infections (N_w) and the cutting-followed-whitefly-derived infections (N_{cw}) while N_{tc} corresponds to the cutting-only-

derived infections (N_c) and N_{cw} . To do this, the estimation is based on the assumption that the proportion of whitefly-derived infected plants (N_w/N_h+N_w) is equal to the proportion of cutting-derived infected plants (N_{cw}/N_c+N_{cw}); N_h is the proportion of healthy plants. The calculation of proportions has been performed according to the three classes of altitude which are low- (0-200m), mid- (200-800m) and high altitude (>800m). This calculation is detailed in the supplementary table 1. The real proportions of whitefly-derived infected plants (N_{tw}) were estimated to be 72%, 35% and 0% in low-, mid- and high altitude respectively. While the proportions of cutting-infected plants (N_{tc}) were 97%, 84% and 100% according to the above classes of altitude.

Table 3: The effect of the altitude on the distribution of *Bemisia tabaci*

Classes of altitude	Numbers of plants sampled			Significance*
	W=0	W=1-5	W>5	
low altitude (0-200m) (%)	77 (40)	54 (28)	60 (32)	a
Mid-altitude (200-800m) (%)	33 (58)	19 (33)	5 (9)	b
High altitude (>800m) (%)	102 (92)	7 (6)	2 (2)	c

W = number of adult whiteflies

*The classes of altitude with different letters are very significantly different according to the abundance of whitefly ($P<0.001$).

Discussion

This study intended to characterize molecularly the viral species associated with CMD in Madagascar and to assess the epidemiological characteristics associated. Molecular diagnosis allowed to identify the occurrence of six CMG species and the possibility of mixed infection.

The occurrence of double infection of CMGs has been reported in several studies carried out in Africa: infection of ACMV and EACMCV in Cameroon, in Ivory Coast and in Nigeria (Ariyo et al., 2005, Fondong et al., 2000, Pita et al., 2001a) and infection of ACMV and EACMV-UG in Uganda (Pita et al., 2001b). Triple infection of ACMV, EACMV and EACMV-UG

were reported in Burundi (Busogoro et al., 2008). To our knowledge, this is the first description of mixed infection implicating four CMG species in cassava. It reflects the importance of CMD pressure on cassava in Madagascar. The increase in symptom severity score of mixed infected plants may suggest synergistic interaction between viruses during infection or occurrence of more aggressive virus in mixed infection. Biological tests should confirm this hypothesis. Nevertheless, such studies were carried out in Africa continent and allowed to confirm that mixed infection of CMGs resulted in a synergistic interaction causing severe symptoms (Fondong et al., 2000, Patil & Fauquet, 2009, Pita et al., 2001b). In addition, the occurrence of plants co-infected

with viruses increases the risk of recombination and re-assortment of DNA molecules which may cause the emergence of more severe variant (Ndunguru et al., 2005, Pita et al., 2001b, Zhou et al., 1997).

EACMCV has been detected frequently in mixed infected samples. This fact has already been reported in Ivory Coast (Pita et al., 2001a), in Nigeria (Ariyo et al., 2005) and in Cameroon (Fondong et al., 2000). More generally, EACMV-like viruses were rarely found in single infection in Central and West Africa (Legg & Fauquet, 2004). In any case, this study confirmed that all of the five virus species detected could be present in single infection or associated in mixed infections.

The different CMG species displayed distinct geographical distributions in Madagascar that seemed associated with the altitude: ACMV mainly in central highlands, EACMV and EACMKV in lowlands and coastal regions, EACMCV and SACMV throughout the country. Importantly, distributions areas overlap and 21 % of the samples were reported as co-infected. A clear effect of the altitude on the prevalence of CMD has been observed. A previous study in Madagascar has already reported that the greater the altitude the less the incidence of CMD (Cours et al., 1997). In Tanzania, a significant negative correlation between incidence and altitude has been shown (Legg & Raya, 1998). In addition, the same situation was observed in D.R. Congo (Bisimwa Basengere, 2012).

The altitude has also an effect on the abundance of *B. tabaci*. Whitefly populations were more abundant in low altitude (0-200m) than in mid- or high altitude (respectively 200-800m and >800m). Previous studies carried out in Tanzania has reported the same fact with a greater whitefly vector activity at about 170m above sea level than at a relatively cool site about 900m (Legg, 1994). In fact, *B. tabaci* does not adapt well to elevations exceeding 1000m (Morales & Jones, 2004).

As regards the origin of infection, our results suggested that the contribution of infected cuttings in CMD infection was high (more than 89% of infected plants for each altitude class) and constant within the three classes of altitude while the contribution of *B. tabaci* in CMD infection was lower but variable according to the classes of altitude: high proportion of whitefly-

derived infections in low altitude (0-200m) and no whitefly-derived infection in high altitude (>800m) (Supplementary table 1). Other environmental factors such as temperature and rainfall probably influence the whitefly activities and may consequently modify CMD dynamic. Nevertheless, as the infection of CMD is primarily due to the use of infected cuttings (>89% of the plants observed) rather than via the transmission by the insect vector, whiteflies may only partly explain the CMD dynamic. The use of infected cuttings for planting combined with the abundance of whiteflies increase the risk of spread of the disease.

This study confirms that CMD represents an important constraint to cassava production in Madagascar, describes an unprecedented diversity of six CMGs with a distinct geographical distribution, reveals that up to four mixed infection can occur with an increase in the severity of CMD symptoms, and finally demonstrates that cuttings are the primary source of CMD transmission (95%) in Madagascar. The prevalence and the severity of the disease, the synergistic effect of mixed infections and the risk of emergence of more severe variant by recombination suggest the need for an urgent intervention through the implementation of control strategies, based in particular on the awareness of farmers to CMD, the use of phytosanitary procedures and the deployment of resistant varieties.

Acknowledgements

This study was funded by the European Union (FEDER), the *Région Réunion* and CIRAD. MH is a recipient of a PhD fellowship for Regional Cooperation from the *Conseil Régional de La Réunion*.

References

- Ariyo OA, Koerbler M, Dixon AGO, Atiri GI, Winter S, 2005. Molecular variability and distribution of cassava mosaic begomoviruses in Nigeria. *Journal of Phytopathology* **153**, 226-31.
- Benjamini Y, Hochberg Y, 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal*

Statistical Society. Series B (Methodological), 289-300.

Bisimwa Basengere E, 2012. *Epidemiology, genetic diversity, distribution and control of cassava mosaic viruses and its vector (Bemisia tabaci) in South Kivu region, Democratic Republic of Congo*. Belgium: Université Catholique de Louvain, PhD Thesis.

Brown JK, Fauquet CM, Briddon RW, Zerbini M, Moriones E, Navas-Castillo J, 2011. Family Geminiviridae. In: King MQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz E, eds. *Virus taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press 351-73.

Busogoro JP, Masquellier L, Kummert J, Dutrecq O, Lepoivre P, Jijakli MH, 2008. Application of a simplified molecular protocol to reveal mixed infections with Begomoviruses in Cassava. *Journal of Phytopathology* **156**, 452-7.

Cours G, 1951. Manioc in Madagascar. *Mémoire de l'Institut Scientifique de Madagascar, Série B, Biologie Végétale* **3**, 203-400.

Cours G, Fargette D, Otim-Nape GW, Thresh JM, 1997. The epidemic of cassava mosaic virus disease in Madagascar in the 1930s-1940s: lessons for the current situation in Uganda. *Tropical Science* **37**.

Delatte H, Martin DP, Naze F, *et al.*, 2005. South West Indian Ocean islands tomato begomovirus populations represent a new major monopartite begomovirus group. *Journal of general virology* **86**, 1533-42.

Fargette D, 1985. *Epidémiologie de la mosaïque africaine du manioc en Côte d'Ivoire*. Montpellier: Université des Sciences et Techniques du Languedoc, PhD Thesis.

Fondong VN, Pita JS, Rey MEC, De Kochko A, Beachy RN, Fauquet CM, 2000. Evidence of synergism between African cassava mosaic virus and a new double-recombinant geminivirus infecting cassava in Cameroon. *Journal of general virology* **81**, 287-97.

François E, 1937. Un grave peril: La mosaïque du manioc. *Agronomie Coloniale* **26**, 33-8.

Harimalala M, Lefeuvre P, De Bruyn A, *et al.*, 2012. A novel cassava-infecting begomovirus from Madagascar: cassava mosaic Madagascar virus. *Archives of Virology*, 1-4.

Legg JP, 1994. *Bemisia tabaci*: The whitefly vector of cassava mosaic geminiviruses in Africa: An

ecological perspective. *African Crop Science Journal* **2**, 437-48.

Legg JP, Fauquet CM, 2004. Cassava mosaic geminiviruses in Africa. *Plant molecular biology* **56**, 585-99.

Legg JP, Jeremiah SC, Obiero HM, *et al.*, 2011. Comparing the regional epidemiology of the cassava mosaic and cassava brown streak virus pandemics in Africa. *Virus Research* **159**, 161-70.

Legg JP, Owor B, Sseruwagi P, Ndunguru J, 2006. Cassava mosaic virus disease in East and Central Africa: epidemiology and management of a regional pandemic. In: Thresh JM, ed. *Advances in Virus Research, Plant Virus Epidemiology*. Kent, United Kingdom: Elsevier Academic Press, 355-418. (Maramorosch K, Shatkin AJ, eds. 67.)

Legg JP, Raya MD, 1998. Survey of cassava virus diseases in Tanzania. *International Journal of Pest Management* **44**, 17-23.

Morales FJ, Jones PG, 2004. The ecology and epidemiology of whitefly-transmitted viruses in Latin America. *Virus Research* **100**, 57-65.

Ndunguru J, Legg JP, Aveling TaS, Thompson G, Fauquet CM, 2005. Molecular biodiversity of cassava begomoviruses in Tanzania: evolution of cassava geminiviruses in Africa and evidence for East Africa being a center of diversity of cassava geminiviruses. *Virology journal* **2**, 21.

Otim-Nape G, Bua A, Thresh J, *et al.*, 2000. The current pandemic of cassava mosaic virus disease in East Africa and its control. *Natural Resources Institute, Chatham, UK*.

Otim-Nape GW, Bua A, Baguma Y, 1994. Accelerating the transfer of improved production technologies: Controlling African cassava mosaic virus disease epidemics in Uganda. *African Crop Science Journal* **2**, 479-95.

Otim-Nape GW, Bua A, Thresh JM, *et al.*, 1997. *Cassava mosaic virus disease in Uganda: the current pandemic and approaches to control*. Natural Resources Institute (NRI).

Patil BL, Fauquet CM, 2009. Cassava mosaic geminiviruses : actual knowledge and perspectives. *Molecular plant pathology* **10**, 685-701.

Pita JS, Fondong VN, Sangaré A, Kokora RNN, Fauquet CM, 2001a. Genomic and biological diversity of the African cassava geminiviruses. *Euphytica* **120**, 115-25.

- Pita JS, Fondong VN, Sangaré A, Otim-Nape GW, Ogwal S, Fauquet CM, 2001b. Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda. *Journal of general virology* **82**, 655-65.
- Ranomenjanahary S, Rabindran R, Robinson DJ, 2002. Occurrence of three distinct begomoviruses in cassava in Madagascar. *Annals of Applied Biology* **140**, 315-8.
- Sseruwagi P, Sserubombwe WS, Legg JP, Ndunguru J, Thresh JM, 2004. Methods of surveying the incidence and severity of cassava mosaic disease and whitefly vector populations on cassava in Africa: a review. *Virus Research* **100**, 129-42.
- Storey HH, 1936. Virus Diseases of East African Plants: IV. A Survey of the Viruses attacking Gramineae. *East African Agricultural Journal* **1**, 333-7.
- Tiendrébéogo F, Lefeuvre P, Hoareau M, *et al.*, 2012. Evolution of African cassava mosaic virus by recombination between bipartite and monopartite begomoviruses. *Virology journal* **9**, 67.
- Warburg OH, 1894. Die kulturpflanzen usambaras. *Mitteilung Deutsch Schutzgeb* **7**, 131.
- Zhou X, Liu Y, Calvert L, *et al.*, 1997. Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. *Journal of general virology* **78**, 2101-11.

Chapitre III

**Caractérisation moléculaire et analyses
phylogénétiques de nouvelles espèces de
bégomovirus et d'alphasatellite associées
à la maladie de la mosaïque du manioc à
Madagascar**

Chapitre III

Caractérisation moléculaire et analyses phylogénétiques de nouvelles espèces de bégomovirus et d'alphasatellite associées à la maladie de la mosaïque du manioc à Madagascar

L'inventaire des agents pathogènes impliqués dans les maladies des cultures est une étape primordiale dans la recherche de moyens de lutte appropriés contre ces maladies. La mise en œuvre d'outils de diagnostic moléculaire adéquat et le suivi épidémiologiques des agents pathogènes impliqués dans une maladie nécessitent au préalable leur caractérisation au niveau moléculaire. Pour une maladie virale associée à plusieurs espèces comme la maladie de la mosaïque du manioc, la caractérisation moléculaire du complexe d'espèces de bégomovirus responsables est une étape indispensable. Jusqu'à récemment, neuf espèces de CMGs ont été décrites et associées à la CMD en Afrique et en Asie (Brown et al., 2011). Une nouvelle espèce d'origine recombinante vient tout récemment d'être décrite au Burkina Faso (African cassava mosaic Burkina Faso virus) (Tiendrébéogo et al., 2012), confirmant l'existence d'une grande diversité moléculaire des populations de bégomovirus impliquées dans la CMD. Malgré l'importance de la CMD à Madagascar (Chapitre II), la diversité des CMGs responsables de la CMD reste à être déterminée.

Ce chapitre traite de la caractérisation moléculaire et des analyses phylogénétiques de deux nouvelles espèces de bégomovirus et d'alphasatellite associées à la maladie de la mosaïque du manioc à Madagascar. Dans un premier temps, nous décrivons moléculairement une nouvelle espèce de bégomovirus nommée Cassava mosaic Madagascar virus (CMMGV ; Article 2, *Annotated sequence record* accepté dans le journal *Archives of Virology*). Le CMMGV présente les caractéristiques typiques des CMGs avec un génome bipartite composé d'ADN-A et d'ADN-B. Cependant, les deux composants génomiques sont de nature recombinante. À l'exception des deux régions recombinantes de l'ADN-A qui sont plus apparentées aux CMGs, nous avons déterminé que la région majoritaire non-recombinante

de l'ADN-A est génétiquement plus apparentée aux bégomovirus monopartites caractérisés sur tomate dans les îles du sud ouest de l'océan Indien (Lefeuvre et al., 2007a). Au contraire, malgré une région recombinante provenant d'un virus encore non identifié, le composant d'ADN-B possède un génome majoritairement apparenté aux CMGs décrits en Afrique de l'Est. Pris dans leur ensemble, nos résultats confirment que Madagascar représente un centre de diversification des bégomovirus et que la recombinaison joue un rôle clef.

L'association des bégomovirus avec des molécules satellites d'ADN circulaires (nommés alphasatellites et betasatellites) concerne principalement les bégomovirus monopartite de l'Ancien Monde (Briddon et al., 2004) mais aussi les bégomovirus bipartite du Nouveau Monde (Romay et al., 2010). Les betasatellites semblent jouer un rôle direct dans le développement et l'intensité des symptômes, en facilitant à la fois l'accumulation du bégomovirus assistant et des molécules satellites. Au contraire, les alphasatellites sont apparemment impliqués dans la modulation des symptômes associées aux bégomovirus ou aux complexes bégomovirus/ADN β , mais ils ne semblent jouer aucun rôle essentiel dans le maintien de la maladie. La présence des alphasatellites a été décrite chez de nombreuses plantes cultivées (tomate, coton, gombo, tabac) infectées par des bégomovirus monopartite ou bipartite (Briddon and Stanley, 2006). Même si Patil et Fauquet (2010) ont démontré expérimentalement que les CMGs sont capables de répliquer en *trans* les betasatellites et d'interagir avec les alphasatellites, à notre connaissance aucune association naturelle de betasatellite ou d'alphasatellite avec un bégomovirus n'a été décrite sur manioc.

Dans la deuxième partie de ce chapitre, nous décrivons pour la première fois les caractéristiques moléculaires et phylogénétiques d'une nouvelle espèce d'alphasatellite isolée à partir d'échantillons de manioc infectés par les CMGs à Madagascar (Article 3, *Annotated sequence record* soumis dans le journal *Archives of Virology*). Cette nouvelle espèce provisoirement nommée Cassava mosaic Madagascar Alphasatellite (CMMGA) présente les caractéristiques typiques des alphasatellites avec une région codante pour la protéine Rep, une région riche en adénine et la tige boucle des nanovirus. La séquence nucléotidique la plus proche est celle du Coton leaf curl Gezira alphasatellite isolée sur coton

au Soudan (CLCuGA-[SD: SH7: 96]; HM446369) avec une similarité nucléotidique de 80%. Le diagnostic par PCR de la séquence nucléotidique du CMMGA dans plusieurs échantillons symptomatiques de manioc issus de plusieurs localités du nord de Madagascar démontre l'occurrence de cet alphasatellite dans les cultures de manioc. Par contre, des tests biologiques devront être réalisés afin d'identifier la contribution de cette nouvelle espèce d'alphasatellite à la pathogénicité des CMGs.

Ce travail nous a permis de décrire une diversité virale originale associée à la maladie de la mosaïque du manioc à Madagascar. La caractérisation d'une nouvelle espèce de bégomovirus (CMMGV), très divergente des CMGs décrits jusqu'à présent, illustre la diversité génétique des CMGs impliqués dans la CMD. Associés à la diversité importante de bégomovirus monopartites décrits dans les îles du sud ouest de l'océan Indien (Delatte et al., 2005b; Lefeuvre et al., 2007a), nos résultats confirment l'existence d'un *hot spot* de diversité des bégomovirus à Madagascar et dans les îles environnantes.

A novel cassava-infecting begomovirus from Madagascar: cassava mosaic Madagascar virus

Mireille Harimalala · Pierre Lefeuvre · Alexandre De Bruyn · Fidèle Tiendrébéogo · Murielle Hoareau · Julie Villemot · Sahondramalala Ranomenjanahary · Alice Andrianjaka · Bernard Reynaud · Jean-Michel Lett

Received: 23 February 2012 / Accepted: 22 May 2012 / Published online: 10 July 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract Cassava mosaic geminiviruses (CMGs) are implicated in cassava mosaic disease (CMD), the main constraint to cassava production in Africa. Here, we report the complete nucleotide sequences of the DNA-A and DNA-B of a newly characterized CMG found infecting cassava in Madagascar, for which we propose the tentative name cassava mosaic Madagascar virus. With the exception of two recombinant regions that resembled a CMG, we determined that the non-recombinant part of the DNA-A component is distantly related to the other CMGs. Whereas the DNA-B component possesses one recombinant region originating from an unidentified virus, the rest of the

genome was seen to be closely related to members of the species *East African cassava mosaic Zanzibar virus* (EACMZV). Phylogenetic analysis based on complete genome sequences demonstrated that DNA-A and DNA-B components are outliers related to the clade of EACMV-like viruses and that DNA-A is related to the monopartite tomato leaf curl begomoviruses described in islands in the south-west Indian Ocean.

Annotated sequence record

Begomoviruses (genus *Begomovirus*, family *Geminiviridae*) are a group of plant viruses transmitted by the whitefly *Bemisia tabaci* (*Aleyrodidae*) to a large variety of cultivated and uncultivated plants. They have a circular single-stranded DNA genome encapsidated in twinned icosahedral particles. Cassava mosaic geminiviruses (CMGs) are responsible for cassava mosaic disease (CMD) and have a bipartite genome that consists of two genomic components (DNA-A and DNA-B) of about 2.8 kb. CMD is a major problem for cassava production in Africa [11, 21] and also in Madagascar, where cassava is the staple food, most notably in regions suffering from drought. Early in the 1900s, epidemics of CMD likely caused by CMGs were reported in Madagascar [4], but it was only in 2002 that the first serological confirmation of the presence of CMG was obtained [19]. Of the seven species of CMG whose members have already been reported in Africa [3, 5, 9, 15], members of three species have been found to infect cassava in Madagascar [19]: *African cassava mosaic virus* (ACMV), *East African cassava mosaic virus* (EACMV) and *South African cassava mosaic virus* (SACMV). With the exception of the full genome sequence of one Malagasy isolate of SACMV [19], no information is currently

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00705-012-1399-3) contains supplementary material, which is available to authorized users.

M. Harimalala · P. Lefeuvre · A. De Bruyn · M. Hoareau · J. Villemot · B. Reynaud · J.-M. Lett (✉)
UMR PVBMT, Pôle de Protection des Plantes, CIRAD,
7 Chemin de l'IRAT, 97410 Saint-Pierre,
Ile de La Réunion, France
e-mail: lett@cirad.fr

M. Harimalala · A. De Bruyn
UMR PVBMT, Pôle de Protection des Plantes,
Université de La Réunion, 7 Chemin de l'IRAT,
97410 Saint-Pierre, Ile de La Réunion, France

M. Harimalala · A. Andrianjaka
Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo,
BP 906, Antananarivo, Madagascar

F. Tiendrébéogo
INERA, 01 BP 476, Ouagadougou 01, Burkina Faso

S. Ranomenjanahary
Laboratoire de Pathologie Végétale, FOFIFA,
BP 1444, Ambatobe, Madagascar

available about the molecular diversity of CMGs in Madagascar. The aim of this study was to perform molecular characterization of the suspected begomovirus causal agent(s) of CMD in Madagascar. We describe complete sequences of a novel cassava-infecting begomovirus tentatively named cassava mosaic Madagascar virus (CMMGV).

Leaf material from a cassava plant showing mosaic symptoms was collected in the south-west region of Madagascar (Toliary, 23°20'3.12" S, 43°41'21.70" E) and preserved by dehydration using anhydrous calcium chloride. Total DNA was extracted using a DNeasy® Plant Kit (QIAGEN). The virus was amplified by rolling-circle amplification using *Phi29* DNA polymerase [8]. Amplified products were digested with *Bam*HI and *Nco*I endonucleases. The monomeric full-length genomes obtained (~2.8 kb) were purified and ligated into the pGEM®-3Zf(+) and pGEM®-T vectors, respectively, for *Bam*HI and *Nco*I-digested fragments. The ligated products were then cloned into *Escherichia coli* (JM 109). Complete isolated genomes were sequenced at Macrogen Inc. (Europe), and contigs were assembled with DNA Baser (v.2.91.5.1292).

DNA-A and -B of CMMGV were found to be 2769 and 2741 nucleotides in length, respectively, with features typical of CMGs. The DNA-A component has six open reading frames (ORFs): AV1 (255aa) and AV2 (127aa) in the viral sense, and AC1 (359aa), AC2 (135aa), AC3 (134aa) and AC4 (85aa) in the complementary sense. The DNA-B component has two ORFs: BV1 (258aa) in the viral sense and BC1 (344aa) in the complementary sense. Both components shared a common region (CR) about 200 nucleotides in length with 86 % nucleotide sequence

identity. The CR was of the ACMV type [17], containing two GGAGA iteron sequences, the TATA box and the stem-loop with the nonanucleotide sequence TAATAT-TAC. The corresponding iteron-related domain (IRD; Rep N-terminal domain interacting with *ori*-associated iterons [1]) was identified to be MPPPKRFQIK. The complete genome sequences were most closely related to those of East African cassava mosaic Zanzibar virus (EACMZV). DNA-A and -B shared the highest nucleotide sequence identity of 82.5 % and 81.7 % with EACMZV-[KE:Msa:K212:02] (Supplementary Table 1).

Recombination analysis was carried out using a combination of the RDP [12], GENECONV [16], BOOTSCAN [13], MAXIMUM CHI SQUARE [20], CHIMAERA [18], SISTER SCAN [6] and 3SEQ [2] methods implemented in RDP4 [14]. Two datasets of complete nucleotide sequence alignments were built for the analysis: one with a total of 233 DNA-A sequences of begomoviruses, curtoviruses and topocovirus, and another with 112 DNA-B sequences of begomoviruses. Default RDP4 settings were used (a P-value cutoff of 0.05 with Bonferroni correction). Events detected by more than two methods and with phylogenetic evidence of recombination were considered significant.

Three significant recombinant events were detected on both components (Fig. 1). A portion of AV1 ORF (533-1081 nt) originated from a SACMV-[ZA]-related virus (event *a*), and a portion of the AC1 ORF spanning the entire AC4 ORF (2134-2587 nt) originated from an EACMZV-[KE:Kil:99] virus (event *b*). Interestingly, the remainder of the genome (i.e., the non-recombinant part) was closely related to tomato leaf curl Namakely virus (82 % nucleotide identity to ToLCNamV-MG [MG:Nam:01]). In addition, a portion of the intergenic region of the DNA-B upstream

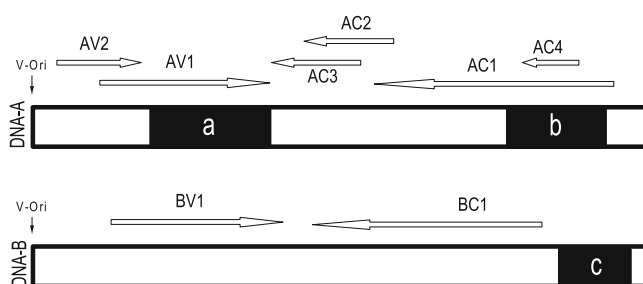


Fig. 1 Recombinant regions (events *a*, *b* and *c*) detected within complete DNA-A and DNA-B sequences of cassava mosaic Madagascar virus. Schematic representation of genome organization showing the open reading frames (AC1, AC2, AC3, AC4, AV1, AV2, BV1 and BC1) overlaid on the linearized complete nucleotide sequences (DNA-A and -B). Nucleotide positions define recombinant fragments in the nucleotide sequence. Where known, the parental sequences are most similar to the recombinant sequence in the dataset analyzed. The “minor parent” is the tentative parent of the

Event	Region	Parental sequences		Detected by	P-value
		Minor	Major		
a	533-1081	AF155806 SACMV-[ZA] -Men [MG:Mor:01]	AJ865338 ToLCMGV -Men [MG:Mor:01]	RGBMCST	1.4x10 ⁻³⁴
b	2134-2587	AJ516003 EACMZV -[KE:Kil:99]	AM701767 ToLCantV -[MG:Mia:01]	RBMCSST	2.3x10 ⁻¹²
c	2367-2698	Unknown	AJ704943 EACMZV -[KE:Kwa:K10:01]	RBMS	1.6x10 ⁻⁰⁶

recombinant region of the sequence. The “major parent” is the apparent contributor of the rest of the sequence. Recombinant regions and parental sequences were identified using the RDP (R), GENECONV (G), BOOTSCAN (B), MAXIMUM CHI SQUARE (M), CHIMAERA (C), SISTER SCAN (S) and 3Seq (T) methods implemented in RDP4. The P-value corresponds to the best P-value calculated with the method in bold type for each recombination event. For begomovirus acronyms and accession numbers, see Supplementary Table 2

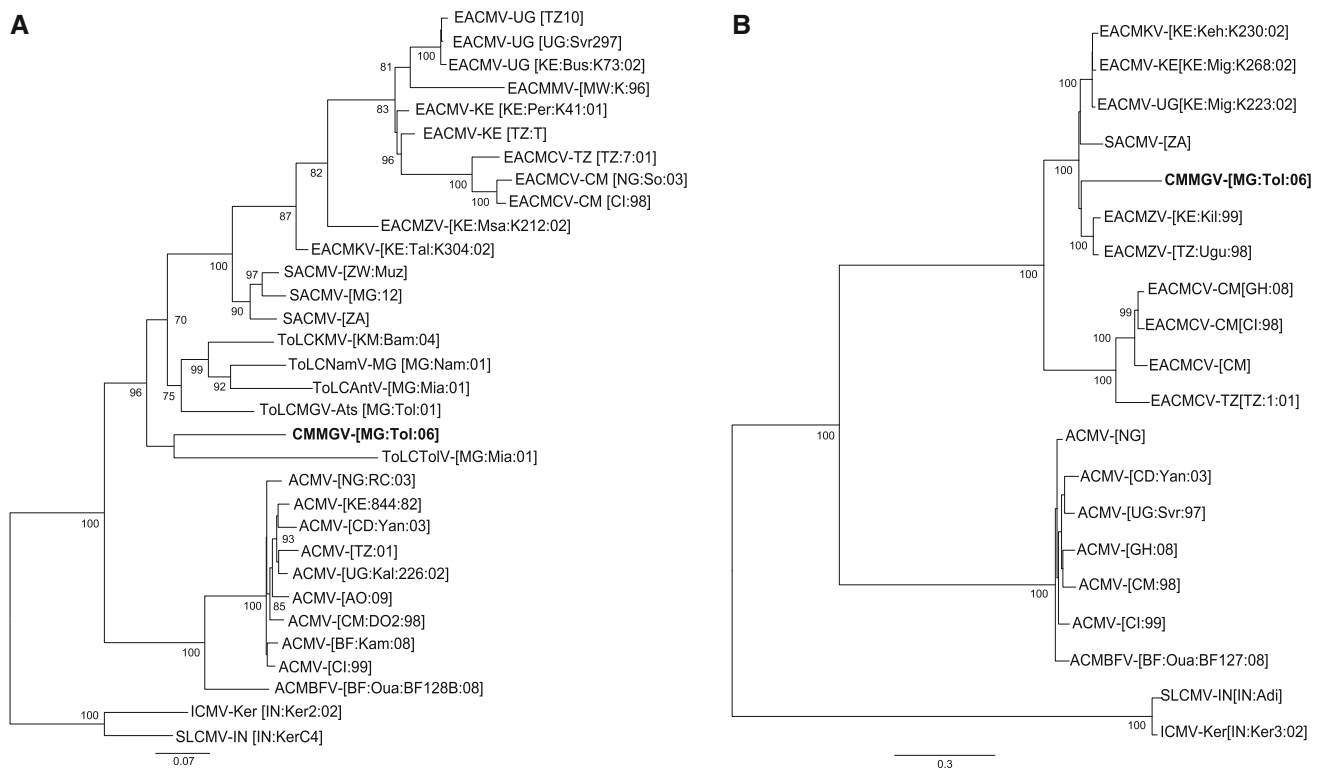


Fig. 2 Maximum-likelihood (ML) trees showing phylogenetic relationships between DNA components of CMMGV and those of representative African/Indian CMGs and the most closely related sequences. Values at nodes indicate the percentage of bootstrap

support (1000 replicates; only bootstrap values greater than 70 % are shown). ML trees inferred from alignments of complete nucleotide sequences of **(A)** DNA-A and **(B)** DNA-B. For begomovirus acronyms and accession numbers, see Supplementary Table 2

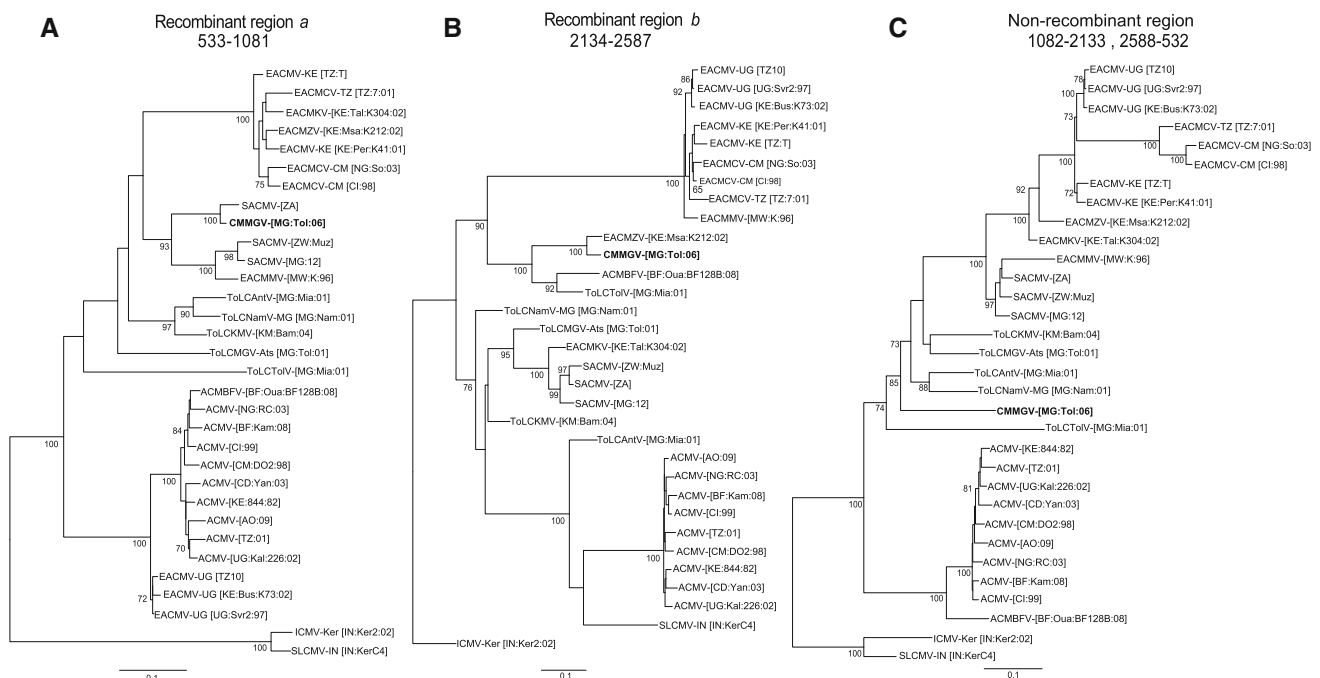


Fig. 3 Maximum-likelihood (ML) trees showing phylogenetic relationships between the DNA-A component of CMMGV and those of the other representative African/Indian CMGs and the most closely related sequences. Values at nodes indicate the percentage of bootstrap support (1000 replicates; only bootstrap values greater than

70 % are shown). ML trees inferred from alignments of **(A)** recombinant region *a* (positions 533 to 1081), **(B)** recombinant region *b* (positions 2134 to 2587) and **(C)** the non-recombinant region. For begomovirus acronyms and accession numbers, see Supplementary Table 2

from the stem-loop (nt 2367–2698) was a recombinant fragment with an unknown parent (event *c*). The non-recombinant region was closely related to EACMZV (85 % nucleotide identity to EACMZV [KE:Kwa:K10:01]).

Maximum-likelihood (ML) phylogenetic trees (with 1000 bootstrap replicates) were constructed from full DNA components as well as from alignments of recombinant and non-recombinant regions of the genomes using PHYML v3.0. [7], and the model of sequence evolution selected was built using the procedure implemented in RDP4 [14]. Trees were visualized using FigTree v1.3.1 software (available at <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Based on complete sequence alignments, the CMMGV DNA-A sequence was an outlier to the EACMV-like virus group, while the DNA-B sequence was included in the group (Fig. 2). Interestingly, and confirming our recombination detection analysis, on the recombinant region of the AV1 ORF (event *a*), the Madagascar isolate of CMMGV was included in the phylogenetic group of SACMV (Fig. 3A), whereas on the recombinant fragment of AC1/AC4 ORFs, it grouped with EACMZV (Fig. 3B, event *b*). The non-recombinant part of CMMGV DNA-A formed a distinct branch outside the group of EACMV-like viruses, related to the DNA-A-like tomato leaf curl viruses (ToLCVs) described in islands in the south-west Indian Ocean [10] (Fig. 3C). In the case of DNA-B, the recombinant fragment of the intergenic region (event *c*) formed a separate and distant branch outside the group of African CMGs, while the non-recombinant part of the DNA-B component was grouped with both EACMV-like and SACMV viruses (Supplementary Fig. 1).

These results attest to the particular features that differentiate CMMGV from the other CMGs described to date. According to the ICTV begomovirus species demarcation criteria (89 % nucleotide identity of DNA-A), we assigned it to a new species of cassava-infecting geminiviruses and propose the name cassava mosaic Madagascar virus. Infectivity and the biological features of this species should be investigated in the future. It is interesting to note that this new African bipartite begomovirus, which seems to be associated with CMD in Madagascar, has a DNA-A related to monopartite begomoviruses described mainly on tomato in the islands in the south-west Indian Ocean. Taken together, our results point to Madagascar as a potential major center of begomovirus diversity from which CMGs spread to the surrounding islands.

EMBL accession numbers

HE617299, HE617300.

Acknowledgements This study was funded by the European Union (FEDER), the *Région Réunion* and CIRAD. MH is a recipient of a PhD fellowship for Regional Cooperation from the *Conseil Régional de La Réunion*.

References

- Argüello-Astorga GR, Ruiz-Medrano R (2001) An iteron-related domain is associated to Motif 1 in the replication proteins of geminiviruses: identification of potential interacting amino acid-base pairs by a comparative approach. *Arch Virol* 146:1465–1485
- Boni MF, Posada D, Feldman MW (2007) An exact nonparametric method for inferring mosaic structure in sequence triplets. *Genetics* 176:1035
- Bull SE, Briddon RW, Sserubombwe WS, Ngugi K, Markham PG, Stanley J (2006) Genetic diversity and phylogeography of cassava mosaic viruses in Kenya. *J Gen Virol* 87:3053–3065
- Cours G (1951) Manioc in Madagascar. *Mém Inst Scient Madagascar Sér B Biol Vég* 3:203–400
- Fauquet CM, Briddon RW, Brown JK, Moriones E, Stanley J, Zerbini M, Zhou X (2008) Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Arch Virol* 153:783–821
- Gibbs MJ, Armstrong JS, Gibbs AJ (2000) Sister-scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. *Bioinformatics* 16:573
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* 59:307–321
- Inoue-Nagata AK, Albuquerque LC, Rocha WB, Nagata T (2004) A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage ϕ 29 DNA polymerase. *J Virol Methods* 116:209–211
- Jones DR (2003) Plant viruses transmitted by whiteflies. *Eur J Plant Pathol* 109:195–219
- Lefeuvre P, Martin DP, Hoareau M, Naze F, Delatte H, Thierry M, Varsani A, Becker N, Reynaud B, Lett JM (2007) Begomovirus ‘melting pot’ in the south-west Indian Ocean islands: molecular diversity and evolution through recombination. *J Gen Virol* 88:3458–3468
- Legg JP, Fauquet CM (2004) Cassava mosaic geminiviruses in Africa. *Plant Mol Biol* 56:585–599
- Martin D, Rybicki E (2000) RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics* 16:562
- Martin DP, Posada D, Crandall KA, Williamson C (2005) A modified bootscan algorithm for automated identification of recombinant sequences and recombination breakpoints. *AIDS Res Hum Retrovir* 21:98–102
- Martin DP, Williamson C, Posada D (2005) RDP2: recombination detection and analysis from sequence alignments. *Bioinformatics* 21:260–262
- Ndunguru J, Legg JP, Aveling TAS, Thompson G, Fauquet CM (2005) Molecular biodiversity of cassava begomoviruses in Tanzania: evolution of cassava geminiviruses in Africa and evidence for East Africa being a center of diversity of cassava geminiviruses. *Virol J* 2:21
- Padidam M, Sawyer S, Fauquet CM (1999) Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* 265:218–225
- Patil BL, Fauquet CM (2009) Cassava mosaic geminiviruses: actual knowledge and perspectives. *Mol Plant Pathol* 10:685–701
- Posada D, Crandall KA (2001) Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: Computer simulations. *Proc Natl Acad Sci USA*, In, pp 13757–13762
- Ranomenjanahary S, Rabindran R, Robinson DJ (2002) Occurrence of three distinct begomoviruses in cassava in Madagascar. *Ann Appl Biol* 140:315–318
- Smith JM (1992) Analyzing the mosaic structure of genes. *J Mol Evol* 34:126–129
- Thresh JM, Fargette D, Otim-Nape GW (1994) The viruses and virus diseases of cassava in Africa. *Afr Crop Sci J* 2:459–478

Molecular characterization of a new alphasatellite associated with a cassava mosaic geminivirus in Madagascar

Mireille Harimalala^{1,2,3}, Alexandre De Bruyn^{1,2}, Murielle Hoareau¹, Alice Andrianjaka³, Sahondramalala Ranomenjanahary⁴, Bernard Reynaud¹, Pierre Lefeuvre¹ and Jean-Michel Lett^{1*}

¹CIRAD, UMR PVBMT, Pôle de Protection des Plantes, 7 Chemin de l'IRAT, 97410 Saint-Pierre, Ile de La Réunion, France

²Université de La Réunion, UMR PVBMT, Pôle de Protection des Plantes, 7 Chemin de l'IRAT, 97410 Saint-Pierre, Ile de La Réunion, France

³Université d'Antananarivo, Faculté des Sciences, BP 906 Antananarivo, Madagascar

⁴FOFIFA, Laboratoire de Pathologie Végétale, BP 1444, Ambatobe, Madagascar

*Author for correspondence ; E-mail : lett@cirad.fr

Abstract

The complete nucleotide sequences of a new alphasatellite molecule (DNA-1) isolated from a cassava mosaic diseased plant and infected by a bipartite begomovirus in Madagascar were described and analyzed phylogenetically. While the begomovirus identified is an isolate of *East African cassava mosaic Kenya virus* species (EACMKV) (95% nucleotide similarity with isolates of EACMKV from Comoros Islands), its associated DNA-1 nucleotide sequences are most closely related to that of cotton leaf curl Gezira alphasatellite (CLCuGA) (80% nucleotide similarity with CLCuGA-[SD:SH7:96]). These satellite molecules present typical features of alphasatellites with a single open reading frame (ORF) in the virion sense predicted to encode a nanovirus replication-associated protein, an A-rich region and a stem-loop structure. According to the proposed species demarcation threshold of alphasatellites (83% nucleotide similarity), we propose the name cassava mosaic Madagascar alphasatellite (CMMGA).

Annotated sequence record

The genus *Begomovirus* (member of family *Geminiviridae*) includes many insect transmitted plant viruses involved in diseases of important crops such as cassava, cotton and tomato. Begomoviruses are either bipartite with two genomic components, designated as DNA-A and DNA-B or monopartite with a single DNA-A like component of approximately 2.7kb. Begomoviruses are often associated with two classes of satellite DNA molecules of approximately 1.3 kb in size called betasatellites (DNA-β) and alphasatellites (DNA-1). DNA-β contains a single open reading frame (ORF) termed C1 (ORF βC1) implicated in the suppression of host gene silencing (also known as RNA interference; [3, 12]). Betasatellites have been proved to play a direct role in symptom development and in facilitating the accumulation of both the helper begomovirus and the satellite molecules [1]. It depends on the helper begomovirus for replication, movement through plant tissues and insect transmission. Conversely, the alphasatellite has a gene encoding a protein similar to that of replication-

associated protein encoded by gene of nanoviruses. Consequently, it is capable of autonomous replication in plant host cells but requires helper begomovirus for movement in plant and insect transmission [1]. Alphasatellite molecules are apparently involved in the modulation of symptom phenotypes of the helper begomovirus or begomovirus/DNA-β complexes but they appear to play no essential role in disease maintenance [2, 12]. The presence of alphasatellites has been reported (for review [1]), in cultivated plants (tomato, cotton, okra, tobacco, watermelon), but also on ornamental and wild plants (*Althea rosea*, *Ageratum conyzoides*, *Cleome aphinis*, *Euphorbia* spp., *Hibiscus rosa-sinensis*) infected by monopartite [10, 14, 15] and bipartite [11, 13] begomoviruses. Even if Patil and Fauquet [12] have experimentally demonstrated that cassava mosaic geminiviruses (CMGs) can trans-replicate betasatellites and interact with alphasatellites, to our knowledge no natural association of betasatellite or alphasatellite with a cassava mosaic geminivirus (CMG) has been described. In this paper, we describe for the first time the molecular features of a new

alphasatellite species isolated from a cassava mosaic diseased plant infected by a CMG in Madagascar.

Cassava leaf samples showing symptoms of cassava mosaic disease were collected in the North of Madagascar (Diana region) primarily for molecular characterization of cassava begomoviruses involved. Total DNA was extracted using a DNeasy[®] Plant Kit (QIAGEN). The virus was amplified by rolling-circle amplification using *Phi29* DNA polymerase. Amplified products were digested with *Bam*HI endonuclease to obtain monomeric full-length genome. Virus fragments of interest were purified, ligated into the pGEM[®]-3Zf(+) vector and cloned into *Escherichia coli* (JM109). Complete genomes isolated were sequenced at Macrogen Inc. (Europe), and contigs were assembled with DNA Baser (v.2.91.5.1292).

While we obtained a DNA-A complete nucleotide sequence (2797 bp) of East African cassava mosaic Kenya virus (EACMKV; HE984147) closely resembling to those described in Comoros islands (95% nucleotide similarity with EACMKV-[KM:YT48B08:08]; JF909187), we also characterized two complete nucleotide sequences of alphasatellite molecules (HE984148, HE984149). Both sequences are 1478 bp long and differ only on two nucleotide positions. Their most closely related sequence is that of cotton leaf curl Gezira alphasatellite from Sudan (CLCuGA-[SD:SH7:96]; HM446369) with 80% nucleotide similarity (Table 1). They display typical features of alphasatellite components with a single ORF in the virion sense, an Adenine-rich (A-rich) region and a hairpin structure (Supplementary file 1). The single ORF (nucleotides 70-1017) is presumed to encode a Rep protein of 315 amino acids. The predicted amino acid shares 89% amino acid sequence similarity with okra leaf curl alphasatellite from Mali (OLCA-[ML:Bam]; EU589450) and cotton leaf curl Gezira alphasatellite from Sudan (CLCuGA-

[SD:SH7:96]; HM446369) (Table 1). For both isolates, a tyrosine residue occurs at amino acid 90 (Supplementary file 1). This tyrosine residue has been proposed to participate in the initiation of the rolling circle replication [7, 8]. A consensus NTP-binding motif GGEGKS that is present in both nanovirus and geminivirus Reps [4, 6] has been identified (amino acids 188-193). A polyadenylation motif AATGAA (nucleotides 990-995) occurs at the 3' terminus of the Rep ORF (Supplementary file 1). The A-rich region is localized downstream the Rep gene. It is approximately 111 bp long with 42% adenine content. The sequence of the hairpin falls into group 1 as reported by Briddon and co-authors [1]. It contains the nonanucleotide sequence (NS) TAGTATT[↓]AC that is common to alphasatellites and nanoviruses. This NS is the origin site of replication and is nicked ([↓]) by Rep protein to initiate DNA replication [8]. TATA box is located within the sequence TATATATA at the 5' terminus of the stem-loop structure (nucleotides 1453-1460).

Phylogenetic analyses were carried out to determine phylogenetic relationships between begomovirus/alphasatellites isolated in this study and representative begomoviruses/alphasatellites described so far. Maximum likelihood (ML) trees (with 1000 bootstrap replicates) were constructed from alignment of cassava begomoviruses DNA-A nucleotide sequences as well as from alignment of alphasatellite nucleotide sequences with PHYML v.3 [5], after selecting the best model of sequence evolution using the procedure implemented in RDP4 [9]. Trees were visualized using FigTree v1.3.1 software (available at <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). From the tree, it was clearly apparent that the DNA-A sequence of EACMKV from Madagascar clustered with those isolated in Comoros Islands with which it is the most closely related (Fig. 1). The two complete nucleotide sequences of alphasatellites clustered in the African group including their most closely related sequence of CLCuGA (HM446369).

Table 1 Matrix of pairwise identity percentages between the complete DNA-1 nucleotide sequences and Rep amino acids of cassava mosaic Madagascar alphasatellite isolates from Madagascar and representatives from Africa and Asia

Alphasatellite names	Acronyms	Accession numbers	Similarity percentage*		Rep amino acid sequences
			Complete nucleotide sequences		
			CMMGA-[MG:Dia:635A1:11]	CMMGA-[MG:Dia:635A4:11]	
Cotton leaf curl Gezira alphasatellite-[Sudan:Shambat7:1996]	CLCuGA-[SD:SH7:96]	HM446369	79.8	80.1	89.2
Okra leaf curl Mali alphasatellite-Cameroon[Cameroon:Njombe:Lys1d3:2009]	OLCMLA-CM[CM:Njo:Lys1d3:09]	FN675290	77.4	78.5	87.6
Okra leaf curl alphasatellite-[Mali:Bamako]	OLCA-[ML:Bam]	EU589450	77.2	78.2	89.5
Okra leaf curl alphasatellite-[Sudan:2007]	OLCA-[SD:07]	FJ868830	77.1	77.9	89.2
Cotton leaf curl Burewala alphasatellite-[India:Rajasthan:2007]	CLCuBwA-[IN:Raj:07]	FN658728	74.6	75.5	89.2
Ageratum enation alphasatellite-[India:2009]	AEA-[IN:09]	FN543100	74.4	74.3	87.3
Tomato leaf curl Cameroon alphasatellite-[Cameroon:Buea:TomatoSD2:2009]	ToLCCMA-[CM:Bue:ToSD2:To:09]	FN675300	74.3	73.9	87.9
Cotton leaf curl alphasatellite-[India:Lucknow:2010]	CLCuA-[IN:Luc:10]	HQ343234	73.7	73.9	87.9
Mimosa yellow leaf curl alphasatellite-[Vietnam:Binhduong:Mimosa:2004]	MiYLCA-[VN:Bin:04]	DQ641719	72.8	72.9	86.0
Sida yellow vein Vietnam alphasatellite-[Vietnam:Hanoi:Sida:2000]	SiYVVNA-[VN:Hano:00]	DQ641718	72.5	72.9	84.4
Cotton101-[Egypt:Cairo:1995]	Cot101-[EG:Cai:95]	AJ512960	71.9	72.2	82.2
Tomato yellow leaf curl China Alphasatellite-[China:Yunnan261]	TYLCCNA-[CN:Yn261]	AJ888448	71.7	71.8	83.2
Tobacco curly shoot alphasatellite-[India:Wild SunflowerA1:2010]	TbCSA-[IN:WSFA1:10]	HQ407396	71.4	72.7	84.1
Papaya leaf curl alphasatellite-[India:Papaya:2010]	PaLCuA-[IN:Pap:10]	JQ322970	70.3	70.7	84.7
Malvastrum yellow mosaic Cameroon alphasatellite-[Cameroon:Mundemba:2008]	MalYMA-[CM:UMU1D:08]	FN675298	70.1	71.0	85.7
Vernonia yellow vein Fujian alphasatellite-[China:Vernonia:2009]	VeYVFjA-[CN:09]	JF733780	59.2	60.0	58.7
Croton yellow vein mosaic alphasatellite-[Pakistan:Faisalabad:AQ-125:2010]	CroYVMA-[PK:Fai:AQ-125:10]	FR877534	58.0	58.1	65.4
Gossypium mustelinum symptomless alphasatellite-[Pakistan:Lahore:Alcea:17-5:2006]	GsmSPKA-[PK:Lah:Al:17-5:06]	FR772087	58.1	58.7	57.0
Hollyhock yellow vein alphasatellite-[Pakistan:Lahore:2006]	HoYVA-[PK:Lah:06]	FR772086	57.1	57.3	46.3
Okra leaf curl alphasatellite-[Cameroon:Barombi Nkang]	OLCA-[CM:OBKG]	FM164739	56.7	56.6	45.3
Okra yellow crinkle Cameroon alphasatellite-[Cameroon:Njombe5sp3:2009]	OYCrCMA-[CM:Njo5sp3:09]	FN675288	51.8	52.9	46.0
Cotton leaf curl Gezira alphasatellite-[Burkina Faso:Pô:Okra4:2008]	CLCuGA-[BF:Po:Ok4:08]	FN554582	51.7	51.8	40.5

*Highest percentages are presented in bold

PCR analysis was also performed in order to assess the presence of this alphasatellite in other suspected cassava leaf samples collected from the surrounding areas of the Diana region in the North of Madagascar. A specific pair of primers was designed (Alphasat-F595 5'-GATGACCGCACTATCTTC-3'; Alphasat-RD950 5'-CAWGGGATTACATGGATC-3') based on the

two complete nucleotide sequences of alphasatellite molecules characterized in this study, and expected to amplify a portion of the Rep ORF (355 bp). From eight samples among the 96 tested by PCR [15], we obtained amplicons of the expected size confirming the occurrence of alphasatellites in begomovirus-infected cassava in Madagascar (Table 2).

Table 2 Description of cassava samples from the North of Madagascar (Diana region) in which DNA-1 of cassava mosaic Madagascar alphasatellite was diagnosed by PCR

Sample ID	Locality	Geographical coordinates		Altitude (m)
		Latitude (S)	Longitude (E)	
632	Ambanja	13°40'13.30"	48°26'53.81"	19
635*	Ambatomena	13°37'19.56"	48°24'38.27"	18
647	Mangabe	13°42'43.09"	48°25'31.98"	31
648	Mangabe	13°42'43.09"	48°25'31.98"	31
655	Ambolipamba	13°21'26.14"	48°52'12.68"	15
682	Anivorano	12°44'33.18"	49°14'57.48"	419
689	Marovato	12°41'56.18"	49°15'17.42"	499
698	Andranomena	12°36'18.00"	49°22'27.19"	181

*Sample from which two complete sequences of DNA-1 of CMMGA were cloned and sequenced

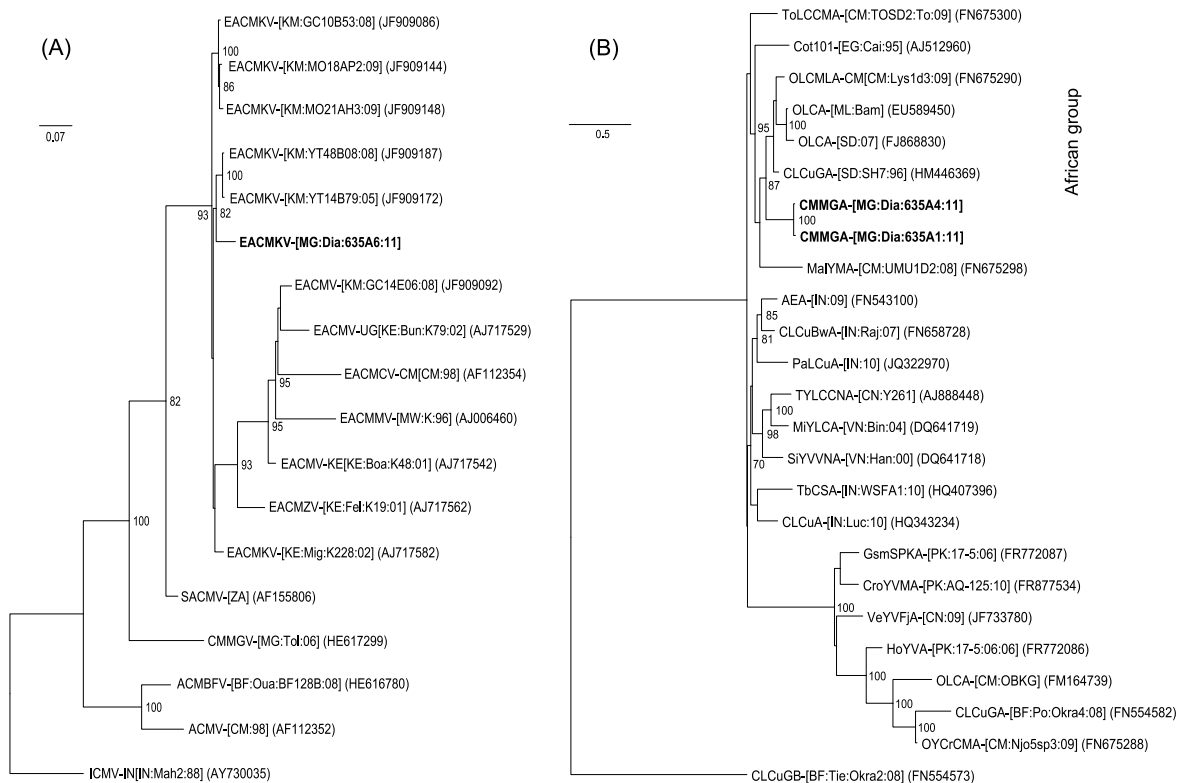


Fig. 1 Maximum likelihood (ML) trees showing phylogenetic relationships between complete genome sequences of (A) begomovirus (DNA-A) and (B) alphasatellite (DNA-1) isolated in this study (highlighted in bold) and representative sequences. The DNA-A and DNA-1 trees were respectively rooted on the nucleotide sequence of an isolate of Indian cassava mosaic virus (ICMV-IN [IN:Mah2:88]; AY730035) and an isolate of cotton leaf curl Gezira betasatellite (CLCuGB-[BF:Tie:Okra2:08]; FN55453). Numbers at nodes indicate bootstrap scores (1000 replicates). Only bootstrap values greater than 70% are displayed. Acronyms and accession numbers of nucleotide sequences used in this study are available in Supplementary file 2

In addition to being the first description of EACMKV in Madagascar, known as one of the causal agents of one of the most devastating crop disease in Africa, this is to our knowledge the first report of a natural association between an alphasatellite and a CMG. Based on the proposed species demarcation threshold of alphasatellites (83% nucleotide similarity, reported in [10]), we propose the name cassava mosaic Madagascar alphasatellite (CMMGA). As the PCR tests demonstrate that these satellites are not cryptic, biological tests should be performed to characterize any contribution of this alphasatellite to the pathogenicity of CMGs.

Acknowledgements

This study was funded by the European Union (FEDER), the *Région Réunion* and CIRAD. MH is a recipient of a PhD fellowship for Regional Cooperation from the *Conseil Régional de La Réunion*. The authors wish to thank Nathalie

Becker for her comments, critical reviewing, and for revising the English version of the manuscript.

References

1. Briddon RW, Bull SE, Amin I, Mansoor S, Bedford ID, Rishi N, Siwatch SS, Zafar Y, Abdel-Salam AM, Markham PG (2004) Diversity of DNA 1: a satellite-like molecule associated with monopartite begomovirus–DNA β complexes. *Virology* 324:462-474
2. Briddon RW, Stanley J (2006) Subviral agents associated with plant single-stranded DNA viruses. *Virology* 344:198-210
3. Cui X, Tao X, Xie Y, Fauquet CM, Zhou X (2004) A DNA β associated with Tomato yellow leaf curl China virus is required for symptom induction. *Journal of Virology* 78:13966-13974
4. Gorbalenya AE, Koonin EV, Wolf YI (1990) A new superfamily of putative NTP-binding

- domains encoded by genomes of small DNA and RNA viruses. *FEBS Lett* 262:145-148
5. Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* 59:307-321
 6. Katul L, Maiss E, Morozov SY, Vetten HJ (1997) Analysis of six DNA components of the faba bean necrotic yellows virus genome and their structural affinity to related plant virus genomes. *Virology* 233:247-259
 7. Koonin EV, Ilyina TV (1992) Geminivirus replication proteins are related to prokaryotic plasmid rolling circle DNA replication initiator proteins. *J Gen Virol* 73:2763
 8. Laufs J, Schumacher S, Geisler N, Jupin I, Gronenborn B (1995) Identification of the nicking tyrosine of geminivirus Rep protein. *FEBS Lett* 377:258-262
 9. Martin DP, Williamson C, Posada D (2005) RDP2: recombination detection and analysis from sequence alignments. *Bioinformatics* 21:260-262
 10. Mubin M, Briddon RW, Mansoor S (2009) Complete nucleotide sequence of *Chili leaf curl virus* and its associated satellites naturally infecting potato in Pakistan. *Archives of Virology* 154:365-368
 11. Paprotka T, Metzler V, Jeske H (2010) The first DNA 1-like α satellites in association with New World begomoviruses in natural infections. *Virology* 404:148-157
 12. Patil BL, Fauquet CM (2010) Differential interaction between cassava mosaic geminiviruses and geminivirus satellites. *J Gen Virol* 91:1871
 13. Romay G, Chirinos D, Geraud-Pouey F, Desbiez C (2010) Association of an atypical alphasatellite with a bipartite New World begomovirus. *Archives of Virology* 155:1843-1847
 14. Saunders K, Stanley J (1999) A nanovirus-like DNA component associated with yellow vein disease of *Ageratum conyzoides*: evidence for interfamilial recombination between plant DNA viruses. *Virology* 264:142-152
 15. Tiendrébéogo F, Lefeuvre P, Hoareau M, Villemot J, Konaté G, Traoré AS, Barro N, Traoré VS, Reynaud B, Traoré O, Lett JM (2010) Molecular diversity of *Cotton leaf curl Gezira virus* isolates and their satellite DNAs associated with okra leaf curl disease in Burkina Faso. *Virol J* 7:48

Chapitre IV

**Les bégomovirus du manioc à
Madagascar : diversité et facteurs
associés à la dispersion**

Chapitre IV

Les bégomovirus du manioc à Madagascar :

diversité et facteurs associés à la dispersion

Suite à la pandémie de la maladie sévère de la mosaïque du manioc qui a sévit en Afrique de l'Est dans les années 1990s (Otim-Nape et al., 2000), de nombreuses études se sont penchées sur la caractérisation de la diversité virale associée. Celles-ci ont révélé la présence en Afrique d'une diversité virale importante, en partie structurée géographiquement, avec la présence aujourd'hui de neuf espèces distinctes (Brown et al., 2011; Harimalala et al., 2012; Tiendrébéogo et al., 2012). Actuellement, une quantité importante de séquences de génome complet de CMGs sont disponibles dans les bases de données. De manière intéressante, nombre de ces séquences sont associées à des informations géographiques ou des données épidémiologiques. Cette quantité d'informations, nous donne aujourd'hui l'opportunité d'analyser la diffusion des complexes viraux ou encore l'évolution de leur virulence.

Pour se faire, les outils d'analyse phylogénétique et phylogéographique apparaissent comme incontournables. Alors que la phylogénie offre la possibilité de reconstruire les liens entre les isolats par comparaison des séquences virales, la phylogéographie étudie les principes et les processus qui gouvernent la distribution des lignées généalogiques, spécialement au niveau intraspécifique (Avice, 1998). L'analyse phylogéographique permet d'expliquer les phénomènes ayant contribué à la structuration actuelle des populations virales, de retracer leur évolution dans un contexte spatio-temporel et de comprendre comment les conditions biotiques ou abiotiques ont influencé la distribution actuelle des espèces. Le développement des approches statistiques qui s'associent à des analyses d'inférence permettent de faire une modélisation de ces processus évolutifs.

L'approche phylogéographique a été utilisée récemment pour étudier les maladies virales importantes chez l'Homme (notamment la dengue, le sida, la grippe) (Holmes, 2004) et chez les plantes (la panachure jaune du riz (Abubakar et al., 2003; Traore et al., 2005) et la « tomato yellow leaf curl disease » (Lefeuvre et al., 2010)). Bien que la diversité génétique

des CMGs ait été largement étudiée au niveau du continent africain, peu d'informations sont disponibles en ce qui concerne les CMGs à Madagascar. Dans ce chapitre, nous nous proposons d'étudier cette diversité génétique et d'analyser les facteurs associés à la diffusion de ces virus.

La première étape de notre activité a consisté à un important travail de clonage et de séquençage des génomes complets des CMGs à Madagascar. Nous avons ainsi obtenu une description sans précédente de la diversité des CMGs dans une région avec 400 séquences de génomes complets d'ADN-A (n=281) et d'ADN-B (n=119). Ces séquences nucléotidiques ont révélé la présence de six espèces de CMGs à Madagascar : ACMV, SACMV, EACMCV, EACMKV, EACMV dont la description d'une nouvelle espèce CMMGV (Chapitre III).

Dans un second temps, nous avons focalisé notre attention sur l'espèce ACMV, en association avec les données spatio-temporelles, pour inférer l'histoire de l'introduction de cette espèce à Madagascar. Nos résultats suggèrent une seule introduction du continent Africain vers Madagascar datée aux alentours de 1993. Par la suite, des analyses phylogéographiques associées à des analyses statistiques ont permis de déterminer que la variabilité génétique qui existe entre les isolats se trouve fortement corrélée avec la distance géographique. Alors que nos résultats suggèrent une influence forte du facteur humain sur la diffusion de l'ACMV, ils permettent d'écarter le vecteur *Bemisia tabaci* comme facteur principal. Ces résultats nous amène à nous interroger sur les origines, les conséquences et les risques épidémiologiques d'une telle diversité de CMGs à Madagascar, notamment face aux risques d'apparition de nouveaux variants recombinants.

Genetic diversity and phylogeography of cassava mosaic begomoviruses in Madagascar

Mireille Harimalala^{1,2,3}, Alexandre De Bruyn^{1,2}, Murielle Hoareau¹, Sahondramalala Ranomenjanahary⁴, Alice Andrianjaka³, Bernard Reynaud¹, Pierre Lefeuvre¹ and Jean-Michel Lett^{1#}

¹CIRAD, UMR PVBMT, Pôle de Protection des Plantes, 7 Chemin de l'IRAT, 97410, Saint-Pierre, Ile de La Réunion, France

²Université de La Réunion, UMR PVBMT, Pôle de Protection des Plantes, 7 Chemin de l'IRAT, 97410, Saint-Pierre, Ile de La Réunion, France

³Université d'Antananarivo, Faculté des Sciences, BP 906 Antananarivo, Madagascar

⁴FOFIFA, Laboratoire de Pathologie Végétale, BP 1444, Ambatobe, Madagascar

#Corresponding Author: lett@cirad.fr

Abstract

New model-based approach of phylogeography and landscape epidemiology provided a powerful and convincing mean to identify and understand factors associated with emergence. As the cassava mosaic geminiviruses (CMG), the causal agents of cassava mosaic disease (CMD) one of the most devastating disease in Africa, appear as more and more diverse and widespread, it becomes essential to understand the key factors associated with CMGs dissemination and evolution. In this study, from a large scale sampling of more than 700 of cassava samples from Madagascar, we identified six CMG species with ACMV, SACMV, EACMCV, EACMKV, EACMV and the recently characterized CMMGV. Phylogenetic and phylogeographic analysis of isolates of ACMV indicate that these viruses were issued from a single introduction that occurred around 1993 (95% HPD ranging from 1987 to 1999). Dispersal analysis demonstrated that isolation with distance, regardless of the landscape, is an excellent estimator of the genetic diversity. Diffusion predictors designed to recapture human-mediated diffusion of viruses performed better than spatial distance, suggesting that human may be the principal factor for CMG diffusion. Also, and as suggested in previous epidemiological studies, *B. tabaci* alone poorly explain the diffusion of ACMV.

Introduction

Understanding the dissemination pattern of emergent pathogens and the factors associated is essential to determine the evolution and fate of epidemics. Recent advances in model based phylogeography (Bloomquist et al., 2012, Faria et al., 2011, Lemey et al., 2009) and in the so-called “landscape epidemiology” (Meentemeyer et al., 2012, Pullan et al., 2012) help uncover biotic and abiotic factors that promote pathogens dispersal. In these studies, pathogens genetic data were associated to factor such as great-circle distance (Lemey et al., 2012), road networks (Talbi et al., 2010) or animal vector and its predators (Levi et al., 2012) to model in a more realistic manner pathogens dispersal.

Interestingly, such studies were conducted on the dispersal in Africa (Bull et al., 2006) and the South West Indian Ocean islands (De Bruyn et al., accepted) of the cassava mosaic geminiviruses (CMG), the causative agents of cassava mosaic disease (CMD). These studies revealed the extensive dissemination of viral complex in Africa

and the numerous introductions of virus isolates from island to island (De Bruyn et al. accepted). From this study, lines of evidence point out anthropic factors have played an important role in the dissemination of CMGs.

Besides being transmitted by the whitefly *Bemisia tabaci*, propagation via human mediated transport of infected plant material is today postulated to play an important role in the spread of begomoviruses infecting vegetatively propagated plants such as sweet potato (Clark et al., 2012) and cassava. Studies on CMD in Madagascar (Harimalala et al., in preparation), in Central African Republic (CAR, Zinga et al., 2012) and several other countries in Africa (Sseruwagi et al., 2004) demonstrated that up to 78 % of the cuttings used to grow a new plot are infected by CMGs. Whereas this practice may be without consequences for CMG variants or species of low severity, it creates ideal conditions for high infection rates, multiple infections and recombination, proved to be a crux factor in the history of CMGs and begomoviruses in general (Zhou et al., 1997; Padidam et al., 1999; Ndunguru et al., 2005)

CMD is currently the most damaging plant virus disease in the world with an epidemic in East and Central Africa, causing annual crop losses valued at US\$1.9–2.7 billion and a famine that has likely caused the deaths of thousands of people (Patil and Fauquet, 2009). Whereas the first report of CMD dated to 1894 (Warburg, 1894), the initial characterisation of CMGs occurred in the early 1980's (Bock et al., 1981; Bock and Woods, 1983). It was then demonstrated that CMGs possess bipartite genomes, with genome components, called DNA-A and DNA-B, comprising 2.7 kb circular single-stranded DNA molecule (Stanley and Gay, 1983). After the description of the first CMG species, the *African cassava mosaic virus* (ACMV), it has subsequently been discovered that African CMGs in fact comprise at least six distinct begomovirus species including *South African cassava mosaic virus* (SACMV), *East African cassava mosaic virus* (EACMV), *East African cassava mosaic Cameroon virus* (EACMCV), *East African cassava mosaic Zanzibar Virus* (EACMZV), *East African cassava mosaic Malawi virus* (EACMMV), and *East African cassava mosaic Kenya virus* (EACMKV) (Bull et al. 2006; Legg and Fauquet 2004). Recently, two putative species have also been newly described: *African cassava mosaic Burkina Faso virus* (ACMBFV, Tiendrébéogo et al. 2012) and *Cassava mosaic Madagascar virus* (CMMGV, Harimalala et al. 2012). Importantly, it was demonstrated that an ongoing dynamic of recombination fuelled the diversity of the CMG complex, the best example being the emergence of the Uganda strain also called severe strain of EACMV (EACMV-UG) in East Africa in the 90's (Zhou et al., 1997).

As CMD epidemics seem to spread at a rapid pace with increasing genetic complexity, it is primordial to understand the key factors associated. Specifically, disentangling the contribution of insect vector-mediated and human-mediated movement of viruses would greatly help to predict and prevent future outbreaks and dispersal of CMGs. Here, we analysed hundreds ACMV isolates, including many sequences isolated for the first time to retrace their dissemination pathways in Madagascar. Molecular data combined with spatial and temporal information recorded during samplings were used to study the migration patterns of this species. We used different estimator of migration distances separating the isolates and study their correlation to genetic distances. Besides characterizing for the first time several new isolates, our study may also indicates that human-mediated dissemination is the main explanatory factor for the ACMV diffusion in Madagascar.

Materials and methods

Sampling, cloning and sequencing of complete genome of CMGs in Madagascar

Cassava leaf samples showing symptoms of cassava mosaic disease were collected through Madagascar between 2005 and 2011. Total DNA was extracted using a DNeasy® Plant Kit (QIAGEN). The virus was amplified by rolling-circle amplification using Phi29 DNA polymerase (Shepherd et al., 2008). To obtain monomeric full-length genome of about 2.8kb, endonucleases such as *Bam*HI, *Eco*RI, *Nco*I and *Apa*I were tested to digest amplified products. Virus fragments of interest were purified, ligated into the endonuclease-corresponding vector (pGEM®-3Zf(+) for *Bam*HI and *Eco*RI, pGEM®-T for *Nco*I and pGEM®-7Zf(+) for *Apa*I) and cloned into *Escherichia coli* (JM109). Complete genomes isolated were sequenced at Macrogen Inc. (Europe), and contigs were assembled with DNA Baser software (v.2.91.5.1292, Heracle BioSoft S.R.L., Romania).

Phylogenetic reconstruction

Sequence were first aligned with representative isolates of all the CMGs species using the Muscle alignment tool (Edgar, 2004) implemented in MEGA 5 (Tamura et al., 2011). A pairwise distance matrix was then computed (with pairwise deletion of gaps) to assign sequences to known virus species and strains. We have later focused our analysis on isolates on the species ACMV. Alignments of the 94 ACMV DNA-A and 15 ACMV DNA-B sequences along with those available from GenBank on June 2012 were performed using the procedure described above. Phylogenetic trees were constructed from the alignments using Maximum likelihood (ML) approach implemented in PHYML v.3 and SH-aLRT support for branch (Guindon et al., 2010), after selecting the best model of sequence evolution (GTR+I+G₄) using jModelTest2 (Darriba et al., 2012). Trees were visualized using FigTree v1.3.1 software (available at <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Molecular clock analysis

A dataset was constituted with our ACMV DNA-A sequences and all ACMV DNA-A sequences available from GenBank for which sampling date was available. A dataset comprising 213 sequences (94 from Madagascar) sampled from 1988 to 2011

(from 2005 to 2011 for Madagascar sequences) was obtained. As recombination is known to confound phylogenetic and coalescence analyses (Posada and Crandall, 2002; Lefeuvre et al., 2010; Monjane et al., 2012), we restrict our dataset to the CP ORF. In previous studies, it was demonstrated that this region was a cold-spot of recombination for CMGs (De Bruyn et al., accepted) and begomoviruses in general (Lefeuvre et al., 2007; Lefeuvre et al., 2009), making it suitable for substitution rate estimation. Sequences were aligned as described above.

A first inspection of our dataset was performed using the Path-O-Gen software (available at <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/pathogen>). As it was apparent that there was sufficient temporal signal in our dataset, we then dated ancestral sequences and estimated nucleotide substitution rates using the Bayesian relaxed-clock approach implemented in BEAST v1.7.2 (Drummond et al., 2012). Using the GTR+I+G₄ nucleotide substitution model, an uncorrelated log-normal clock and the Bayesian skyline population demographic model, three independent runs were continued until convergence of the various model parameters as adjudged using Tracer v.1.5 (available at <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer>) and the achievement of suitable effective sample sizes. After combination of the runs with LogCombiner, Maximum clade credibility (MCC) trees were constructed using TreeAnnotator and visualized with FigTree v.1.3.

Dispersal analysis

To test different scenarios of ACMV phylogeographic diffusion, we used different pairwise location measures that represent different diffusion predictors before testing their correlation with the genetic distance using functions available in R (R Development Core Team, 2010). The genetic distance was obtained from the phylogenetic tree using functions available in the R package APE (Popescu et al., 2012).

The most commonly used geographic distance measure is the great-circle or geodesic distance which represents the shortest line between two points, taking into account the curvature of the earth. However, the great-circle distance does not correspond very well to expected travel time or travel effort between two points. Travel time and the real distance travelled depend on the means of transport and the characteristics of landscapes and infrastructure. In a CMG perspective and in a given

landscape, the appropriate estimator should represent either (1) the difficulty for humans to travel or distribute infected material or (2) the difficulty for the insect vector population to spread.

So beside great-circle distance, as diffusion predictors, we consider (i) transport distances, (ii) spatial accessibility, (iii) population conductivity measures, (iv) land cover accessibility and (v) elevation. While the great circle distances were computed from GPS sampling coordinates using functions available in the R package SoDA (Chambers, 2008), the other information were derived from a range of spatial data sets and satellite information available at <http://bioval.jrc.ec.europa.eu/>. We used a combinations of tools available in the Quantum GIS software (available at <http://qgis.org/>) and in the GDAL library (available at <http://www.gdal.org/>) to obtain grids covering Madagascar surface where each cell (square of 930 m) represents the difficulty (or travel time) in crossing it. These estimates provide a representation of the difficulty in travel between all the locations. We then use the R package gdistance (van Etten, 2012) to calculate the pairwise distances in the heterogeneous geographic spaces represented by each grid.

Results and discussion

An unexpected genetic diversity of CMGs is found in Madagascar

Four hundred complete sequences of CMG components were obtained from the 700 cassava leaf samples collected in Madagascar (Supplementary table 1). Among these, 281 and 119 correspond respectively to DNA-A and DNA-B components. BLAST searches and pairwise comparison to reference sequences revealed the presence of six CMG species with ACMV (DNA-A: n=94, DNA-B: n=15), EACMCV (DNA-A: n=13, DNA-B: n=4), EACMKV (DNA-A: n=43, DNA-B: n=98), EACMV (DNA-A: n=1), SACMV (DNA-A: n=129) and CMMGV (DNA-A: n=1, DNA-B: n=1). To our knowledge, this is the first report of such a diversity of CMGs in a single country. These results confirmed previous studies suggesting that the eastern part of Africa (Ndunguru et al., 2005) and Madagascar (Harimalala et al., 2012) are sources of diversity and evolutionary change of CMGs.

We then decided to focus our analysis on ACMV as (1) almost hundred DNA-A sequences were obtained from our study and (2) a large number of

ACMV sequences are available from Africa mainland. This second point is even crucial in comparison to the SACMV as it would allow a better confidence in the estimation of the direction of introduction (*i.e.* either from or to Madagascar), their number and their dating.

Introduction of ACMV in Madagascar

Phylogenetic trees were constructed from alignments of complete DNA-A (Figure 1A) and DNA-B (Figure 1B) sequences. It is clearly apparent from these reconstructions that both components isolated from Madagascar form a distinct cluster, suggesting a single introduction. Interestingly, both sequences of DNA-A and DNA-B appear as a distinct group with long branches linking the Malagasy cluster with the other African ACMV sequences. The Malagasy DNA-A sequences display a maximum genetic distance of 0.072 substitution / site (mean of 0.031) and the DNA-B a maximum genetic distance of 0.057 substitution / site (mean of 0.0373).

ACMV evolutionary rates

We further attempt to date the introduction of ACMV in Madagascar using BEAST software. To this end, we use a CP dataset composed from our 94 Malagasy sequences and the 120 ACMV sequences isolated in Africa for which sampling dates were available. It is important to notice first that such substitution rate estimation is highly biased with the time span of the sampling dates. Because deleterious mutations would be purged more efficiently in long term, it is expected that the shorter the temporal sampling range is, the higher

would be the substitution rate (Harkins et al., 2009; Gibbs et al., 2010; Lefeuvre et al., 2010). In our analysis, we obtained sequences from Africa sampled between 1988 and 2011 while our dataset contains only sequences from Madagascar sequenced between 2005 and 2011. It is therefore suspected that our analysis would tend to overestimate the substitution rate and therefore estimate a more recent date of introduction than it really was.

Not surprisingly, we recover almost the same topology as for the phylogeny inferred from DNA-A sequences, with importantly, the sequences isolated in Madagascar forming a distinct clade (branches coloured in red, Supplementary Figure 1). The introduction of ACMV in Madagascar is estimated to have occurred in 1993 with a 95% Highest Posterior Density (HPD) ranging from 1987 to 1999. The estimated substitution rate was 1.3×10^{-3} sub/site/year (95% HPD ranging from 9.3×10^{-4} to 1.8×10^{-3}) which is in the same order as those estimated in previous studies (De bruyn et al. accepted; Duffy and Holmes, 2009). The first CMD epidemic was reported in Madagascar in the 1930s (Cours et al., 1951). This period does not coincide with the date of introduction of ACMV we have obtained. While this difference may be explained with the bias of the substitution rate described above, two other hypotheses can be put forward. Either the viruses causing CMD in the 1930s did not involve the ACMV, but other species of CMGs, or the epidemic wave involving the ACMV with a recent introduction (dated here around 1993) has replaced other ACMV present in Madagascar at the beginning of the century. It is possible that a continuous and dynamic turnover of viral populations occurs with successive epidemic waves, causing the displacement of viruses previously present.

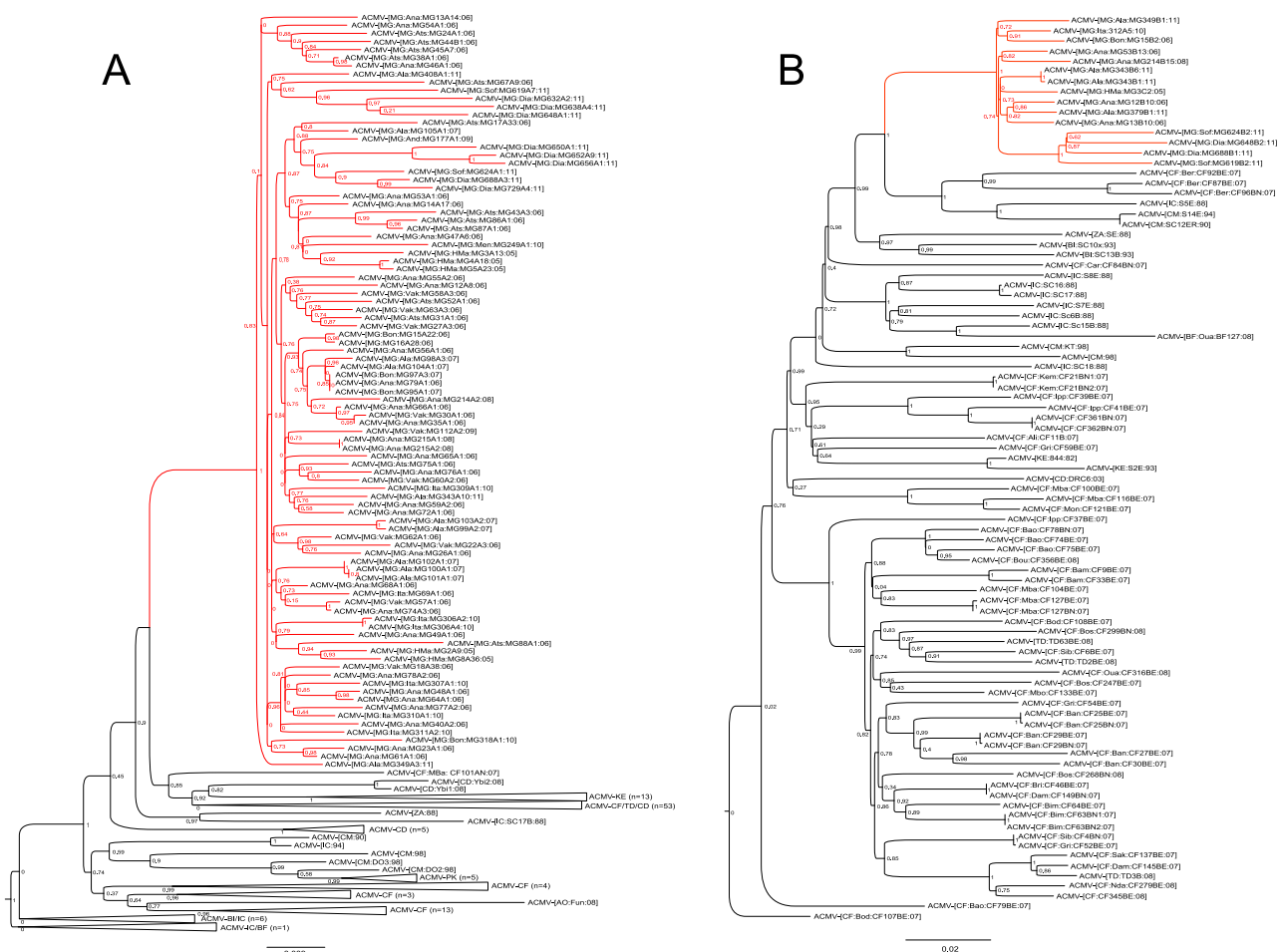


Figure 1: Maximum likelihood (ML) trees displaying the phylogenetic relationships between ACMV isolated in Madagascar and those isolated in Africa mainland. ML trees are constructed using alignments of DNA-A (A) and DNA-B (B) complete nucleotide sequences using the GTR+I+G₄ substitution model. Values associated with the nodes indicate the SH-aLRT support of the pre-dating branches. DNA-A and DNA-B trees were rooted using ACMBFV and EACMV-UG [KE:Mig:K262:02] respectively.

Dispersal patterns

Whereas our dataset lack of power for an accurate dating of virus introduction, it is more informative when it comes to estimate the dispersal pattern of the viruses. There are two reasons for this. The first is due to the monophyly of ACMV sequences isolated in Madagascar that would avoid the occurrence of recombination between viruses from different epidemics. The second is based on the relatively recent introduction of ACMV in Madagascar in light of data on the existence of this species in Africa. Whereas, the low level of selection will tend to overestimate the rate of substitution, it will also preserved the genetic imprints left in the genomes during the travel course along Madagascar and probably provide a more accurate phylogeographic signal.

To test different diffusion scenarios, we used a series of diffusion estimator and use correlation to assess if there was one of these that provide a better explanation of the genetic variability than others. Among the diffusion estimators, some intend to

recapture diffusions triggered by human activities with the transport, the accessibility and the population density (Figure 2). Some others would be more appropriate to describe the insect vector diffusion with the land cover and the elevation.

In order to assess if these descriptors provide different estimations of the diffusion than would the simple physical distance, we first assess for correlation between distances inferred using the estimators and the great-circle distance (Figure 3). Determination coefficient ranging from 0.4 (elevation) to 0.99 (land cover) were obtained. As land cover and transport distance estimates were highly correlated to great circle distances (0.99 and 0.93 respectively), we choose to discard these two estimators for further analysis.

Linear regression analyses were performed between all pairs of genetic distances and estimated distances with DNA-A (Figure 4 A to D) and DNA-B (Figure 4 E to H) datasets. For every distance estimator, higher explanations of the genetic variability were obtained for the DNA-B

component (26% to 70%) in comparison to the DNA-A component (6.7% to 42%). While there is no evident reason for that, it may be explained with differential selective pressure acting on the distinct

components or lower frequency in recombination between DNA-B components that would obscure the signal.

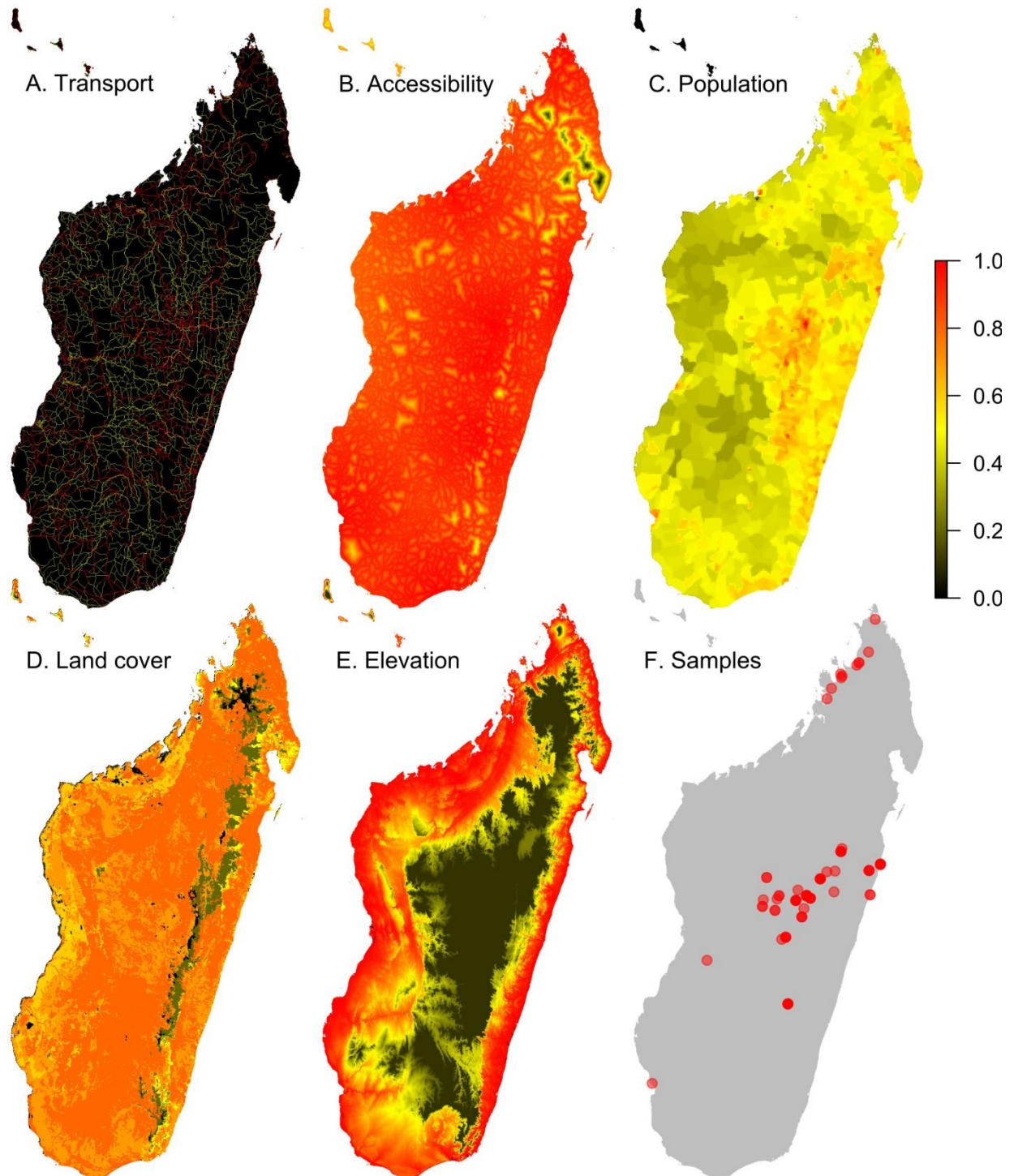


Figure 2: Maps of Madagascar representing the different diffusion estimators with (A) transport, (B) accessibility, (C) population density, (D) land cover and (E) elevation. Scale at top right indicates the normalised variation of the difficulty to go through an area with black representing the most difficult path to red representing the easiest. Sampling localities are presented on the bottom left (F).

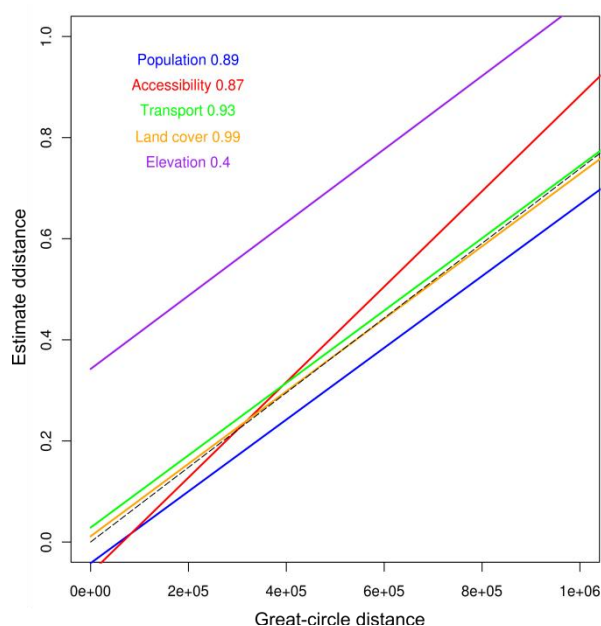


Figure 3: Correlation between the estimated distance using each of the diffusion estimator (population, accessibility, transport, land cover and elevation) and the great-circle distance. Regression lines are coloured according to the type of the diffusion estimator. Numbers after each name of diffusion estimators indicate the determination coefficient of the correlation (R^2). Dotted line corresponds to the regression line for a perfect positive correlation ($R^2 = 1$).

It is then apparent from our analysis that great-circle distance performed almost as good as any other estimator of the genetic distance. We obtained determination coefficient of respectively 0.357 and 0.629 for DNA-A and DNA-B component. The best estimates were obtained using estimators that intend to approximate human-mediated viral diffusion. The first is based on the population density. Using this estimator, we consider that viral diffusion would be more efficient within areas with higher population density that would provide more opportunities of exchange of infected plant material. For DNA-A and DNA-B respectively, 36.6% and 70.6% of the genetic variability were explained. The second estimator is the accessibility. This estimator combine several information to approximate the time needed for human to cross a given region. For DNA-A and DNA-B respectively, 42.2% and 69.2% of the genetic variability were explained. Whereas, these human mediated diffusion estimators performed a little better than great-circle distance, the elevation estimator designed to recapture insect vector mediated diffusion was at loss to properly recapture genetic distances. As little as 6.7% and 26.4% of the

genetic variability was explained. Based on previous studies on *B. tabaci* abundance depending on the elevation (Harimalala et al., in preparation), we parameterized this estimator so that a linear decrease in population of *B. tabaci* occurred from 0 to 1500m and a constant and low abundance of *B. tabaci* for elevation higher than 1500m. From our analyses, it is apparent that *B. tabaci* alone, is not responsible of the ACMV diffusion.

Epidemiological survey conducted in Madagascar (Harimalala et al., in preparation) and Africa (Sseruwagi et al., 2004; Zinga et al., 2012), demonstrated that up to 78 % of the stem cuttings used to initiate cassava culture were infected. Despite these results and a better performance of human mediated estimators, we cannot disregard the influence of the insect vector in the diffusion of ACMV. While diffusion of the viruses may not be ruled by *B. tabaci*, it will promote co-infections of plant with different variants or CMG species that will favour diversity and evolution of CMGs by recombination.

Concluding remarks

A total of six distinct CMG species were found in Madagascar with ACMV, SACMV, EACMCV, EACMKV, EACMV and the recently characterized CMMGV. Phylogenetic and phylogeographic analysis of ACMV isolates suggested that these Malagasy isolates were issued from a single introduction that occurred around 1993 (95 % HPD ranging from 1987 to 1999). Analysis of ACMV diffusion patterns in Madagascar demonstrated that isolation with distance, regardless of the landscape, is an excellent estimator of the genetic diversity. Diffusion estimators designed to recapture human-mediated diffusion of viruses performed a little better than spatial distance, suggesting that human activity may be the principal factor in the diffusion of CMGs. Nevertheless, as distance and human mediated predictors are highly correlated, no clear cut conclusion could be drawn from our analysis. Also, and as suggested in previous epidemiological studies, *B. tabaci* alone poorly explain the diffusion of ACMV. The use of model-based methods in phylogeography that combines several predictors would help understanding the distinct contribution of human and insect vector in CMGs diffusion. As retracing the evolutionary past of emerging viral complexes has become a milestone in our understanding of emergence, such models will surely be available in the coming years.

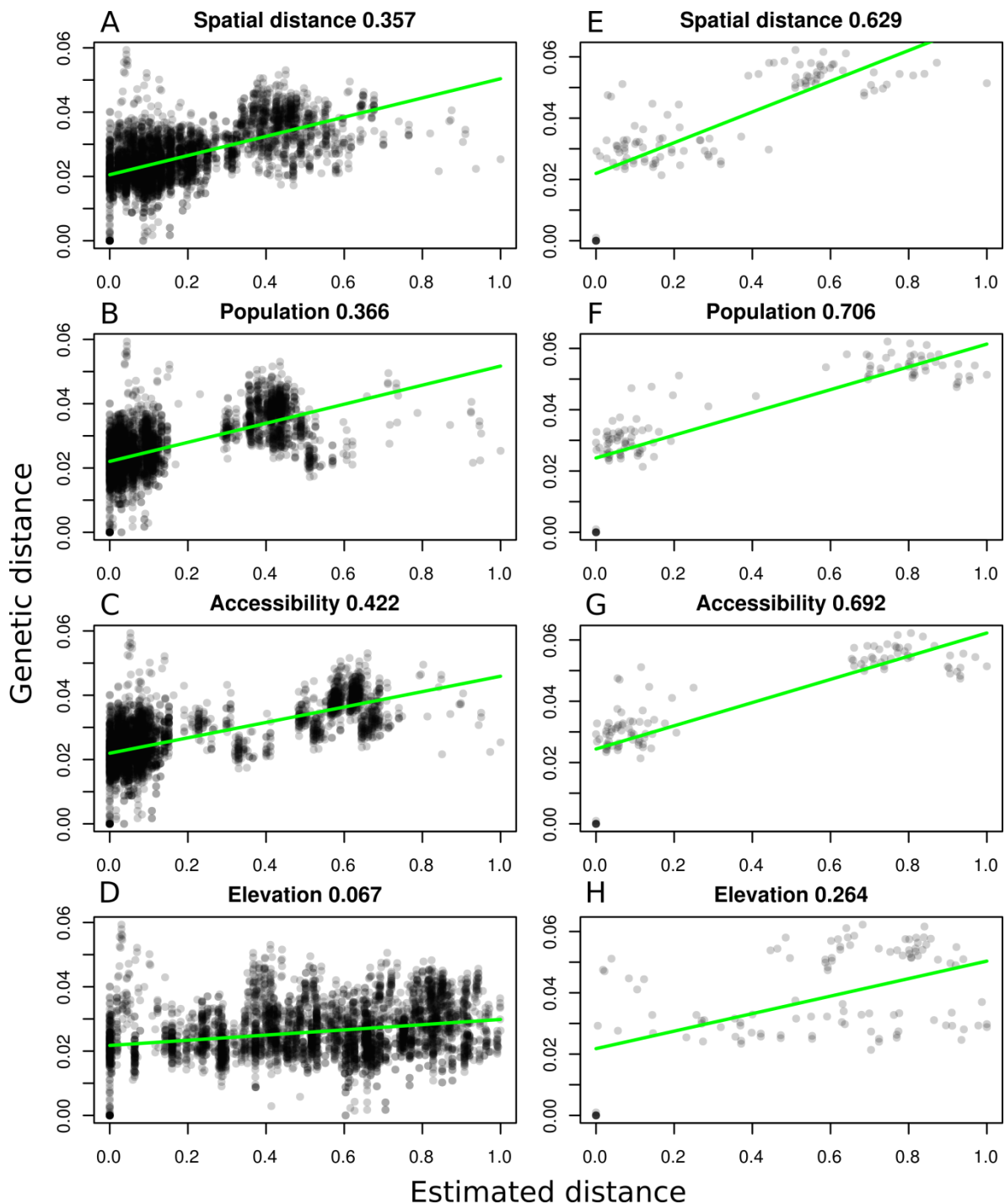


Figure 4: Linear correlation between the genetic distance and the distance obtained from the different diffusion estimators. Rows of panels display correlation plots of genetic distance with respectively spatial distance (A and E), population (B and F), accessibility (C and G) and elevation (D and H). Columns correspond to the correlation plots of DNA-A (A to D) and DNA-B (E to H) components. Points in the plots correspond to all possible combinations of virus pairs. The green lines represent the linear regressions. The values of the coefficient of determination (R^2) are given on each plot.

Acknowledgements

This work was funded by the *Centre de recherche et de veille sanitaire sur les maladies émergentes dans l'océan Indien* (CRVOI) through the EmerGe grant (PRAO/AIRD/CRVOI/08/03), the *Région Réunion*, the European Union (FEDER) and the CIRAD. The funders had no role in study design,

data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. Computations have been performed on the supercomputer facilities of the University of Reunion.

References

- Bloomquist EW, Lemey P, Suchard MA (2010). Three roads diverged? Routes to phylogeographic inference. *Trends Ecol. Evol.* 25:626–632.
- Bock K, Woods R (1983). Etiology of African cassava mosaic disease. *Plant Disease* 67:994-995
- Bock KR, Guthrie EJ, Figueiredo G (1981). A strain of cassava latent virus occurring in coastal districts of Kenya. *Ann. Appl. Biol.* 99:151–159.
- Bull SE, Briddon RW, Sserubombwe WS, Ngugi K, Markham PG, Stanley J (2006). Genetic diversity and phylogeography of cassava mosaic viruses in Kenya. *The Journal of general virology* 87:3053-3065
- Chambers JM (2008). SoDA: Functions and Examples for "Software for Data Analysis". R package version 1.0-3.
- Clark CA, Davis JA, Mukasa SB, Abad JA, Tugume AK, et al. (2012) Sweetpotato Viruses: 15 Years of Progress on Understanding and Managing Complex Diseases. *Plant Disease* 96:168-185.
- Cours G (1951). Le manioc à Madagascar. Mémoire de l'Institut Scientifique de Madagascar. *Biologie Végétale* 3:203-416 (In french)
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8), 772.
- De Bruyn A, Julie Villemot, Pierre Lefeuvre, Emilie Villar, Hoareau M, Harimalala M, Abdoul-Karime AL, Abdou-Chakour C, Reynaud B, Harkins GW, Varsani A, Martin DP, Lett JM (2012). East African cassava mosaic-like viruses from Africa to Indian Ocean Islands: molecular diversity, evolutionary history and geographical dissemination of a bipartite begomovirus. *BMC Evol. Biol.* Accepted.
- Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol. Biol. Evol.* 29:1969–1973.
- Duffy S, Holmes EC (2009). Validation of high rates of nucleotide substitution in geminiviruses: phylogenetic evidence from East African cassava mosaic viruses. *J. Gen. Virol.* 90:1539–1547.
- Edgar RC (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research* 32:1792-7
- Faria NR, Suchard MA, Rambaut A, Lemey P (2011). Toward a quantitative understanding of viral phylogeography. *Curr; Opin. Virol.* 1:423–429.
- Gibbs AJ, Fargette D, García-Arenal F, Gibbs MJ (2010). Time--the emerging dimension of plant virus studies. *J. Gen. Virol.* 91:13–22.
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59:307-321.
- Harimalala M, Lefeuvre P, De Bruyn A, Tiendrébogo F, Hoareau M, Ranomenjanahary S, Andrianjaka A, Reynaud B, Lett J-M (2012). A novel cassava-infecting begomovirus from Madagascar: cassava mosaic Madagascar virus. *Archives of Virology* 157:2027–2030.
- Harkins GW, Delpont W, Duffy S, Wood N, Monjane AL, Owor BE, Donaldson L, Saumtally S, Triton G, Briddon RW, Shepherd DN, Rybicki EP, Martin DP, Varsani A (2009). Experimental evidence indicating that mastreviruses probably did not co-diverge with their hosts. *Virol. J.* 6, 104.
- van Etten J (2012). Gdistance: distances and routes on geographical grids. R package version 1.1-3.
- Jeske H (2009). Geminiviruses. *TT Viruses: The Still Elusive Human Pathogens*. Pp 185-226
- Lam TTY, Hon CC, Lemey P, Pybus OG, Shi M, Tun HM, Li J, Jiang JI, Holmes EC, Leung FC (2012). Phylodynamics of H5N1 avian influenza virus in Indonesia. *Molecular Ecology*, 21:3062-3077.
- Lefeuvre P, Martin DP, Hoareau M, Naze F, Delatte H, Thierry M, Varsani A, Becker N, Reynaud B, Lett JM (2007). Begomovirus “melting pot” in the south-west Indian Ocean islands: molecular diversity and evolution through recombination. *Journal of general virology* 88:3458-68
- Lefeuvre P, Lett JM, Reynaud B, Martin DP (2007). Avoidance of protein fold disruption in natural virus recombinants. *PLoS Pathog.* 3:e181.
- Lefeuvre P, Martin DP, Harkins G, Lemey P, Gray AJA, Meredith S, Lakay F, Monjane A, Lett JM, Varsani A, Heydarnejad J (2010). The spread of Tomato yellow leaf curl virus from the Middle East to the world. *PLoS Pathogens* 6:e1001164
- Legg JP, Fauquet CM (2004). Cassava mosaic geminiviruses in Africa. *Plant Molecular Biology* 56:585-599
- Legg JP, Ogwal S (1998) Changes in the incidence of African cassava mosaic virus disease and the abundance of its whitefly Vector along south-north transects in Uganda. *Journal of Applied Entomology-Zeitschrift Fur Angewandte Entomologie* 122: 169-178.
- Lemey P, Rambaut A, Drummond AJ, Suchard MA (2009). Bayesian phylogeography finds its roots. *PLoS*

Comput. Biol. 5:e1000520.

Lemey P, Rambaut A, Welch JJ, Suchard MA (2010). Phylogeography takes a relaxed random walk in continuous space and time. *Mol. Biol. Evol.* 27:1877–1885.

Levi T, Kilpatrick AM, Mangel M, Wilmers CC (2012). Deer, predators, and the emergence of Lyme disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109:10942–10947.

Meentemeyer RK, Haas SE, Václavík T (2012). Landscape epidemiology of emerging infectious diseases in natural and human-altered ecosystems. *Annu Rev Phytopathol* 50:379–402.

Monjane AL, Harkins GW, Martin DP, Lemey P, Lefeuvre P, Shepherd DN, Oluwafemi S, Simuyandi M, Zinga I, Komba EK, Lakoutene DP, Mandakombo N, Mboukoulida J, Semballa S, Tagne A, Tiendrébéogo F, Erdmann JB, van Antwerpen T, Owor BE, Flett B, Ramusi M, Windram OP, Syed R, Lett JM, Briddon RW, Markham PG, Rybicki EP, Varsani A (2011). Reconstructing the history of maize streak virus strain a dispersal to reveal diversification hot spots and its origin in southern Africa. *J. Virol.* 85:9623–9636.

Ndunguru J, Legg JP, Aveling TAS, Thompson G, Fauquet CM (2005). Molecular biodiversity of cassava begomoviruses in Tanzania: evolution of cassava geminiviruses in Africa and evidence for East Africa being a center of diversity of cassava geminiviruses. *Virol. J.* 2:21.

Padidam M, Sawyer S, Fauquet CM (1999). Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* 265:218–225.

Patil BL, Fauquet CM (2009). Cassava mosaic geminiviruses: actual knowledge and perspectives. *Molecular Plant Pathology* 10(5):685–701

Popescu AA, Huber KT, Paradis E (2012). ape 3.0: New tools for distance-based phylogenetics and evolutionary analysis in R. *Bioinformatics* 28, 1536–1537.

Posada D, Crandall KA (2002). The effect of recombination on the accuracy of phylogeny estimation. *J. Mol. Evol.* 54:396–402.

Pullan RL, Sturrock HJW, Soares Magalhães RJ, Clements ACA, Brooker SJ (2012). Spatial parasite ecology and epidemiology: a review of methods and applications. *Parasitology* 1–18.

R Development Core Team (2010). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

Sseruwagi P, Sserubombwe WS, Legg JP, Ndunguru J, Thresh JM (2004). Methods of surveying the incidence and whitefly vector populations on cassava in Africa: A review. *Virus Res.* 100:129–142.

Shepherd DN, Martin DP, Lefeuvre P, Monjane AL, Owor BE, Rybicki EP, Varsani A (2008). A protocol for the rapid isolation of full geminivirus genomes from dried plant tissue. *Journal of virological methods* 149:97–102

Stanley J, Gay MR (1983). Nucleotide sequence of cassava latent virus DNA. *Nature*, 301:260–262.

Talbi C, Lemey P, Suchard MA, Abdelatif E, Elharrak M, Nourilil J, Jalal N, Faouzi A, Echevarría JE, Vazquez Morón S, Rambaut A, Campiz N, Tatem AJ, Holmes EC, Bourhy H (2010). Phylodynamics and human-mediated dispersal of a zoonotic virus. *PLoS Pathog.* 6:e1001166.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739.

Tiendrebéogo F, Lefeuvre P, Hoareau M, Harimalala MA, De Bruyn A, Villemot J, Traoré V, Konaté G, Traoré A, Barro N, Reynaud B, Traoré O, Lett J-M (2012). Evolution of African cassava mosaic virus by recombination between bipartite and monopartite begomoviruses. *Virology Journal*, 9:67.

Warburg, O., 1894. Die kulturpflanzen usambaras. *Mitt. Dtsch Schutzgebieten* 7:131.

Zhou X, Liu Y, Calvert L, Munoz C, Otim-Nape GW, Robinson DJ, Harrison BD (1997). Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. *Journal of general virology* 78:2101–2111

Zinga I, Chiroleu F, Legg J, Lefeuvre P, Kosh Komba E, Semballa S, Yandia SP, Mandakombo N, Reynaud B, Lett J-M (2012). Epidemiological assessment of cassava mosaic disease in Central African Republic reveals the importance of viral mixed infection and poor health of plant cuttings, *Crop Protection*, accepted.

Discussion

DISCUSSION GENERALE

La culture du manioc est une des cultures vivrières les plus importantes en Afrique et à Madagascar. Les principales contraintes biotiques de cette culture sont les attaques des ravageurs et les maladies virales. Plus particulièrement, la maladie de la mosaïque du manioc (*cassava mosaic disease*, CMD) est l'une des maladies virales les plus dommageables (Legg and Fauquet, 2004), causant des pertes considérables. Dans un premier volet, ce travail de thèse a eu pour objectifs de réaliser une surveillance épidémiologique de la CMD à Madagascar en prenant en compte les principales régions productrices de manioc, et d'identifier les principaux facteurs épidémiologiques associés (Chapitre II, article 1 en préparation pour *Plant Pathology*). Dans un second volet, nous nous sommes focalisés sur la caractérisation de nouvelles espèces de CMGs et satellites associés. Nous avons ainsi décrit moléculairement une nouvelle espèce de CMG nommée Cassava mosaic Madagascar virus (CMMGV ; chapitre III, article 2, *Annotated sequence record* accepté dans le journal *Archives of Virology*) et une nouvelle espèce d'alphasatellite nommée Cassava mosaic Madagascar alphasatellite (CMMGA) isolée à partir d'échantillons de manioc infectés par les CMGs (Chapitre III, article 3, *Annotated sequence record* soumis dans le journal *Archives of Virology*). Le troisième volet a consisté à étudier la phylogéographie des CMGs à Madagascar et à analyser les facteurs associés à leur diffusion spatiale (Chapitre IV, article 4 en préparation).

Epidémiologie de la CMD à Madagascar

La réalisation de plusieurs campagnes de surveillance épidémiologique à Madagascar a permis de collecter plusieurs centaines d'échantillons de feuilles de manioc, présentant majoritairement des symptômes de CMD. Le diagnostic moléculaire des CMGs a permis de détecter la présence d'une diversité sans précédente de CMGs associés à la CMD dans une région en Afrique, ainsi qu'une forte hétérogénéité d'expression de la maladie (Chapitre II, article 1). L'analyse des échantillons a permis de démontrer que l'altitude joue un rôle important dans la distribution et la répartition des CMGs. Les régions les plus affectées par la

CMD sont principalement celles de basse altitude (< 200m) pour lesquelles 91% des parcelles visitées présentent une prévalence forte (68-100%). C'est également dans ces régions de basse altitude que les populations d'aleurodes les plus abondantes ont été observées avec 60% des plants colonisés par au moins un aleurode adulte. La forte prévalence de la CMD et l'abondance des populations d'aleurode dans ces régions remplissent certaines conditions clefs qui ont été associées à la pandémie sévère de CMD en Afrique de l'Est (Legg and Fauquet, 2004; Legg et al., 2006).

Les régions les moins affectées par la CMD sont les régions de moyenne (200-800m) et de haute altitude (>800m) qui sont principalement situées sur la partie centrale de Madagascar (Hauts-Plateaux centraux). La prévalence de la CMD y est faible (0-33%) et les insectes vecteurs sont peu abondants. Cette situation épidémiologique avait déjà été constatée à Madagascar par Cours (1951), qui ont rapporté que les aleurodes sont moins abondants dans les régions d'altitude très ventilées qui présentent toujours une plus grande proportion de plants sains. La dynamique épidémiologique des virus de plante est influencée par les conditions climatiques comme la pluviométrie, la température et la vitesse du vent, l'altitude, mais aussi par la distribution, l'abondance et l'activité de l'insecte vecteur (Jones, 2009).

La diversité génétique des CMGs à Madagascar

Les travaux de caractérisation moléculaire des agents causaux de la CMD à partir des échantillons de feuilles de manioc collectés à Madagascar nous ont permis d'obtenir une description sans précédente de la diversité des CMGs avec 400 séquences nucléotidiques complètes de composants d'ADN-A et d'ADN-B de CMGs. Ces séquences complètes nous ont permis d'assigner les isolats viraux à plusieurs espèces de CMGs mais aussi de déterminer la diversité génétique des CMGs à Madagascar.

Six espèces de CMGs ont ainsi été identifiées avec l'ACMV, l'EACMCV, l'EACMKV, l'EACMV, le SACMV et la nouvelle espèce CMMGV (Chapitre III, Harimalala et al., 2012). L'identification de ces six espèces démontre que la diversité génétique des CMGs à Madagascar est extrêmement importante. Même si l'étude de la diversité des CMGs et plus largement des bégomovirus n'en est qu'à ses débuts en Afrique, force est de constater que nos travaux

démontrent que Madagascar représente un *hot spot* de diversité des CMGs, compatible avec l'importante diversité décrite de bégomovirus monopartites à Madagascar et dans les îles du sud ouest de l'océan Indien (Delatte et al., 2005b; Lefeuvre et al., 2007a). Nos résultats font de Madagascar un haut lieu de la diversité des CMGs. Cependant, on peut se poser la question de l'origine de cette diversité. En effet, selon son origine, cette diversité pourrait nous fournir des renseignements précieux sur l'histoire de la CMD à l'échelle de l'Afrique et des ses îles, et sur les mécanismes d'évolution et de diffusion des CMGs.

L'Afrique de l'Est est considéré comme le centre d'origine et de diversification des CMGs, notamment sur la base de la diversité décrite en CMGs (Bull et al., 2006; Ndunguru et al., 2005). La proximité entre Madagascar et l'Afrique de l'Est, et la présence dans cette zone d'une diversité très grande en CMGs suggèrent l'existence vraisemblable d'évènements de migration. De récents travaux portant sur la phylogéographie des CMGs dans les îles des Comores et des Seychelles, au large de Madagascar et de l'Afrique de l'Est, ont démontré que plusieurs échanges probablement de matériel infecté avec le continent Africain, datée de ces deux dernières décennies, sont à l'origine des populations aujourd'hui détectée dans ces îles (De Bruyn et al., 2012 accepté dans BMC). Il est fort probable que les populations présentes actuellement à Madagascar soient elles aussi issues d'évènements récents d'introduction depuis l'Afrique de l'Est.

Distribution géographique des différentes espèces de CMGs

L'analyse de la distribution spatiale des CMGs montre que toutes ces espèces ne sont pas distribuées uniformément sur le territoire malagasy. L'ACMV est plus fréquent dans les régions de moyenne (200-800m) et de haute altitudes (> 800m) correspondant aux Hauts-Plateaux du centre du pays tandis que les autres espèces se retrouvent principalement dans les régions de basse altitude (0-200m) et côtières. L'EACMCV et le SACMV ont été décrits dans la plupart des régions visitées tout en étant plus fréquents dans les régions de basse altitude. Même si la prévalence de chacune de ces espèces de CMGs est distincte, le chevauchement de leurs aires de répartition a été observé. En effet, nous avons pu démontrer la coexistence de plusieurs espèces de CMGs dans la plupart des régions surveillées, ce qui a inévitablement comme conséquence de favoriser les rencontres.

L'infection mixte des CMGs et les risques encourues

Les tests de diagnostic effectués sur les échantillons de manioc collectés à l'échelle du pays ont démontré que la coinfection par plusieurs espèces de CMGs était une situation fréquente, avec 21 % d'échantillons coinfectés. Nous avons ainsi décrit une pression parasitaire sans précédente de la CMD avec deux (15%), trois (5%) ou quatre (1%) espèces distinctes de CMGs détectées dans un seul et même échantillon. Par ailleurs, nos analyses ont démontré que les plantes coinfectées présentaient des symptômes significativement plus sévères, suggérant l'existence d'un mécanisme de synergie virale comme celui impliqué dans la pandémie sévère de CMD en Afrique continentale (Fondong et al., 2000; Patil and Fauquet, 2010; Pita et al., 2001a). Des études moléculaires portant sur le mécanisme de synergie entre l'ACMV et l'EACMV-UG en coinfection sur le manioc ont montré que l'expression de symptômes plus sévères était due à la combinaison de deux supprimeurs de PTGS permettant de surmonter les mécanismes naturels de défense de la plante hôte (Vanitharani et al., 2004). Bien que ces études sur le synergisme aient déjà été effectuées sur des isolats viraux d'Afrique continentale, il serait tout de même intéressant de réaliser des tests biologiques pour les isolats malagasy de CMGs afin de confirmer (1) la pathogénicité de ces virus et (2) l'expression et l'importance du phénomène de synergie virale.

La coinfection d'une plante hôte représente la première étape nécessaire pour la recombinaison ou la pseudo-recombinaison entre les virus, qui représentent avec la mutation les mécanismes majeurs de l'évolution des géminivirus (Lefeuvre et al., 2007a; Padidam et al., 1999). De l'action de ces mécanismes résulte l'augmentation du nombre de variants ou de nouvelles espèces virales (Ndunguru et al., 2005; Patil and Fauquet, 2009; Pita et al., 2001a). Les EACMV-like sont connues pour leur penchant prononcé pour la recombinaison et pour leurs génomes « mosaïques » (Ndunguru et al., 2005). Avec la coexistence de six espèces de CMGs, Madagascar présente un risque important d'émergence par recombinaison de variants. D'ailleurs, l'identification d'une nouvelle espèce malagasy de CMG (CMMGV, chapitre III, article 2) démontre que la recombinaison participe à la diversification de ces virus.

Cassava mosaic Madagascar virus : une nouvelle espèce qui témoigne de la diversité des bégomovirus dans les îles du sud-ouest de l'océan Indien

En plus de la présence de cinq autres espèces de CMG, l'identification de la nouvelle espèce Cassava mosaic Madagascar virus (CMMGV) souligne une fois de plus la très grande diversité génétique des CMGs à Madagascar. Plus largement, elle témoigne de l'importance de la diversité des bégomovirus existant dans les îles du sud-ouest de l'océan Indien (SWIO) (Delatte et al., 2005b; Lefeuvre et al., 2007a). Le remplacement phylogénétique ainsi que les analyses de recombinaison effectuées démontrent l'origine recombinante de ce virus entre un bégomovirus bipartite inféodé au manioc (CMG) et un bégomovirus monopartite généralement décrit sur les cultures maraîchères. En effet, bien que certaines régions de l'ADN-A soient similaires à des séquences de bégomovirus bipartites du manioc décrits en Afrique, une partie du génome est plus proche des séquences de bégomovirus monopartites décrits dans les îles du sud-ouest de l'océan Indien (*Tomato leaf curl Namakely virus* ; ToLCNamV-MG [MG:Nam:01] ; Delatte et al., 2005b). Cela confirme à la fois la relation phylogénétique étroite entre les bégomovirus monopartite et bipartite africains (Lefeuvre et al., 2007a) et le fait que la recombinaison est une source de diversité génétique pour les géminivirus (Padidam et al., 1999).

Malgré notre effort d'échantillonnage important, nous n'avons détecté le CMMGV que dans un unique échantillon de manioc collecté dans le sud-ouest de Madagascar (Toliary). Pour tenter d'expliquer ce résultat, on peut proposer premièrement que cette nouvelle espèce est en phase d'expansion et qu'elle pourrait à terme augmenter en prévalence pour devenir émergente. Dans ce scénario, les futures campagnes d'échantillonnage effectuées dans la région de Tuléar devraient permettre de confirmer sa présence et sa prévalence sur manioc, et fourniraient par la même occasion un matériel d'étude précieux pour suivre l'émergence d'une nouvelle espèce virale. Deuxièmement, il est également envisageable que ce virus ne soit en fait que le représentant d'une espèce éteinte ou condamnée à l'extinction. En effet, différents travaux ont suggéré que durant l'évolution des CMGs une constante dynamique d'apparition de nouveaux variants recombinants opère et que parmi les recombinants créés, seuls les virus les plus adaptés et rencontrant des circonstances favorables vont se répandre dans la population pour devenir des virus circulants (Lefeuvre et al., 2007b; Owor et al., 2007). Le fait que le CMMGV soit issu de la recombinaison entre un virus du manioc et un

virus plus spécifiquement retrouvé sur tomate pourrait soutenir cette seconde hypothèse. En effet, à ce jour très peu de virus recombinants CMG/non CMG ont été décrits. L'unique cas documenté concerne un virus décrit sur manioc au Burkina Faso (Tiendrébéogo et al., 2012), partageant le statut épidémiologique incertain du CMMGV. Afin d'obtenir de plus amples informations sur ces questions, il sera nécessaire de réaliser de nouveaux prélèvements sur le terrain et d'effectuer des tests biologiques pour (1) confirmer la capacité de ce virus à infecter le manioc (vérifier le postulat de Koch) et (2) tester ses paramètres biologiques (valeur sélective (*fitness*) et virulence en infection simple et mixte (compétition), et capacité à surmonter une résistance).

Cassava mosaic Madagascar alphasatellite (CMMGA)

Durant les travaux de clonage de virus, nous avons obtenu un profil de restriction inhabituel pour certains échantillons avec la présence de bande de taille inférieure (~1,3kb) à celle escomptée pour un composant génomique de CMG (2,7kb). Le séquençage de ces bandes a permis la caractérisation d'un ADN satellite de type alphasatellite associé aux CMGs. Les alphasatellites sont impliqués dans la modulation des symptômes associés aux bégomovirus ou aux complexes bégomovirus/betasatellite, mais ils ne semblent jouer aucun rôle essentiel dans le maintien de la maladie (Briddon and Stanley, 2006; Patil and Fauquet, 2010). Depuis quelques années, ces ADN satellites sont fréquemment décrits comme associés au bégomovirus. Patil et Fauquet (2010) ont démontré expérimentalement que certains CMGs (ICMV, EACMZV et EACMKV) sont capables de *trans*-répliquer les betasatellites et d'interagir avec les alphasatellites. Cependant, aucuns alphasatellites ou betasatellites n'avaient été décrits en association avec un CMG à partir d'échantillons collectés sur le terrain.

La caractérisation moléculaire du Cassava mosaic Madagascar alphasatellite (CMMGA) a permis de faire une première description de l'association naturelle entre un alphasatellite et un CMG (EACMKV) sur le manioc. Le CMMGA présente seulement 80% d'identité nucléotidique avec la séquence la plus apparentée, le Coton leaf curl Gezira alphasatellite (CLCuGA-[SD:SH7:96]). En considérant le seuil de démarcation d'une nouvelle espèce en vigueur pour les alphasatellites de 83% d'identité nucléotidique (Mubin et al., 2009), le CMMGA peut être considéré comme une nouvelle espèce d'alphasatellite. De manière

importante, la présence du CMMGA a été détectée par PCR dans plusieurs échantillons de manioc provenant de localités distinctes situées dans la région nord de Madagascar. Au delà de démontrer que ce satellite n'est pas cryptique, cela nous amène à nous s'interroger sur son implication dans la pathogénicité des CMGs et l'expression des symptômes de la CMD. Des tests biologiques devraient être effectués afin de mieux comprendre son importance biologique.

Par ailleurs, deux autres types de molécules satellites (satDNA-II et satDNA-III) isolées à partir de manioc affecté par la CMD ont été décrites (Fauquet, communication personnelle, d'après Briddon and Stanley, 2006 ; (De León et al., 2012)). Les données actuelles suggèrent que ces satellites en association avec l'ACMV, accentuent les symptômes de la CMD et permettent de surmonter la résistance chez un cultivar local de manioc d'Afrique de l'Est (TME3) (Fauquet, communication personnelle, d'après Briddon and Stanley, 2006) et chez *Arabidopsis thaliana* (De León et al., 2012). La découverte du CMMGA et la description des satellites satDNA-II et satDNA-III en association avec la CMD suggèrent la nécessité de réaliser une analyse plus détaillée de ces composants satellites et une évaluation de leur contribution à la pandémie de la CMD en Afrique (pour revue Legg and Fauquet, 2004). En effet, la sévérité des symptômes de CMD a été associée à un phénomène de synergie de l'ACMV avec l'EACMV-UG en l'Afrique de l'Est (Harrison et al., 1997; Pita et al., 2001a). Toutefois, la présence de l'EACMV-UG en Afrique du Sud (Berry and Rey, 2001) et au Burkina Faso (Tiendrébéogo et al., 2009) n'a pas été associée à une très forte sévérité ni à une quelconque forme d'épidémie de CMD (Legg et al., 2011). Malgré l'importance de l'effet synergique des CMGs sur la sévérité de la CMD en infection mixte, démontrée au champ (cf. Chapitre II - Article 1, Zinga et al., 2012) et expérimentalement (Vanitharani et al., 2004), les données actuelles suggèrent néanmoins que d'autres facteurs tels que les ADN satellites pourraient être impliqués dans l'expression de symptômes sévères.

Origine et dissémination de l'ACMV à Madagascar

La détermination des facteurs clés associés à la dissémination des CMGs est une étape indispensable afin de mieux comprendre les conditions d'émergence d'un virus et les paramètres associés au succès d'une épidémie. L'ACMV représente un excellent modèle

pour étudier l'histoire évolutive des CMGs à Madagascar sachant (1) que cette espèce est largement distribuée en Afrique continentale et à Madagascar (cf. Chapitre II, article 1), et (2) que de nombreuses séquences de génomes complets sont actuellement disponibles dans les bases de données publiques.

Avant d'étudier la diffusion de l'ACMV à Madagascar, nous avons pu montrer à l'aide d'outils phylogénétiques, que l'ensemble des isolats d'ACMV malagasy décrit moléculairement était probablement issu d'une unique introduction en provenance d'Afrique continentale (cf. Chapitre IV, article 4). En effet, ces isolats forment un groupe phylogénétique distinct des autres isolats d'ACMV africains, ceci suggérant une introduction unique. Par la suite, nous avons tenté de dater cet événement d'introduction en utilisant une approche phylogéographique basée sur les inférences bayésiennes. Notre analyse suggère que l'ACMV semble ainsi avoir été introduit de l'Afrique continentale vers 1993. Cette introduction récente de l'ACMV serait postérieure à l'épidémie de CMD sévère décrite à Madagascar dans les années 1930s (Cours, 1951). Elle signifierait (1) que des espèces de CMGs autres que l'ACMV ont causé cette épidémie ou (2) que les isolats d'ACMV présents à l'époque auraient été remplacés par les isolats d'ACMV récemment introduits. Toutefois, les nombreux biais inhérents à ce type d'analyse suggèrent que les données de datation doivent être interprétées avec prudence et qu'il est difficile de dater des événements anciens lorsque les analyses de datation ne sont calibrées qu'avec des séquences récemment isolées (Gibbs et al., 2010; Harkins et al., 2009).

Dans un second temps, nous avons tenté de comprendre quels étaient les facteurs associés à la dispersion de l'ACMV à Madagascar. Pour ce faire, nous avons d'abord utilisé différents prédicteurs de la diffusion virale, certains associés aux activités humaines, d'autres à l'insecte vecteur, pour ensuite déterminer le ou lesquels expliquaient le mieux la diffusion spatiale de l'ACMV constatée à Madagascar.

Nous avons ainsi montré que la variabilité génétique de l'ACMV est fortement corrélée avec la distance géographique. L'utilisation de prédicteurs de la distance associée aux déplacements humains permet d'améliorer légèrement cette corrélation. Par contre, l'utilisation d'un prédicteur associé au déplacement des aleurodes vecteurs comme l'altitude ne permet pas d'obtenir une bonne corrélation avec la distance génétique. Cela suggère que

la diffusion de l'ACMV est fortement influencée par le facteur humain et que *B. tabaci* seul ne peut expliquer la diffusion des CMGs à l'échelle de Madagascar. Les activités humaines comme l'utilisation de boutures infectées pour la replantation des parcelles et le déplacement des populations, notamment lors des périodes de sécheresse régulière que subit le Sud de Madagascar, sont probablement les principales causes de la dissémination de ces virus. A ce titre, la mauvaise qualité sanitaire des boutures de manioc a été un des résultats majeurs de notre étude épidémiologique, puisque plus de 95% des infections ont été associées aux boutures contaminées (Chapitre 2 - Article 1).

L'ensemble de nos résultats suggère que *B. tabaci* ne représente pas le principal moteur de la diffusion de l'ACMV à Madagascar (Chapitre IV, article 4). Cependant, son rôle dans la dissémination à courte distance n'est pas à sous estimer notamment dans les régions où les populations d'aleurode sont abondantes (cas des régions de basse altitude : 0-200m). D'ailleurs, il intervient probablement dans l'augmentation de la prévalence de la maladie à l'échelle de la parcelle ou de l'agrosystème (Chapitre II, article 1) et favorise le risque de coinfection dans les régions où plusieurs espèces virales sont présentes. Dans l'avenir, de nouvelles études réalisées à différentes échelles géographiques permettront vraisemblablement de mieux comprendre et évaluer la part de la contribution humaine de celle de l'insecte vecteur dans la diffusion des CMGs.

Vers des méthodes intégrées de lutte contre la CMD

Ce travail de thèse a apporté une plus grande connaissance de la situation de la CMD à Madagascar, de la diversité génétique des CMGs et leurs principaux facteurs de dissémination au pays. Au delà des perspectives de travail décrites dans les paragraphes précédents, la suite de ce travail de thèse pourra s'orienter vers la recherche des moyens appropriés de lutte contre la CMD. L'identification au niveau moléculaire des CMGs infectant le manioc et présents dans les différentes régions du pays fournit des informations importantes pour l'élaboration de stratégies de lutte contre la CMD, notamment pour tester la résistance ou la tolérance d'une variété à un virus particulier dans une région donnée (Bull et al., 2006). Plusieurs méthodes courantes peuvent être appliquées à la filière du manioc à Madagascar dont (1) la sélection de variétés locales résistantes ou tolérantes à la CMD et

compatibles avec les exigences sociaux-culturelles et les pratiques culinaires des différentes ethnies présentes à Madagascar, (2) l'assainissement des boutures pour éviter l'infection précoce et diminuer la prévalence de la maladie à long terme et enfin (3) le plus important, la prise de conscience par les agriculteurs de l'importance de cette maladie sur les pertes de rendement et les risques épidémiques.

Références

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abraham, A. (1956). Tapioca cultivation in India. *Farm Bulletin* **17**, 20.
- Abubakar, Z., Ali, F., Pinel, A., Traoré, O., N'Guessan, P., Notteghem, J. L., Kimmins, F., Konaté, G., and Fargette, D. (2003). Phylogeography of Rice yellow mottle virus in Africa. *Journal of General Virology* **84**(3), 733-743.
- Ariyo, O. A., Koerbler, M., Dixon, A. G. O., Atiri, G. I., and Winter, S. (2005). Molecular variability and distribution of cassava mosaic begomoviruses in Nigeria. *Journal of Phytopathology* **153**(4), 226-231.
- Astier, S., Albouy, J., Maury, Y., and Lecoq, H. (2001). "Principes de virologie végétale: génome, pouvoir pathogène, écologie des virus." INRA.
- Awise, J. C. (1998). The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology* **7**(4), 371-379.
- Bassett, T. J. (2010). Reducing hunger vulnerability through sustainable development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**(13), 5697-5698.
- Berrie, L. C., Palmer, K. E., Rybicki, E. P., and Rey, M. E. C. (1998). Molecular characterisation of a distinct South African cassava infecting geminivirus. *Archives of Virology* **143**(11), 2253-2260.
- Berry, S. D., Fondong, V. N., Rey, C., Rogan, D., Fauquet, C. M., and Brown, J. K. (2004). Molecular evidence for five distinct Bemisia tabaci (Homoptera: Aleyrodidae) geographic haplotypes associated with cassava plants in sub-Saharan Africa. *Annals of the Entomological Society of America* **97**(4), 852-859.
- Berry, S., and Rey, M. E. C. (2001). Molecular evidence for diverse populations of cassava-infecting begomoviruses in southern Africa. *Archives of Virology* **146**(9), 1795-1802.
- Bertram, R. B., and Schaal, B. A. (1993). Phylogeny of Manihot and the evolution of cassava. *Cassava Biotechnology Network Newsletter* **1**, 4-6.
- Bock, K. R., and Harrison, B. D. (1985). African cassava mosaic virus. *Annals of Applied Biology Descriptions of plant viruses*(297).
- Bock, K. R. (1975). Maize streak, cassava latent and similar viruses. In "Third International Congress for Virology", pp. 93, Madrid, Spain.
- Boher, B., and Verdier, V. (1994). Cassava bacterial blight in Africa: the state of knowledge and implications for designing control strategies. *African Crop Science Journal* **2**(4), 505-509.
- Bouriquet, G. (1946). Les maladies des plantes cultivées à Madagascar. In "Encyclopédie Mycologique", Vol. 12, pp. 545. Lechevalier, Paris.

- Briddon, R. W., and Stanley, J. (2006). Subviral agents associated with plant single-stranded DNA viruses. *Virology* **344**(1), 198-210.
- Briddon, R. W., Bull, S. E., Amin, I., Mansoor, S., Bedford, I. D., Rishi, N., Siwatch, S. S., Zafar, Y., Abdel-Salam, A. M., and Markham, P. G. (2004). Diversity of DNA 1: a satellite-like molecule associated with monopartite begomovirus–DNA β complexes. *Virology* **324**(2), 462-474.
- Briddon, R. W., Mansoor, S., Bedford, I. D., Pinner, M. S., Saunders, K., Stanley, J., Zafar, Y., Malik, K. A., and Markham, P. G. (2001). Identification of DNA components required for induction of cotton leaf curl disease. *Virology* **285**(2), 234-243.
- Brown, J. K., Fauquet, C. M., Briddon, R. W., Zerbini, M., Moriones, E., and Navas-Castillo, J. (2011). Family Geminiviridae. In "Virus taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses" (M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens, and E. Lefkowitz, Eds.), pp. 351-373, Elsevier Academic Press.
- Brown, J. K., Frohlich, D. R., and Rosell, R. C. (1995). The sweetpotato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? *Annual Review of Entomology* **40**(1), 511-534.
- Bull, S. E., Briddon, R. W., Sserubombwe, W. S., Ngugi, K., Markham, P. G., and Stanley, J. (2006). Genetic diversity and phylogeography of cassava mosaic viruses in Kenya. *Journal of General Virology* **87**(10), 3053-3065.
- Chant, S. R. (1959). A note on the inactivation of mosaic virus in cassava (*Manihot utilissima* Pohl.) by heat treatment. *Empire Journal of Experimental Agriculture* **27**, 55-8.
- Chellappan, P., Vanitharani, R., and Fauquet, C. M. (2004). Short interfering RNA accumulation correlates with host recovery in DNA virus-infected hosts, and gene silencing targets specific viral sequences. *Journal of Virology* **78**(14), 7465-7477.
- Colombo, C., Second, G., Valle, T. L., and Charrier, A. (1998). Genetic diversity characterization of cassava cultivars (*Manihot esculenta* Crantz). I) RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology* **21**(1).
- Cours, G., Fargette, D., Otim-Nape, G. W., and Thresh, J. M. (1997). The epidemic of cassava mosaic virus disease in Madagascar in the 1930s-1940s: lessons for the current situation in Uganda. *Tropical Science* **37**.
- Cours, G. (1951). Manioc in Madagascar. *Mémoire de l'Institut Scientifique de Madagascar, Série B, Biologie Végétale* **3**, 203-400.
- Czosnek, H., Ghanim, M., Morin, S., Rubinstein, G., Fridman, V., and Zeidan, M. (2001). Whiteflies: vectors, and victims (?), of geminiviruses. *Advances in Virus Research* **57**, 291-322.
- Dade, H. A. (1930). Cassava mosaic. Paper 28, Year Book. Department of Agriculture. Gold Coast.

- De Barro, P. J., Liu, S. S., Boykin, L. M., and Dinsdale, A. B. (2011). *Bemisia tabaci*: a statement of species status. *Annual Review of Entomology* **56**, 1-19.
- De Bruyn, A., Villemot, J., Lefeuvre, P., Villar, E., Hoareau, M., Harimalala, M., Abdoul-Karime, A. L., Abdou-Chakour, C., Reynaud, B., Harkins, G. W., Varsani, A., Martin, D. P., Lett, J. M. (2012). East African cassava mosaic-like viruses from Africa to Indian Ocean Islands: molecular diversity, evolutionary history and geographical dissemination of a bipartite begomovirus. *BMC Evolutionary Biology*. Accepted.
- De León, L., Dallas, M. B., Ascencio-Ibáñez, J. T., Sseruwagi, P., Robertson, D., Ndunguru, J., and Hanley-Bowdoin, L. (2012). CMD-associated satellite-like DNAs enhance geminivirus symptoms and break resistance in *Arabidopsis*. *Second Scientific Conference of The Global Cassava Partnership for the 21st century, Kampala, Uganda, June 18-22*.
- Deighton, F. C. (1936). Preliminary list of fungi and diseases of plants in Sierra Leone. *Bulletin of Miscellaneous Information (Royal Gardens, Kew)* **1936**(7), 397-424.
- Delatte, H., Reynaud, B., Granier, M., Thornary, L., Lett, J. M., Goldbach, R., and Peterschmitt, M. (2005a). A new silverleaf-inducing biotype Ms of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) indigenous to the islands of the south-west Indian Ocean. *Bulletin of Entomological Research* **95**(1), 29-35.
- Delatte, H., Martin, D. P., Naze, F., Goldbach, R., Reynaud, B., Peterschmitt, M., and Lett, J. M. (2005b). South West Indian Ocean islands tomato begomovirus populations represent a new major monopartite begomovirus group. *Journal of General Virology* **86**(5), 1533-1542.
- Deng, D., Otim-Nape, W.G., Sangare, A., Ogwal, S., Beachy, R.N., and Fauquet, C.M. (1997). Contributions of biotechnology to cassava for Africa. *Proceedings of the Cassava Biotechnology Network Third International Scientific Meeting, Kampala, Uganda, 26-31 August 1996*.
- Dostie, B., Randriamamonjy, J., and Rabenasolo, L. (1999). "La filière manioc: amortisseur oublié des vulnérables " Institut National de la Statistique.
- Dufrenoy, J., and Hédin, L. (1929). La mosaïque des feuilles du manioc au Cameroun. *Revue de Botanique Appliquée en Agriculture Tropicale* **9**, 361-365.
- Faccioli, G., and Marani, F. (1998). Virus elimination by meristem tip culture and tip micrografting. *Plant Virus Disease Control*, 346-380.
- FAO (2010). La sous-alimentation dans le monde en 2010. L'état de l'inécurité dans le monde. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. www.fao.org/docrep/013/i1683f/i1683f02.pdf
- FAOSTAT (2010). FAO database. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>

- FAOSTAT (2003). FAO database. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- Fargette, D., Konaté, G., Fauquet, C., Muller, E., Peterschmitt, M., and Thresh, J. M. (2006). Molecular ecology and emergence of tropical plant viruses. *Annual Review of Phytopathology* **44**, 235-60.
- Fauquet, C. M., Briddon, R. W., Brown, J. K., Moriones, E., Stanley, J., Zerbini, M., and Zhou, X. (2008). Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Archives of Virology* **153**(4), 783-821.
- Fauquet, C., and Fargette, D. (1990). African cassava mosaic virus: etiology, epidemiology and control. *Plant Disease* **74**(6), 404-411.
- Fiallo-Olivé, E., Martínez-Zubiaur, Y., Moriones, E., and Navas-Castillo, J. (2012). A novel class of DNA satellites associated with New World begomoviruses. *Virology* **426**, 1-6.
- Fondong, V. N., Pita, J. S., Rey, M. E. C., De Kochko, A., Beachy, R. N., and Fauquet, C. M. (2000). Evidence of synergism between African cassava mosaic virus and a new double-recombinant geminivirus infecting cassava in Cameroon. *Journal of General Virology* **81**(1), 287-297.
- Fondong, V. N., Pita, J. S., Rey, C., Beachy, R. N., and Fauquet, C. M. (1998). First report of the presence of East African cassava mosaic virus in Cameroon. *Plant Disease* **82**(10), 1172-1172.
- François, E. (1937). Un grave peril: La mosaïque du manioc. *Agronomie Coloniale* **26**, 33-38.
- Gennadius, P. (1889). Disease of tobacco plantations in the Trikonía. The aleurodid of tobacco. *Ellenike Georgia* **5**, 1-3.
- Gibbs, A. J., Fargette, D., Garcia-Arenal, F., and Gibbs, M. J. (2010). Time—the emerging dimension of plant virus studies. *Journal of General Virology* **91**(1), 13-22.
- Gibson, R. W., Legg, J. P., and OtimNape, G. W. (1996). Unusually severe symptoms are a characteristic of the current epidemic of mosaic virus disease of cassava in Uganda. *Annals of Applied Biology* **128**(3), 479-490.
- Golding, F. D. (1936). Cassava mosaic in Southern Nigeria. *Bulletin of Agriculture Department in Nigeria* **11**, 1-10.
- Hall, F. W. (1928). Annual Report. Department of Agriculture, Uganda.
- Hanley-Bowdoin, L., Settlege, S. B., Orozco, B. M., Nagar, S., and Robertson, D. (1999). Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Plant Sciences* **18**(1), 71-106.
- Harimalala, M., Lefeuvre, P., De Bruyn, A., Tiendrébéogo, F., Hoareau, M., Villemot, J., Ranomenjanahary, S., Andrianjaka, A., Reynaud, B., and Lett, J. M. (2012). A novel

- cassava-infecting begomovirus from Madagascar: cassava mosaic Madagascar virus. *Archives of Virology*, 1-4.
- Harkins, G. W., Martin, D. P., Duffy, S., Monjane, A. L., Shepherd, D. N., Windram, O. P., Owor, B. E., Donaldson, L., Van Antwerpen, T., and Sayed, R. A. (2009). Dating the origins of the maize-adapted strain of maize streak virus, MSV-A. *Journal of General Virology* **90**(12), 3066-3074.
- Harrison, B. D., Zhou, X., Otim-Nape, G. W., Liu, Y., and Robinson, D. J. (1997). Role of a novel type of double infection in the geminivirus-induced epidemic of severe cassava mosaic in Uganda. *Annals of Applied Biology* **131**(3), 437-448.
- Harrison, B. D., Swanson, M. M., and Robinson, D. J. (1995). *Second International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network, Bogor, Indonesia*.
- Harrison, B. D., Lennon, A. M., Massalski, P. R., Robinson, D. J., and Thomas, J. E. (1987). Geographical variation in geminivirus isolates associated with cassava mosaic disease. Scottish Crop Research Institute.
- Hédin, L. (1931). Culture du manioc en Côte d'Ivoire: observations complémentaires sur la mosaïque. *Revue de Botanique Appliquée en Agriculture Tropicale* **11**, 558-563.
- Hillocks, R., and Thresh, M. (2000). Cassava mosaic and cassava brown streak virus diseases in Africa. *Roots* **7**(1).
- Holmes, E. C. (2004). The phylogeography of human viruses. *Molecular Ecology* **13**(4), 745-756.
- Hong, Y. G., Saunders, K., Hartley, M. R., and Stanley, J. (1996). Resistance to geminivirus infection by virus-induced expression of diathin in transgenic plants. *Virology* **220**(1), 119-127.
- Hong, Y. G., Robinson, D. J., and Harrison, B. D. (1993). Nucleotide sequence evidence for the occurrence of three distinct whitefly-transmitted geminiviruses in cassava. *Journal of General Virology* **74**, 2437.
- INSTAT (2011). Enquête périodique auprès des ménages (2010). Rapport principal de l'Institut National de la Statistique, Madagascar. www.instat.mg/pdf/epm2010powerpoint.pdf
- INSTAT (2006). Enquête périodique auprès des ménages (2004). Rapport principal de l'Institut National de la Statistique, Madagascar. www.instat.mg/index.php?option=com_content&view=article&id=1&Itemid=28&limitstart=3
- James, B., Yaninek, J., Neuenschwander, P., Cudjoe, A., Modder, W., Echendu, N., and Toko, M. (2000). Lutte contre les ravageurs du manioc. IITA, Bénin.

- James, B. D., and Fofanah, M. (1992). Population growth patterns for Phenacoccus manihoti Mat. Ferr. on cassava in Sierra Leone. *International Journal of Pest Management* **38**(1), 89-92.
- Jarvis, A., Ramirez-Villegas, J., Herrera Campo, B. V., and Navarro-Racines, C. (2012). Is cassava the answer to African climate change adaptation? *Tropical Plant Biology*, 1-21.
- Jeske, H. (2009). Geminiviruses. In "Torque Teno Virus" (H. Zur Hausen, and E. M. Villiers, Eds), pp. 185-226, Springer, Berlin.
- Jeske, H., Lütgemeier, M., and Preiss, W. (2001). DNA forms indicate rolling circle and recombination-dependent replication of Abutilon mosaic virus. *The EMBO journal* **20**(21), 6158-6167.
- Jones, R. A. C. (2009). Plant virus emergence and evolution: origins, new encounter scenarios, factors driving emergence, effects of changing world conditions, and prospects for control. *Virus Research* **141**(2), 113-130.
- Jones, W. O. (1959). "Manioc in Africa." Stanford University Press.
- Kaiser, W. J., and Louie, R. (1982). Heat therapy of cassava infected with African cassava mosaic disease. *Plant Disease* **66**, 475-477.
- Kaiser, W. J., and Teemba, L. R. (1979). Use of tissue culture and thermotherapy to free east african cassava cultivars of african cassava mosaic and cassava brown streak diseases. *Plant Disease Reporter* **63**(9), 780-784.
- Lefevre, P., Martin, D. P., Harkins, G., Lemey, P., Gray, A. J. A., Meredith, S., Lakay, F., Monjane, A., Lett, J. M., Varsani, A., and Heydarnejad, J. (2010). The Spread of Tomato Yellow Leaf Curl Virus from the Middle East to the World. *PLoS Pathogens* **6**(10), 1-12.
- Lefevre, P., Martin, D. P., Hoareau, M., Naze, F., Delatte, H., Thierry, M., Varsani, A., Becker, N., Reynaud, B., and Lett, J. M. (2007a). Begomovirus 'melting pot' in the south-west Indian Ocean islands: molecular diversity and evolution through recombination. *Journal of General Virology* **88**(12), 3458-3468.
- Lefevre, P., Lett, J.-M., Reynaud, B., and Martin, D. P. (2007b). Avoidance of Protein Fold Disruption in Natural Virus Recombinants. *PLoS Pathogens* **3**(11), e181-e181.
- Legg, J. P., Jeremiah, S. C., Obiero, H. M., Maruthi, M. N., Ndyetabula, I., Okao-Okuja, G., Bouwmeester, H., Bigirimana, S., Tata-Hangy, W., and Gashaka, G. (2011). Comparing the regional epidemiology of the cassava mosaic and cassava brown streak virus pandemics in Africa. *Virus Research* **159**, 161-170.
- Legg, J. P., Owor, B., Sseruwagi, P., and Ndunguru, J. (2006). Cassava mosaic virus disease in East and Central Africa: epidemiology and management of a regional pandemic. *In*

- "Advances in Virus Research, Plant Virus Epidemiology" (J. M. Thresh, Ed.), Vol. 67, pp. 355-418. Elsevier Academic Press, Kent, United Kingdom.
- Legg, J. P., and Fauquet, C. M. (2004). Cassava mosaic geminiviruses in Africa. *Plant Molecular Biology* **56**(4), 585-599.
- Legg, J. P., French, R., Rogan, D., Okao-Okuja, G., and Brown, J. K. (2002). A distinct *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodidae) genotype cluster is associated with the epidemic of severe cassava mosaic virus disease in Uganda. *Molecular Ecology* **11**(7), 1219-1229.
- Legg, J. P. (1999). Emergence, spread and strategies for controlling the pandemic of cassava mosaic virus disease in east and central Africa. *Crop Protection* **18**(10), 627-637.
- Legg, J. P., and Ogwal, S. (1998). Changes in the incidence of African cassava mosaic virus disease and the abundance of its whitefly vector along south–north transects in Uganda. *Journal of Applied Entomology* **122**(1-5), 169-178.
- Mallowa, S. O., Isutsa, D. K., Kamau, A. W., and Jegg, J. P. (2011). Effectiveness of phytosanitation in cassava mosaic disease management in a post-epidemic area of Western Kenya. *ARPN Journal of Agricultural and Biological Science* **6**(7), 8-15.
- Mansoor, S., Briddon, R. W., Zafar, Y., and Stanley, J. (2003). Geminivirus disease complexes: an emerging threat. *Trends in Plant Science* **8**(3), 128-134.
- Martin, D. P., Williamson, C., and Posada, D. (2005). RDP2: recombination detection and analysis from sequence alignments. *Bioinformatics* **21**(2), 260-262.
- Maruthi, M. N., Seal, S., Colvin, J., Briddon, R. W., and Bull, S. E. (2004). *East African cassava mosaic Zanzibar virus* – a recombinant begomovirus species with a mild phenotype. *Archives of Virology* **149**(12), 2365-2377.
- Mayeur, N. (1785). Voyage au pays d'Ancove (1785) *Rédaction de M. Dumaine. Bulletin de l'Académie Malgache (1913)* **12**(2), 14-49.
- Morel, G., and Martin, C. (1955). Guérison de pommes de terre atteintes de maladies à virus. *Compte Rendu de l'Académie d'agriculture de France* **41**, 0-3.
- Msikita, W., Braima, J., Nnodu, E., Legg, J., Wydra, K., and Ogbe, F. (2000). Lutte contre les maladies du manioc. IITA, Bénin.
- Mubin, M., Briddon, R. W., and Mansoor, S. (2009). Complete nucleotide sequence of *Chili leaf curl virus* and its associated satellites naturally infecting potato in Pakistan. *Archives of Virology* **154**(2), 365-368.
- Navas-Castillo, J., Fiallo-Olivé, E., and Sánchez-Campos, S. (2011). Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. *Annual Review of Phytopathology* **49**, 219-48.

- Nawaz-ul-Rehman, M. S., Mansoor, S., Briddon, R. W., and Fauquet, C. M. (2009). Maintenance of an Old World betasatellite by a New World helper begomovirus and possible rapid adaptation of the betasatellite. *Journal of Virology* **83**(18), 9347.
- Ndunguru, J., Legg, J. P., Aveling, T. A. S., Thompson, G., and Fauquet, C. M. (2005). Molecular biodiversity of cassava begomoviruses in Tanzania: evolution of cassava geminiviruses in Africa and evidence for East Africa being a center of diversity of cassava geminiviruses. *Virology Journal* **2**(1), 21.
- Ogbe, F. O., Atiri, G. I., Robinson, D., Winter, S., Dixon, A. G. O., Quin, F. M., and Thottappilly, G. (1999). First report of East African cassava mosaic begomovirus in Nigeria. *Plant disease* **83**(4), 398-398.
- Ogbe, F. O., Legg, J., Raya, M. D., Muimba-Kankolongo, A., Theu, M. P., Kaitisha, G., Phiri, N. A., and Chalwe, A. (1997). Diagnostic survey of cassava mosaic viruses in Tanzania, Malawi and Zambia. *Roots* **4**(2), 12-15.
- Oliveira, M. R. V., Henneberry, T. J., and Anderson, P. (2001). History, current status, and collaborative research projects for *Bemisia tabaci*. *Crop Protection* **20**(9), 709-723.
- Otim-Nape, G., Bua, A., Thresh, J., Baguma, Y., Ogwal, S., Ssemakula, G., Acola, G., Byabakama, B., Colvin, J., and Cooter, R. (2000). The current pandemic of cassava mosaic virus disease in East Africa and its control. NRI, Chatham, UK.
- Otim-Nape, G. W., Bua, A., Thresh, J. M., Baguma, Y., Ogwal, S., Semakula, G. N., Acola, G., Byabakama, B., and Martin, A. (1997). "Cassava mosaic virus disease in Uganda: the current pandemic and approaches to control. NRI, Chatham, UK.
- Owor, B. E., Martin, D. P., Shepherd, D. N., Edema, R., Monjane, A. L., Rybicki, E. P., Thomson, J. A., and Varsani, A. (2007). Genetic analysis of maize streak virus isolates from Uganda reveals widespread distribution of a recombinant variant. *Journal of General Virology* **88**(11), 3154-3165.
- Padidam, M., Sawyer, S., and Fauquet, C. M. (1999). Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* **265**(2), 218-225.
- Patil, B. L., and Fauquet, C. M. (2010). Differential interaction between cassava mosaic geminiviruses and geminivirus satellites. *Journal of General Virology* **91**(7), 1871.
- Patil, B. L., and Fauquet, C. M. (2009). Cassava mosaic geminiviruses: actual knowledge and perspectives. *Molecular Plant Pathology* **10**(5), 685-701.
- Perfecto, I., and Vandermeer, J. (2010). The agroecological matrix as alternative to the land-sparing/agriculture intensification model. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107** (13), 5786-5791.
- Pita, J. S., Fondong, V. N., Sangaré, A., Otim-Nape, G. W., Ogwal, S., and Fauquet, C. M. (2001a). Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are

- determinant keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda. *Journal of General Virology* **82**(Pt 3), 655-65.
- Pita, J. S., Fondong, V. N., Sangaré, A., Kokora, R. N. N., and Fauquet, C. M. (2001b). Genomic and biological diversity of the African cassava geminiviruses. *Euphytica* **120**(1), 115-125.
- Ranomenjanahary, S. (2008). Strategies to avoid fungal diseases of cassava in Madagascar. In "9th International Congress of Plant Pathology", Torino.
- Ranomenjanahary, S., Ramelison, J., and Sseruwagi, P. (2005). Madagascar. In "Whiteflies as vectors of plant viruses in cassava and sweetpotato in Africa", pp. 72-76.
- Ranomenjanahary, S., Rabindran, R., and Robinson, D. J. (2002). Occurrence of three distinct begomoviruses in cassava in Madagascar. *Annals of Applied Biology* **140**(3), 315-318.
- Rogers, D. J., and Appan, S. G. (1973). "Manihot, Manihotoides (Euphorbiaceae)." Flora Neotropica (H. Press, Ed.), 13, New York.
- Romay, G., Chirinos, D., Geraud-Pouey, F., and Desbiez, C. (2010). Association of an atypical alphasatellite with a bipartite New World begomovirus. *Archives of Virology* **155**(11), 1843-1847.
- Rosenthal, D. M., Slattery, R. A., Miller, R. E., Grennan, A. K., Cavagnaro, T. R., Fauquet, C. M., Gleadow, R. M., and Ort, D. R. (2012). Cassava about-FACE: Greater than expected yield stimulation of cassava (*Manihot esculenta*) by future CO₂ levels. *Global Change Biology* **18**, 2661-2675.
- Sanderfoot, A. A., Ingham, D. J., and Lazarowitz, S. G. (1996). A Viral Movement Protein as a Nuclear Shuttle (The Geminivirus BR1 Movement Protein Contains Domains Essential for Interaction with BL1 and Nuclear Localization). *Plant Physiology* **110**(1), 23-33.
- Saunders, K., Norman, A., Gucciardo, S., and Stanley, J. (2004). The DNA β satellite component associated with Ageratum yellow vein disease encodes an essential pathogenicity protein (β C1). *Virology* **324**(1), 37-47.
- Saunders, K., Salim, N., Mali, V. R., Malathi, V. G., Briddon, R., Markham, P. G., and Stanley, J. (2002). Characterisation of Sri Lankan cassava mosaic virus and Indian cassava mosaic virus: evidence for acquisition of a DNA B component by a monopartite begomovirus. *Virology* **293**(1), 63-74.
- Saunders, K., Bedford, I. D., Briddon, R. W., Markham, P. G., Wong, S. M., and Stanley, J. (2000). A unique virus complex causes Ageratum yellow vein disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**(12), 6890-6895.
- Saunders, K., Lucy, A., and Stanley, J. (1992). RNA-primed complementary-sense DNA synthesis of the geminivirus African cassava mosaic virus. *Nucleic Acids Research* **20**(23), 6311-6315.

- Shepherd, D. N., Martin, D. P., Van der Walt, E., Dent, K., Varsani, A., and Rybicki, E. P. (2010). Maize streak virus: an old and complex 'emerging' pathogen. *Molecular Plant Pathology* **11**(1), 1-12.
- Silvestre, P., and Arraudeau, M. (1983). "Le manioc." 32 G.P. Maisonneuve et Larose ; Agence de Coopération Culturelle et Technique, Paris.
- Sseruwagi, P., Sserubombwe, W. S., Legg, J. P., Ndunguru, J., and Thresh, J. M. (2004). Methods of surveying the incidence and severity of cassava mosaic disease and whitefly vector populations on cassava in Africa: a review. *Virus Research* **100**(1), 129-142.
- Sunter, G., and Bisaro, D. M. (1997). Regulation of a geminivirus coat protein promoter by AL2 protein (TrAP): evidence for activation and derepression mechanisms. *Virology* **232**(2), 269-280.
- Swanson, M. M., and Harrison, B. D. (1994). Properties, relationships and distribution of cassava mosaic geminiviruses. *Tropical Science* **34**(1), 15-25.
- Taylor, N. J., Beyene, G., Gaitan-Solis, E., Alicai, T., and Fauquet, C. M. (2012). RNA-i mediated resistance to ACMV and EACMV. *Second Scientific Conference of The Global Cassava Partnership for the 21st century, Kampala, Uganda, June 18-22*.
- Thresh, J. M. (2006). Control of tropical plant virus diseases. *Advances in Virus Research* **67**, 245-295.
- Thresh, J. M., and Cooter, R. J. (2005). Strategies for controlling cassava mosaic virus disease in Africa. *Plant Pathology* **54**(5), 587-614.
- Thresh, J. M., and Otim-Nape, G. W. (1994). Strategies for controlling African cassava mosaic geminivirus. *Advances in Disease Vector Research* **10**, 215-236.
- Thresh, J. M., Otim-Nape, G. W., and Jennings, D. L. (1994a). Exploiting resistance to African cassava mosaic virus. *Aspects of Applied Biology* **39**, 51-51.
- Thresh, J. M., Fargette, D., and Otim-Nape, G. W. (1994b). The viruses and virus diseases of cassava in Africa. *African Crop Science Journal* **2**(4), 459-478.
- Tiendrébéogo, F., Lefeuvre, P., Hoareau, M., Harimalala, M. A., De Bruyn, A., Villemot, J., Traoré, V. S. E., Konaté, G., Traoré, A. S., and Barro, N. (2012). Evolution of African cassava mosaic virus by recombination between bipartite and monopartite begomoviruses. *Virology Journal* **9**(1), 67.
- Tiendrébéogo, F., Lefeuvre, P., Hoareau, M., Traoré, V. S. E., Barro, N., Reynaud, B., Traoré, A. S., Konaté, G., Traoré, O., and Lett, J. M. (2009). Occurrence of East African cassava mosaic virus-Uganda (EACMV-UG) in Burkina Faso. *Plant Pathology* **58**(4), 783-783.
- Tilman, D., Balzer, C., Hill, J., and Befort, B. L. (2011). Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**(50), 20260-20264.

- Traore, O., Sorho, F., Pinel, A., Abubakar, Z., Banwo, O., Maley, J., Hébrard, E., Winter, S., Sere, Y., and Konate, G. (2005). Processes of diversification and dispersion of Rice yellow mottle virus inferred from large-scale and high-resolution phylogeographical studies. *Molecular Ecology* **14**(7), 2097-2110.
- Vance, V., and Vaucheret, H. (2001). RNA silencing in plants--defense and counterdefense. *Science* **292**(5525), 2277-2280.
- Vanitharani, R., Chellappan, P., and Fauquet, C. M. (2005). Geminiviruses and RNA silencing. *Trends in Plant Science* **10**(3), 144-151.
- Vanitharani, R., Chellappan, P., Pita, J. S., and Fauquet, C. M. (2004). Differential Roles of AC2 and AC4 of Cassava Geminiviruses in Mediating Synergism and Suppression of Post-Transcriptional Gene Silencing. *Journal of Virology* **78**(17), 9487-9498.
- Voinnet, O., Pinto, Y. M., and Baulcombe, D. C. (1999). Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**(24), 14147.
- Warburg, O. H. (1894). Die kulturpflanzen usambaras. *Mitteilung Aus Den Deutschen Schutzgebieten* **7**, 131.
- Wilson, T. (1993). Strategies to protect crop plants against viruses: pathogen-derived resistance blossoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**(8), 3134-3141.
- Zhang, P., Vanderschuren, H., Fütterer, J., and Gruissem, W. (2005). Resistance to cassava mosaic disease in transgenic cassava expressing antisense RNAs targeting virus replication genes. *Plant Biotechnology Journal* **3**(4), 385-397.
- Zhang, P., Fütterer, J., Frey, P., Potrykus, I., Puonti-Kaerlas, J., and Gruissem, W. (2003). Engineering virus-induced ACMV resistance by mimicking a hypersensitive reaction in transgenic cassava plants. In "Plant Biotechnology 2002 and Beyond" (I. K. Vasil, Ed.), pp. 143-146. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Zhang, W., Olson, N. H., Baker, T. S., Faulkner, L., Agbandje-McKenna, M., Boulton, M. I., Davies, J. W., and McKenna, R. (2001). Structure of the Maize streak virus geminate particle. *Virology* **279**(2), 471-477.
- Zinga, I., Chiroleu, F., Legg, J. P., Lefeuvre, P., Kosh Komba, E., Semballa, S., Yandia, S. P., Mandakombo, N., Reynaud, B., Lett, J. M. (2012). Epidemiological assessment of cassava mosaic disease in Central African Republic reveals the importance of viral mixed infection and poor health of plant cuttings. *Crop Protection*, accepted.
- Zhou, X., Robinson, D. J., and Harrison, B. D. (1998). Types of variation in DNA-A among isolates of East African cassava mosaic virus from Kenya, Malawi and Tanzania. *Journal of General Virology* **79**(11), 2835-2840.

Zhou, X., Liu, Y., Calvert, L., Munoz, C., Otim-Nape, G. W., Robinson, D. J., and Harrison, B. D. (1997). Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. *Journal of General Virology* **78**(8), 2101-2111.

Annexes

Matériel supplémentaire de l'article 1 : « Molecular epidemiology of cassava mosaic disease in Madagascar ».

Supplementary material 1: Calculation of the real proportions of whitefly- and cutting-derived infected plants

The proportions of whitefly-/cutting-derived infected and healthy plants recorded on fields and according to three levels of altitude

Classes of altitude	Number of plants	Numbers of plants infected by <i>B. tabaci</i> only (%)	Cuttings (%)	Numbers of healthy plants (%)	% of infected samples
Low altitude (0-200m) (%)	208	6 (3)	199 (96)	3 (1)	98
Mid-altitude (200-800m) (%)	45	6 (13)	32 (71)	7 (16)	84
High altitude (>800m) (%)	114	0 (0)	22 (19)	92 (81)	20

The number of cutting-derived infected plants = 199 + 32 + 22 = 253 (95%)

The number of whitefly-derived infected plants = 6 + 6 = 12 (5%)

The proportions of whitefly- and cutting-derived infected plants

Classes of altitude	Total of infected plants	Numbers of plants infected by	
		<i>Bemisia tabaci</i> (Nw)	Cuttings
Low altitude (0-200m) (%)	205	6 (3)	199 (97)
Mid-altitude (200-800m) (%)	38	6 (16)	32 (84)
High altitude (>800m) (%)	22	0 (0)	22 (100)

As cutting-derived infection can mask *B. tabaci*-derived infection, it is important to estimate the real proportions of whitefly-derived infections (N_{tw}) and cutting-derived infections (N_{tc})

$$N_{tc} = \text{cutting-only-derived infections } (N_c) + \text{cutting-followed-whitefly-derived infections } (N_{cw})$$

The assumption is : the proportion of whitefly-derived infected plants is equal to the proportion of cutting-derived infected plants

It corresponds to :

$$N_w/N_h + N_w = N_{cw}/N_c + N_{cw}$$

With N_h , the proportion of healthy plants

This assumptions allowed to identify the values of N_{cw} :

$$N_{cw} = N_w * N_c / N_h + N_w$$

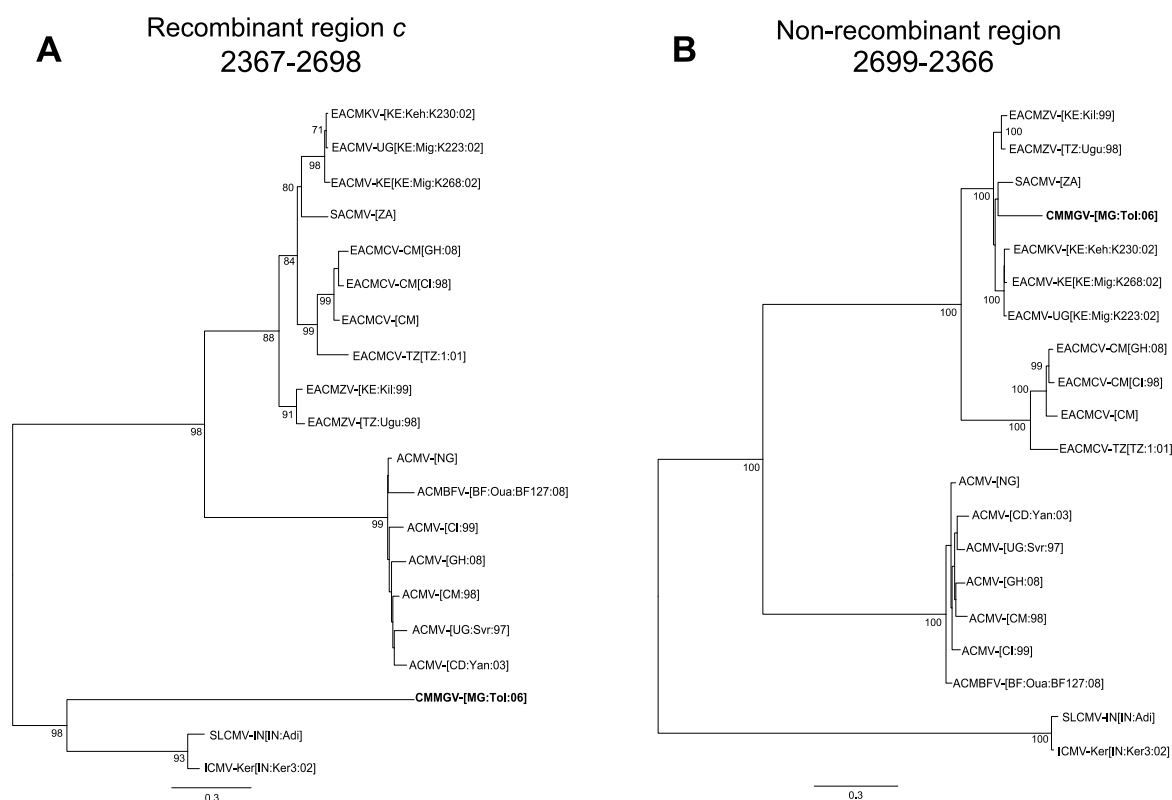
and the values of N_{tw} :

$$N_{tw} = N_w + N_{cw}$$

The corrected proportions of whitefly- and cutting-derived infected plants

Classes of altitude	Values of N_{cw} (%)	Values of N_c (%) Values of N_{tc} (%)		
	Values of N_{tw} (%)			
Low altitude (0-200m) (%)	69	72	28	97
Mid-altitude (200-800m) (%)	24	35	65	84
High altitude (>800m) (%)	0	0	100	100

Figure supplémentaire de l'article 2: "A novel cassava-infesting begomovirus from Madagascar: cassava mosaic Madagascar virus".



Supplementary figure 1: Maximum likelihood (ML) trees showing phylogenetic relationships between the DNA-B component of CMMGV and that of the other representative African and Indian CMG species. Values associated with the nodes indicate the percentage of bootstrap support (1000 replicates; only bootstrap values greater than 70% are shown). ML trees inferred from alignments of (A) recombinant region c (positions 2367 to 2698) and (B) non-recombinant region. For begomovirus acronyms and accession numbers, see Supplementary Table 2

**Table supplémentaire 2 de l'article 2 : « A novel cassava-infecting begomovirus from Madagascar: cassava mosaic
Madagascar virus ».**

Supplementary table 2: Name, acronyms and GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers of begomoviruses used in this study

Begomovirus isolates	Accession numbers		Abbreviated names
	DNA-A	DNA-B	
<i>African cassava mosaic Burkina Faso virus</i> -[Burkina Faso:Ouaga:BF127:2008]	-	HE616778	ACMBFV-[BF:Oua:BF127:08]
<i>African cassava mosaic Burkina Faso virus</i> -[Burkina Faso:Ouaga:BF128B:2008]	HE616780	-	ACMBFV-[BF:Oua:BF128B:08]
<i>African cassava mosaic virus</i> -[Burkina Faso:Kamboinse:2008]	FM877473	-	ACMV-[BF:Kam:08]
<i>African cassava mosaic virus</i> -[Congo:Yangambi:2003]	FN668378	FN668379	ACMV-[CD:Yan:03]
<i>African cassava mosaic virus</i> -[Ghana:2008]	-	JN165086	ACMV-[GH:08]
<i>African cassava mosaic virus</i> -[Nigeria:RC:2003]	EU685324	-	ACMV-[NG:RC:03]
<i>African cassava mosaic virus</i> -[Uganda:Kalangala:226:2002]	AM502338	-	ACMV-[UG:Kal:226:02]
<i>African cassava mosaic virus</i> -[Angola:2009]	GU580897	-	ACMV-[AO:09]
<i>African cassava mosaic virus</i> -[Cameroon:1998]	-	AF112353	ACMV-[CM:98]
<i>African cassava mosaic virus</i> -[Cameroon:DO2:1998]	AF366902	-	ACMV-[CM:DO2:98]
<i>African cassava mosaic virus</i> -[Côte d'Ivoire:1999]	AF259894	AF259895	ACMV-[CI:99]
<i>African cassava mosaic virus</i> -[Kenya:844:1982]	J02057	-	ACMV-[KE:844:82]
<i>African cassava mosaic virus</i> -[Nigeria]	-	X17096	ACMV-[NG]
<i>African cassava mosaic virus</i> -[Tanzania:2001]	AY795982	-	ACMV-[TZ:01]
<i>African cassava mosaic virus</i> -[Uganda:Severe:1997]	-	AF126803	ACMV-[UG:Svr:97]

Cassava mosaic Madagascar virus-[Madagascar:Toliary:2006]	HE617299	HE617300	CMIMGV-[MG:Tol:06]
<i>East African cassava mosaic Cameroon virus</i> -[Cameroon]	-	FJ826890	EACMCV-[CM]
<i>East African cassava mosaic Cameroon virus</i> -Cameroon [Ghana:2008]	-	JN165087	EACMCV-CM [GH:08]
<i>East African cassava mosaic Cameroon virus</i> -Cameroon [Nigeria:So:2003]	EU685323	-	EACMCV-CM [NG:So:03]
<i>East African cassava mosaic Cameroon virus</i> -Cameroon [Côte d'Ivoire:1998]	AF259896	AF259897	EACMCV-CM [CI:98]
<i>East African cassava mosaic Cameroon virus</i> -Tanzania [Tanzania:1:2001]	-	AY795989	EACMCV-TZ [TZ:1:01]
<i>East African cassava mosaic Cameroon virus</i> -Tanzania [Tanzania:7:2001]	AY795984	-	EACMCV-TZ [TZ:7:01]
<i>East African cassava mosaic Kenya virus</i> -[Kenya:Kehancha:K230:2002]	-	AJ704967	EACMKV-[KE:Keh:K230:02]
<i>East African cassava mosaic Kenya virus</i> -[Kenya:Tala:K304:2002]	AJ717571	-	EACMKV-[KE:Tal:K304:02]
<i>East African cassava mosaic Malawi virus</i> -[Malawi:K:1996]	AJ006460	-	EACMMV-[MW:K:96]
<i>East African cassava mosaic virus</i> -Kenya [Kenya:Migori:K268:2002]	-	AJ704938	EACMV-KE [KE:Mig:K268:02]
<i>East African cassava mosaic virus</i> -Kenya [Kenya:Perani:K41:2001]	AJ717544	-	EACMV-KE [KE:Per:K41:01]
<i>East African cassava mosaic virus</i> -Kenya [Tanzania:T]	AY795985	-	EACMV-KE [TZ:T]
<i>East African cassava mosaic virus</i> -Uganda [Kenya:Busia:K73:2002]	AJ717532	-	EACMV-UG [KE:Bus:K73:02]
<i>East African cassava mosaic virus</i> -Uganda [Kenya:Migori:K223:2002]	-	AJ704956	EACMV-UG [KE:Mig:K223:02]
<i>East African cassava mosaic virus</i> -Uganda [Tanzania:10]	AY795988	-	EACMV-UG [TZ10]
<i>East African cassava mosaic virus</i> -Uganda [Uganda:Severe2:1997]	AF126806	-	EACMV-UG [UG:Svr2:97]
<i>East African cassava mosaic Zanzibar virus</i> -[Kenya:Kilifi:1999]	-	AJ628732	EACMZV-[KE:Kil:99]
<i>East African cassava mosaic Zanzibar virus</i> -[Kenya:Msambweni:K212:2002]	AJ717568	-	EACMZV-[KE:Msa:K212:02]
<i>East African cassava mosaic Zanzibar virus</i> -[Tanzania:Uguja:1998]	-	AF422175	EACMZV-[TZ:Ugu:98]
<i>Indian cassava mosaic virus</i> -Kerala [India:Kerala 2:2002]	AJ575819	-	ICMV-Ker [IN:Ker2:02]

<i>Indian cassava mosaic virus</i> -Kerala [India:Kerala 3:2002]	-	AJ575820	ICMV-Ker [IN:Ker3:02]
<i>South African cassava mosaic virus</i> -[Madagascar:12]	AJ422132	-	SACMV-[MG:12]
<i>South African cassava mosaic virus</i> -[South Africa]	AF155806	AF155807	SACMV-[ZA]
<i>South African cassava mosaic virus</i> -[Zimbabwe:Muzarabani]	AJ575560	-	SACMV-[ZW:Muz]
<i>Sri Lankan cassava mosaic virus</i> -India [India:Adivaram]	-	AJ579308	SLCMV-IN [IN:Adi]
<i>Sri Lankan cassava mosaic virus</i> -India [India:Kerala C4]	AJ890226	-	SLCMV-IN [IN:KerC4]
<i>Tomato leaf curl Antsiranana virus</i> -[Madagascar:Miaandrivazo:2001]	AM701767	-	ToLCantV-[MG:Mia:01]
<i>Tomato leaf curl Comoros virus</i> -[Comoros:Bambas:2004]	AM701759	-	ToLCKMV-[KM:Bam:04]
<i>Tomato leaf curl Madagascar virus</i> -Atsimo [Madagascar:Toliary:2001]	AJ865339	-	ToLCMGV-Ats [MG:Tol:01]
<i>Tomato leaf curl Namakely virus</i> -Madagascar [Madagascar:Namakely:2001]	AM701764	-	ToLCNamV-MG [MG:Nam:01]
<i>Tomato leaf curl Toliara virus</i> -[Madagascar:Miaandrivazo:2001]	AM701768	-	ToLCTolV-[MG:Mia:01]

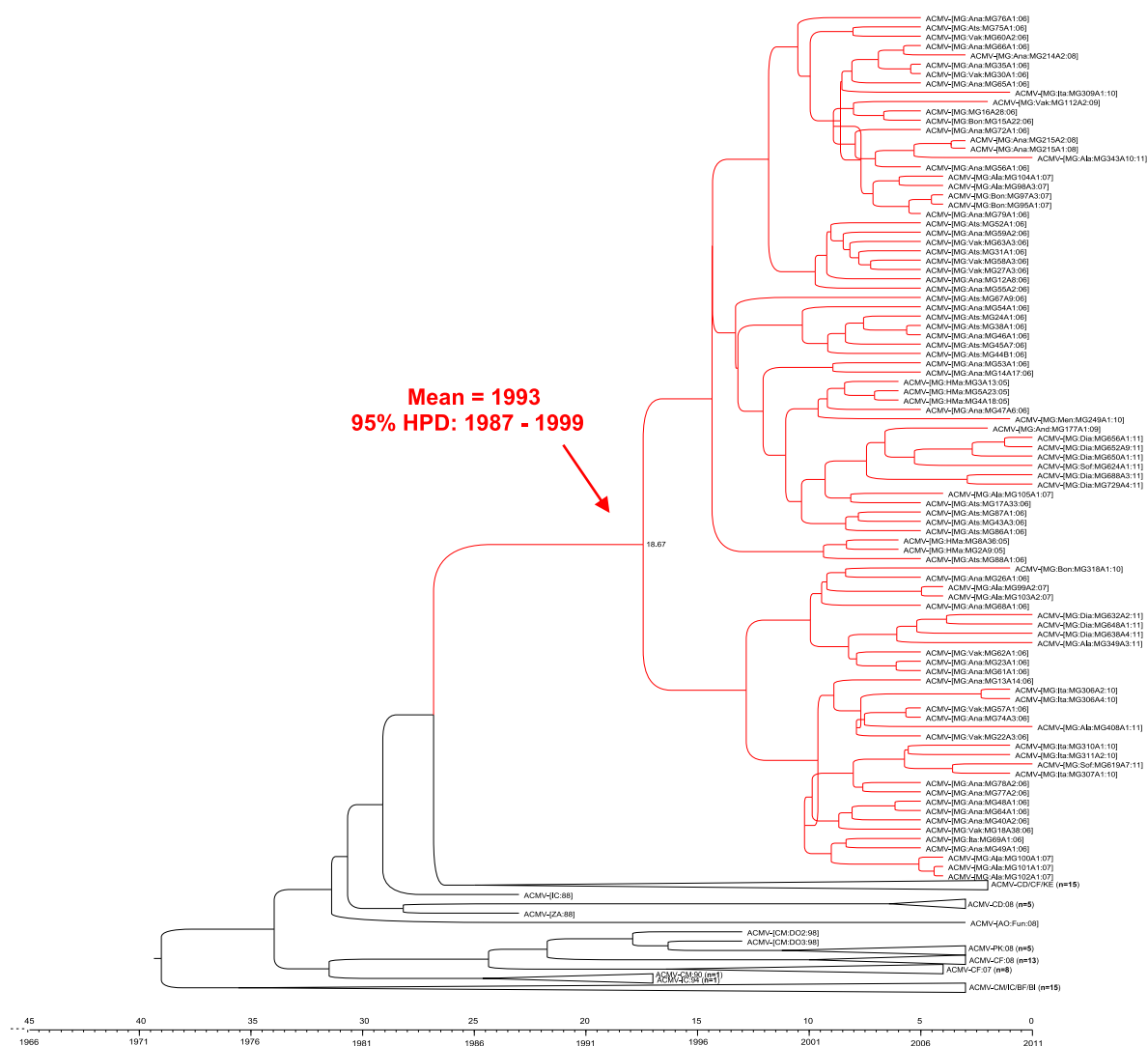
Table supplémentaire de l'article 2 : « A novel cassava-infecting begomovirus from Madagascar: cassava mosaic Madagascar virus ».

Supplementary Table 1 Percentage of pairwise similarities (calculated using MEGA 5 with pairwise deletion of gaps) of DNA-A and DNA-B full genome sequences of CMMGV compared to representative and most closely related Begomovirus species.

Begomovirus isolates	Abbreviated names	Accession numbers		Nucleotide identity percentage	
		DNA-A	DNA-B	DNA-A	DNA-B
<i>African cassava mosaic virus</i> -[Uganda:Severe:1997]	ACMV-[UG:Svr:97]	AF126802	AF126803	73.4	53.9
<i>East African cassava mosaic Cameroon virus</i> -[Cameroon:1998]	EACMCV-CM [CM :98]	AF112354	AF112355	71.3	65.3
<i>East African cassava mosaic Kenya virus</i> -[Kenya:Kehancha:K230:2002]	EACMKV-[KE:Keh:K230:02]	AJ717579	AJ704967	77.5	80.1
<i>East African cassava mosaic Malawi virus</i> -[Malawi:K:1996]	EACMMV-[MW:K:96]	AJ006460	-	77.6	-
<i>East African cassava mosaic virus</i> -[Kenya:Migori:K268:2002]	EACMV-KE [KE:Mig:K268:02]	AJ717558	AJ704938	74.8	80.8
<i>East African cassava mosaic virus</i> -Uganda [Kenya:Migori:K223:2002]	EACMV-UG [KE:Mig:K223:02]	AJ717530	AJ704956	74.2	80.9
<i>East African cassava mosaic Zanzibar virus</i> -[Kenya:Msambweni:K212:2002]	EACMZV-[KE:Msa:K212:02]	AJ717568	AJ704941	82.5	81.7
<i>Indian cassava mosaic virus</i> -[India:Maharashtra2:1988]	ICMV-IN [IN:Mah2:88]	AY730035	AY730036	71.5	48.8
<i>South African cassava mosaic virus</i> -[South Africa]	SACMV-[ZA]	AF155806	AF155807	81.8	79.8
<i>Sri Lankan cassava mosaic virus</i> -India [India:Adivaram]	SLCMV-IN [IN:Adi]	AJ579307	AJ579308	71.6	48.9
<i>Tomato leaf curl Namakely virus</i> -Madagascar [Madagascar:Namakely:2001]	ToLCNamV-MG [MG:Nam:01]	AM701764	-	80.8	-

-: Not available

Figure supplémentaire 1 de l'article 4 : "Genetic diversity and phylogeography of cassava mosaic begomoviruses in Madagascar".



Supplementary Figure 1: Maximum clade credibility tree constructed from the ACMV capsid protein (CP) dataset. The node indicated with an arrow corresponds to the most recent common ancestor of isolates from Madagascar (branches coloured in red). This ancestor was dated to 1993 (95 % HPD: 1987 – 1999 years). The scale bar at the bottom of the tree represent the time in year. Note the presence of branches presenting with negative length over the tree (i.e. branches pointing to the past). These branches reflect the uncertainty in the dating of the associated nodes.

Table supplémentaire 1 de l'article 4 : « Genetic diversity and phylogeography of cassava mosaic begomoviruses in Madagascar ».

Supplementary table 1: List of sequences isolated in this study

Component	Species	Isolate	year	Latitude	Longitude	Altitude
A	SACMV	[MG:Ana:MG1A3:06]	2006	-18.875448	47.558234	1273
A	ACMV	[MG:HMa:MG2A9:05]	2005	-21.44753	47.089778	1101
A	ACMV	[MG:HMa:MG3A13:05]	2005	-21.44753	47.089778	1101
A	ACMV	[MG:HMa:MG4A18:05]	2005	-21.44753	47.089778	1101
A	ACMV	[MG:HMa:MG5A23:05]	2005	-21.44753	47.089778	1101
A	EACMCV	[MG:HMa:MG5C3:05]	2005	-21.44753	47.089778	1101
A	SACMV	[MG:HMa:MG6A1:05]	2005	-21.453003	47.085762	1132
A	SACMV	[MG:HMa:MG7A33:05]	2005	-21.453003	47.085762	1132
A	ACMV	[MG:HMa:MG8A36:05]	2005	-21.453003	47.085762	1132
A	CMMGV	[MG:And:MG9A42:06]	2006	-23.3342	43.68936	13
A	EACMKV	[MG:And:MG9B2:07]	2007	-23.3342	43.68936	13
A	EACMKV	[MG:And:MG10A48:06]	2006	-23.3342	43.68936	13
A	EACMKV	[MG:And:MG11A3:06]	2006	-23.3342	43.68936	13
A	ACMV	[MG:Ana:MG12A8:06]	2006	-18.749663	47.339901	1324
A	ACMV	[MG:Ana:MG13A14:06]	2006	-18.882369	46.86731	1365
A	ACMV	[MG:Ana:MG14A17:06]	2006	-18.882369	46.86731	1365
A	ACMV	[MG:Bon:MG15A22:06]	2006	-19.136841	46.450707	918
A	ACMV	[MG:Bon:MG16A28:06]	2006	-19.136841	46.450707	918
A	ACMV	[MG:Ats:MG17A33:06]	2006	-18.1499	49.402615	11
A	ACMV	[MG:Vak:18A38:06]	2006	-19.38527	47.437169	1565
A	SACMV	[MG:Ats:MG19A3:06]	2006	-18.285183	49.120986	83
A	SACMV	[MG:Ats:MG20A1:06]	2006	-18.285183	49.120986	83
A	SACMV	[MG:Ats:MG21B3:07]	2007	-18.133887	49.406686	11
A	ACMV	[MG:Vak:MG22A3:06]	2006	-19.38527	47.437169	1565
A	ACMV	[MG:Ana:MG23A1:06]	2006	-18.887438	47.554579	1259
A	ACMV	[MG:Ats:MG24A1:06]	2006	-18.133887	49.406686	11
A	SACMV	[MG:Ats:MG25A2:06]	2006	-18.133887	49.406686	11
A	ACMV	[MG:Ana:MG26A1:06]	2006	-18.887438	47.554579	1259
A	ACMV	[MG:Vak:MG27A3:06]	2006	-19.867242	47.033394	1505
A	SACMV	[MG:Ats:MG28A2:06]	2006	-18.285183	49.120986	83
A	SACMV	[MG:Ats:MG29S2:06]	2006	-18.285183	49.120986	83
A	ACMV	[MG:Vak:MG30A1:06]	2006	-19.867242	47.033394	1505
A	ACMV	[MG:Ats:MG31A1:06]	2006	-18.285183	49.120986	83
A	SACMV	[MG:Ats:MG32B1:06]	2006	-18.285183	49.120986	83
A	ACMV	[MG:Ana:MG35A1:06]	2006	-18.887438	47.554579	1259
A	SACMV	[MG:Ats:MG37A3:06]	2006	-18.316666	48.065074	1045
A	ACMV	[MG:Ats:MG38A1:06]	2006	-18.285183	49.120986	83

A	SACMV	[MG:Ana:MG39A1:06]	2006	-18.875448	47.558234	1273
A	ACMV	[MG:Ana:MG40A2:06]	2006	-18.4833	47.9	1331
A	SACMV	[MG:Ats:MG41S1:06]	2006	-18.133887	49.406686	11
A	SACMV	[MG:Ats:MG42A2:06]	2006	-18.285183	49.120986	83
A	ACMV	[MG:Ats:MG43A3:06]	2006	-18.316666	48.065074	1045
A	SACMV	[MG:Ats:MG44A1:06]	2006	-18.285183	49.120986	83
A	ACMV	[MG:Ats:MG44B1:06]	2006	-18.285183	49.120986	83
A	ACMV	[MG:Ats:MG45A7:06]	2006	-18.285183	49.120986	83
A	SACMV	[MG:Ats:MG45A10:06]	2006	-18.285183	49.120986	83
A	ACMV	[MG:Ana:MG46A1:06]	2006	-18.4833	47.9	1331
A	SACMV	[MG:Ita:MG47A3:06]	2006	-19.230521	46.765178	1643
A	ACMV	[MG:Ita:MG47A6:06]	2006	-19.230521	46.765178	1643
A	ACMV	[MG:Ana:MG48A1:06]	2006	-18.887438	47.554579	1259
A	ACMV	[MG:Ana:MG49A1:06]	2006	-18.94229	47.652174	1308
A	SACMV	[MG:Ana:MG50A1:06]	2006	-18.875448	47.558234	1273
A	SACMV	[MG:Ats:MG51A1:06]	2006	-18.285183	49.120986	83
A	ACMV	[MG:Ats:MG52A1:06]	2006	-18.133887	49.406686	11
A	SACMV	[MG:Ats:MG52C1:06]	2006	-18.133887	49.406686	11
A	ACMV	[MG:Ana:MG53A1:06]	2006	-18.887438	47.554579	1259
A	ACMV	[MG:Ana:MG54A1:06]	2006	-18.94229	47.652174	1308
A	ACMV	[MG:Ana:MG55A2:06]	2006	-18.4833	47.9	1331
A	ACMV	[MG:Ana:MG56A1:06]	2006	-18.4833	47.9	1331
A	ACMV	[MG:Vak:MG57A1:06]	2006	-19.867242	47.033394	1505
A	ACMV	[MG:Vak:MG58A3:06]	2006	-19.916897	46.933455	1680
A	ACMV	[MG:Ana:MG59A2:06]	2006	-18.4833	47.9	1331
A	ACMV	[MG:Ana:MG60A2:06]	2006	-18.4833	47.9	1331
A	ACMV	[MG:Ana:MG61A1:06]	2006	-18.887438	47.554579	1259
A	ACMV	[MG:Vak:MG62A1:06]	2006	-19.38527	47.437169	1565
A	ACMV	[MG:Vak:MG63A3:06]	2006	-19.867242	47.033394	1505
A	ACMV	[MG:Ana:MG64A1:06]	2006	-18.887438	47.554579	1259
A	ACMV	[MG:Ana:MG65A1:06]	2006	-18.4833	47.9	1331
A	ACMV	[MG:Ana:MG66A1:06]	2006	-18.887438	47.554579	1259
A	SACMV	[MG:Ats:MG67A1:06]	2006	-18.133887	49.406686	11
A	ACMV	[MG:Ats:MG67A9:06]	2006	-18.133887	49.406686	11
A	ACMV	[MG:Ana:MG68A1:06]	2006	-18.94229	47.652174	1308
A	ACMV	[MG:Ita:MG69A1:06]	2006	-19.230521	46.765178	1643
A	ACMV	[MG:Ana:MG70A2:06]	2006	-18.4833	47.9	1331
A	SACMV	[MG:Ats:MG71A1:06]	2006	-18.285183	49.120986	83
A	ACMV	[MG:Ana:MG72A1:06]	2006	-18.4833	47.9	1331
A	SACMV	[MG:Ana:MG73A1:06]	2006	-18.4833	47.9	1331
A	ACMV	[MG:Ana:MG74A3:06]	2006	-18.94229	47.652174	1308
A	ACMV	[MG:Ats:MG75A1:06]	2006	-18.133887	49.406686	11
A	ACMV	[MG:Ana:MG76A1:06]	2006	-18.887438	47.554579	1259
A	ACMV	[MG:Ana:MG77A2:06]	2006	-18.887438	47.554579	1259

A	ACMV	[MG:Ana:MG78A2:06]	2006	-18.887438	47.554579	1259
A	ACMV	[MG:Ana:MG79A1:06]	2006	-18.887438	47.554579	1259
A	ACMV	[MG:Ana:MG86A1:06]	2006	-18.887438	47.554579	1259
A	ACMV	[MG:Ats:MG87A1:06]	2006	-18.860261	49.147504	16
A	ACMV	[MG:Ats:MG88A1:06]	2006	-18.860261	49.147504	16
A	SACMV	[MG:Ats:MG88A7:06]	2006	-18.860261	49.147504	16
A	EACMKV	[MG:And:MG90A1:07]	2007	-23.350561	43.667217	7
A	ACMV	[MG:Bon:MG95A1:07]	2007	-18.450937	46.556292	1071
A	ACMV	[MG:Bon:MG97A3:07]	2007	-18.450937	46.556292	1071
A	ACMV	[MG:Ala:MG98A3:07]	2007	-17.834496	48.416545	767
A	ACMV	[MG:Ala:MG99A2:07]	2007	-17.834496	48.416545	767
A	ACMV	[MG:Ala:MG100A1:07]	2007	-17.834496	48.416545	767
A	ACMV	[MG:Ala:MG101A1:07]	2007	-17.834496	48.416545	767
A	ACMV	[MG:Ala:MG102A1:07]	2007	-17.834496	48.416545	767
A	ACMV	[MG:Ala:MG103A2:07]	2007	-17.834496	48.416545	767
A	ACMV	[MG:Ala:MG104A1:07]	2007	-17.834496	48.416545	767
A	ACMV	[MG:Ala:MG105A1:07]	2007	-17.834496	48.416545	767
A	ACMV	[MG:Vak:MG112A2:09]	2009	-19.18855	47.49075	1341
A	SACMV	[MG:Vat:MG120A3:09]	2009	-21.29239	47.57182	600
A	SACMV	[MG:Vat:MG122A2:09]	2009	-21.35834	48.09889	159
A	SACMV	[MG:Vat:MG123B3:09]	2009	-21.35834	48.09889	159
A	SACMV	[MG:Vat:MG124A3:09]	2009	-21.20129	48.22403	15
A	SACMV	[MG:Vat:MG125A1:09]	2009	-21.24472	48.30911	0
A	SACMV	[MG:Vat:MG126A2:09]	2009	-21.24472	48.30911	0
A	SACMV	[MG:Vat:MG127A1:09]	2009	-21.2491	48.30044	0
A	SACMV	[MG:Vat:MG129A4:09]	2009	-21.2491	48.30044	0
A	SACMV	[MG:Vat:MG130A1:09]	2009	-21.70386	47.99606	20
A	SACMV	[MG:Vat:MG131A2:09]	2009	-21.72237	48.00055	24
A	SACMV	[MG:Vat:MG133A8:09]	2009	-22.02985	47.96643	0
A	SACMV	[MG:Vat:MG134A2:09]	2009	-22.02985	47.96643	0
A	SACMV	[MG:Vat:MG135A2:09]	2009	-22.11502	48.00804	10
A	SACMV	[MG:Vat:MG136A3:09]	2009	-22.25146	47.88152	19
A	SACMV	[MG:Vat:MG137A3:09]	2009	-22.25146	47.88152	19
A	EACMCV	[MG:Vat:MG137A10:09]	2009	-22.25146	47.88152	19
A	SACMV	[MG:Vat:MG138B1:09]	2009	-22.36905	47.83994	0
A	SACMV	[MG:Vat:MG139A1:09]	2009	-22.36905	47.83994	0
A	SACMV	[MG:Atm:MG140A8:09]	2009	-22.65112	47.80243	50
A	SACMV	[MG:Atm:MG142A3:09]	2009	-22.80462	47.76955	24
A	SACMV	[MG:Atm:MG143A5:09]	2009	-22.80462	47.76955	24
A	SACMV	[MG:Atm:MG146A1:09]	2009	-22.81548	47.73644	37
A	SACMV	[MG:Atm:MG147A1:09]	2009	-22.76531	47.78728	9
A	EACMCV	[MG:Atm:MG148A2:09]	2009	-22.76531	47.78728	9
A	EACMKV	[MG:And:MG169A1:09]	2009	-22.99374	44.31236	440
A	SACMV	[MG:And:MG173A1:09]	2009	-23.3342	43.68936	0

A	SACMV	[MG:And:MG175A3:09]	2009	-23.3342	43.68936	0
A	SACMV	[MG:And:MG176A3:09]	2009	-23.3342	43.68936	0
A	ACMV	[MG:And:MG177A1:09]	2009	-23.3342	43.68936	0
A	EACMCV	[MG:And:MG178B2:09]	2009	-23.3342	43.68936	0
A	EACMCV	[MG:And:MG179A1:09]	2009	-23.3342	43.68936	0
A	EACMKV	[MG:And:MG181A1:09]	2009	-23.3342	43.68936	0
A	EACMKV	[MG:And:MG183A1:09]	2009	-23.3342	43.68936	0
A	EACMKV	[MG:And:MG183A3:09]	2009	-23.3342	43.68936	0
A	EACMKV	[MG:And:MG192A1:09]	2009	-22.92424	43.58309	2
A	EACMKV	[MG:And:MG207A1:09]	2009	-23.735342	44.387127	272
A	EACMKV	[MG:And:MG208A1:09]	2009	-23.735342	44.387127	272
A	SACMV	[MG:And:MG209A2:09]	2009	-23.735342	44.387127	272
A	EACMKV	[MG:And:MG213A1:09]	2009	-23.723276	44.379661	252
A	ACMV	[MG:Ana:MG214A2:08]	2008	-18.875448	47.558234	1273
A	ACMV	[MG:Ana:MG215A1:08]	2008	-18.875448	47.558234	1273
A	ACMV	[MG:Ana:MG215A2:08]	2008	-18.875448	47.558234	1273
A	EACMKV	[MG:Men:MG226A1:10]	2010	-19.7251	45.47622	79
A	SACMV	[MG:Men:MG233I1:10]	2010	-19.86312	45.49651	114
A	EACMKV	[MG:Men:MG234A1:10]	2010	-19.86312	45.49651	114
A	EACMKV	[MG:Men:MG235A2:10]	2010	-19.86312	45.49651	114
A	SACMV	[MG:Men:MG238A1:10]	2010	-19.86311	45.51537	85
A	EACMKV	[MG:Men:MG239A13:10]	2010	-20.35304	45.59957	134
A	EACMKV	[MG:Men:MG241A1:10]	2010	-20.35304	45.59957	134
A	EACMV	[MG:Men:MG242A3:10]	2010	-20.35304	45.59957	134
A	SACMV	[MG:Men:MG246A10:10]	2010	-20.35009	45.5589	130
A	ACMV	[MG:Men:MG249A1:10]	2010	-20.41469	45.06203	156
A	SACMV	[MG:Men:MG250A1:10]	2010	-20.41469	45.06203	156
A	SACMV	[MG:Men:MG251A1:10]	2010	-20.41257	44.81799	129
A	SACMV	[MG:Men:MG262A2:10]	2010	-20.25628	44.4135	21
A	SACMV	[MG:Men:MG27318:10]	2010	-19.68065	44.54804	28
A	SACMV	[MG:Men:MG275A3:10]	2010	-19.68065	44.54804	28
A	EACMKV	[MG:Men:MG294A1:10]	2010	-20.28234	44.40048	21
A	ACMV	[MG:Ita:MG306A2:10]	2010	-18.99545	47.2869	1343
A	ACMV	[MG:Ita:MG306A4:10]	2010	-18.99545	47.2869	1343
A	ACMV	[MG:Ita:MG307A1:10]	2010	-18.99545	47.2869	1343
A	ACMV	[MG:Ita:MG309A1:10]	2010	-18.99545	47.2869	1343
A	ACMV	[MG:Ita:MG310A1:10]	2010	-18.99545	47.2869	1343
A	ACMV	[MG:Ita:MG311A2:10]	2010	-18.96022	46.81824	1215
A	ACMV	[MG:Bon:MG318A1:10]	2010	-18.97985	46.47291	974
A	SACMV	[MG:Anj:MG321A8:10]	2010	-17.059	49.82	5
A	SACMV	[MG:Anj:MG328A1:10]	2010	-17.059	49.82	5
A	SACMV	[MG:Anj:MG331A1:10]	2010	-17.1	49.8	8
A	SACMV	[MG:Anj:MG333A1:10]	2010	-17.1	49.8	8
A	SACMV	[MG:Anj:MG334A3:10]	2010	-17.1	49.8	8

A	SACMV	[MG:Anj:MG335A6:10]	2010	-17.1	49.8	8
A	SACMV	[MG:Anj:MG336A5:10]	2010	-17.059	49.82	5
A	SACMV	[MG:Anj:MG337A1:10]	2010	-17.059	49.82	5
A	SACMV	[MG:Anj:MG338A2:10]	2010	-17.059	49.82	5
A	SACMV	[MG:Anj:MG339A1:10]	2010	-17.059	49.82	5
A	SACMV	[MG:Anj:MG340A1:10]	2010	-17.059	49.82	5
A	SACMV	[MG:Anj:MG341A1:10]	2010	-17.059	49.82	5
A	SACMV	[MG:Ala:MG342B4:11]	2011	-18.79075	48.24318	916
A	SACMV	[MG:Ala:MG343A7:11]	2011	-18.79075	48.24318	916
A	ACMV	[MG:Ala:MG343A10:11]	2011	-18.79075	48.24318	916
A	SACMV	[MG:Ala:MG347A1:11]	2011	-18.29938	48.26901	907
A	ACMV	[MG:Ala:MG349A3:11]	2011	-18.29938	48.26901	907
A	SACMV	[MG:Ala:MG352A2:11]	2011	-18.20196	48.25882	923
A	SACMV	[MG:Ala:MG369A2:11]	2011	-17.69421	48.4656	779
A	SACMV	[MG:Ala:MG373A2:11]	2011	-17.69421	48.4656	779
A	SACMV	[MG:Ala:MG379A6:11]	2011	-17.69421	48.4656	779
A	SACMV	[MG:Ala:MG398A1:11]	2011	-17.69421	48.4656	779
A	SACMV	[MG:Ala:MG400A4:11]	2011	-17.69421	48.4656	779
A	SACMV	[MG:Ala:MG402A1:11]	2011	-17.69421	48.4656	779
A	SACMV	[MG:Ala:MG402A4:11]	2011	-17.69421	48.4656	779
A	SACMV	[MG:Ala:MG403A4:11]	2011	-17.69421	48.4656	779
A	SACMV	[MG:Ala:MG404A1:11]	2011	-17.69421	48.4656	779
A	ACMV	[MG:Ala:MG408A1:11]	2011	-17.76582	48.44272	789
A	SACMV	[MG:Ala:MG409A2:11]	2011	-17.69421	48.4656	779
A	SACMV	[MG:Ala:MG411A1:11]	2011	-17.75855	48.44202	777
A	SACMV	[MG:Ala:MG414A1:11]	2011	-17.69421	48.4656	779
A	SACMV	[MG:Ala:MG414A4:11]	2011	-17.69421	48.4656	779
A	SACMV	[MG:Ala:MG419B2:11]	2011	-17.69421	48.4656	779
A	SACMV	[MG:Ala:MG420B3:11]	2011	-17.69421	48.4656	779
A	SACMV	[MG:Ala:MG449A3:11]	2011	-17.70228	48.17656	782
A	SACMV	[MG:Bet:MG467A1:11]	2011	-16.95695	46.92775	204
A	SACMV	[MG:Bet:MG471A1:11]	2011	-16.95695	46.92775	204
A	SACMV	[MG:Bet:MG473A2:11]	2011	-16.74869	47.05305	69
A	SACMV	[MG:Bet:MG474A6:11]	2011	-16.74869	47.05305	69
A	SACMV	[MG:Bet:MG475A3:11]	2011	-16.74869	47.05305	69
A	SACMV	[MG:Boe:MG483A1:11]	2011	-16.50022	47.15061	50
A	SACMV	[MG:Boe:MG490A3:11]	2011	-16.42382	47.13034	36
A	SACMV	[MG:Boe:MG491A8:11]	2011	-16.42382	47.13034	36
A	SACMV	[MG:Boe:MG492A4:11]	2011	-16.38018	46.92732	73
A	SACMV	[MG:Boe:MG503B1:11]	2011	-15.69669	46.41512	10
A	SACMV	[MG:Boe:MG512A2:11]	2011	-15.64531	46.40096	16
A	SACMV	[MG:Boe:MG516A1:11]	2011	-15.64531	46.40096	16
A	SACMV	[MG:Boe:MG521A1:11]	2011	-16.48865	46.7177	17
A	SACMV	[MG:Boe:MG526A3:11]	2011	-16.40945	46.77244	30

A	SACMV	[MG:Boe:MG529B2:11]	2011	-16.05308	46.803	99
A	SACMV	[MG:Boe:MG530A2:11]	2011	-16.05308	46.803	99
A	SACMV	[MG:Boe:MG533A1:11]	2011	-15.73064	46.42112	45
A	SACMV	[MG:Boe:MG537A1:11]	2011	-15.90058	46.5806	160
A	EACMKV	[MG:Boe:MG537A7:11]	2011	-15.90058	46.5806	160
A	SACMV	[MG:Boe:MG545A3:11]	2011	-16.31979	47.30378	71
A	SACMV	[MG:Boe:MG549A1:11]	2011	-16.31979	47.30378	71
A	EACMKV	[MG:Boe:MG552A2:11]	2011	-16.2492	47.29749	62
A	SACMV	[MG:Sof:MG560A1:11]	2011	-16.01449	47.65034	42
A	SACMV	[MG:Sof::MG561A2:11]	2011	-16.01449	47.65034	42
A	SACMV	[MG:Sof::MG562B1:11]	2011	-16.01449	47.65034	42
A	SACMV	[MG:Sof::MG569A2:11]	2011	-15.58861	47.6543	18
A	SACMV	[MG:Sof::MG570A3:11]	2011	-15.58861	47.6543	18
A	SACMV	[MG:Sof::MG571A1:11]	2011	-15.58861	47.6543	18
A	SACMV	[MG:Sof::MG573A1:11]	2011	-15.5839	47.66251	21
A	SACMV	[MG:Sof::MG574A1:11]	2011	-15.5839	47.66251	21
A	EACMKV	[MG:Sof::MG578A2:11]	2011	-15.53886	47.58445	55
A	EACMKV	[MG:Sof::MG579A3:11]	2011	-15.53886	47.58445	55
A	EACMCV	[MG:Sof::MG579B1:11]	2011	-15.53886	47.58445	55
A	EACMKV	[MG:Sof::MG582A1:11]	2011	-15.34315	47.78592	39
A	EACMKV	[MG:Sof::MG583A1:11]	2011	-15.34315	47.78592	39
A	SACMV	[MG:Sof::MG584A4:11]	2011	-15.1603	47.77603	64
A	EACMKV	[MG:Sof::MG584A6:11]	2011	-15.1603	47.77603	64
A	SACMV	[MG:Sof::MG594A1:11]	2011	-14.87214	48.07824	41
A	EACMKV	[MG:Sof::MG603A5:11]	2011	-14.64963	48.0918	17
A	SACMV	[MG:Sof::MG616A1:11]	2011	-14.21064	48.06968	15
A	SACMV	[MG:Sof::MG617A6:11]	2011	-14.21064	48.06968	15
A	EACMKV	[MG:Sof::MG619A1:11]	2011	-14.21064	48.06968	15
A	ACMV	[MG:Sof::MG619A7:11]	2011	-14.21064	48.06968	15
A	EACMCV	[MG:Sof::MG619B1:11]	2011	-14.21064	48.06968	15
A	EACMKV	[MG:Sof::MG619B2:11]	2011	-14.21064	48.06968	15
A	ACMV	[MG:Sof::MG624A1:11]	2011	-13.96449	48.18154	139
A	SACMV	[MG:Sof::MG624A4:11]	2011	-13.96449	48.18154	139
A	EACMCV	[MG:Sof::MG624B2:11]	2011	-13.96449	48.18154	139
A	EACMCV	[MG:Sof::MG624B5:11]	2011	-13.96449	48.18154	139
A	EACMKV	[MG:Dia:MG632A1:11]	2011	-13.67036	48.44828	19
A	ACMV	[MG:Dia:MG632A2:11]	2011	-13.67036	48.44828	19
A	EACMKV	[MG:Dia:MG633A7:11]	2011	-13.67036	48.44828	19
A	EACMKV	[MG:Dia:MG635A6:11]	2011	-13.6221	48.41063	18
A	EACMKV	[MG:Dia:MG637A4:11]	2011	-13.6221	48.41063	18
A	ACMV	[MG:Dia:MG638A4:11]	2011	-13.6221	48.41063	18
A	EACMKV	[MG:Dia:MG638A5:11]	2011	-13.6221	48.41063	18
A	EACMKV	[MG:Dia:MG638A8:11]	2011	-13.6221	48.41063	18
A	EACMKV	[MG:Dia:MG640A1:11]	2011	-13.62146	48.42264	14

A	EACMKV	[MG:Dia:MG640A3:11]	2011	-13.62146	48.42264	14
A	ACMV	[MG:Dia:MG648A1:11]	2011	-13.71197	48.42555	31
A	EACMKV	[MG:Dia:MG648A8:11]	2011	-13.71197	48.42555	31
A	EACMCV	[MG:Dia:MG648B1:11]	2011	-13.71197	48.42555	31
A	EACMCV	[MG:Dia:MG648B7:11]	2011	-13.71197	48.42555	31
A	EACMKV	[MG:Dia:MG649A1:11]	2011	-13.41513	48.81356	14
A	ACMV	[MG:Dia:MG650A1:11]	2011	-13.41513	48.81356	14
A	EACMKV	[MG:Dia:MG650A7:11]	2011	-13.41513	48.81356	14
A	ACMV	[MG:Dia:MG652A9:11]	2011	-13.35726	48.87019	15
A	EACMKV	[MG:Dia:MG652A11:11]	2011	-13.35726	48.87019	15
A	EACMKV	[MG:Dia:MG653A3:11]	2011	-13.35726	48.87019	15
A	EACMKV	[MG:Dia:MG655A2:11]	2011	-13.35726	48.87019	15
A	ACMV	[MG:Dia:MG656A1:11]	2011	-13.35726	48.87019	15
A	EACMKV	[MG:Dia:MG656A2:11]	2011	-13.35726	48.87019	15
A	ACMV	[MG:Dia:MG688A3:11]	2011	-13.1038	49.11025	32
A	SACMV	[MG:Dia:MG694A4:11]	2011	-13.1038	49.11025	32
A	SACMV	[MG:Dia:MG694A7:11]	2011	-13.1038	49.11025	32
A	EACMCV	[MG:Dia:MG694B2:11]	2011	-13.1038	49.11025	32
A	EACMCV	[MG:Dia:MG704B1:11]	2011	-12.63706	49.25065	627
A	SACMV	[MG:Dia:MG712A6:11]	2011	-12.59414	49.38832	163
A	SACMV	[MG:Dia:MG718A2:11]	2011	-12.59414	49.38832	163
A	SACMV	[MG:Dia:MG729A3:11]	2011	-12.32696	49.27625	33
A	ACMV	[MG:Dia:MG729A4:11]	2011	-12.32696	49.27625	33
A	SACMV	[MG:Dia:MG730:11]	2011	-12.32696	49.27625	33
B	EACMKV	[MG:Ana:MG1B2:06]	2006	-18.875448	47.558234	1273
B	ACMV	[MG:HMa:MG3C2:05]	2005	-21.44753	47.089778	1101
B	EACMKV	[MG:HMa:MG6B2:05]	2005	-21.453003	47.085762	1132
B	CMMGV	[MG:And:MG9B5:06]	2006	-23.3342	43.68936	13
B	CMMGV	[MG:And:MG9B19:06]	2006	-23.3342	43.68936	13
B	ACMV	[MG:Ana:MG12B10:06]	2006	-18.749663	47.339901	1324
B	ACMV	[MG:Ana:MG13B10:06]	2006	-18.882369	46.86731	1365
B	ACMV	[MG:Bon:MG15B2:06]	2006	-19.136841	46.450707	918
B	EACMKV	[MG:Ats:MG19A42:06]	2006	-18.285183	49.120986	83
B	EACMKV	[MG:Ats:MG21A1:07]	2007	-18.133887	49.406686	11
B	EACMKV	[MG:Ats:MG32A1:06]	2006	-18.285183	49.120986	83
B	EACMKV	[MG:Ana:MG34A2:06]	2006	-18.875448	47.558234	1273
B	EACMKV	[MG:Ats:MG38A5:06]	2006	-18.285183	49.120986	83
B	EACMKV	[MG:Ats:MG38A14:06]	2006	-18.285183	49.120986	83
B	EACMKV	[MG:Ana:MG39A7:06]	2006	-18.875448	47.558234	1273
B	EACMKV	[MG:Ats:MG41A7:06]	2006	-18.133887	49.406686	11
B	EACMKV	[MG:Ats:MG44B8:06]	2006	-18.285183	49.120986	83
B	EACMCV	[MG:Ats:MG45A1:06]	2006	-18.285183	49.120986	83
B	EACMKV	[MG:Ita:MG47A1:06]	2006	-19.230521	46.765178	1643
B	EACMKV	[MG:Ats:MG52C2:06]	2006	-18.133887	49.406686	11

B	ACMV	[MG:Ana:MG53B1:06]	2006	-18.887438	47.554579	1259
B	EACMKV	[MG:Ats:MG67A2:06]	2006	-18.133887	49.406686	11
B	EACMKV	[MG:Ana:MG73A3:06]	2006	-18.4833	47.9	1331
B	EACMKV	[MG:Ana:MG73A7:06]	2006	-18.4833	47.9	1331
B	EACMKV	[MG:Ats:MG88A13:06]	2006	-18.860261	49.147504	16
B	EACMKV	[MG:Vat:MG120A2:09]	2009	-21.29239	47.57182	600
B	EACMKV	[MG:Vat:MG122B2:09]	2009	-21.35834	48.09889	159
B	EACMKV	[MG:Vat:MG123A5:09]	2009	-21.35834	48.09889	159
B	EACMKV	[MG:Vat:MG125A1:09]	2009	-21.24472	48.30911	0
B	EACMKV	[MG:Vat:MG126A1:09]	2009	-21.24472	48.30911	0
B	EACMKV	[MG:Vat:MG126A2:09]	2009	-21.24472	48.30911	0
B	EACMKV	[MG:Vat:MG129A5:09]	2009	-21.2491	48.30044	0
B	EACMKV	[MG:Vat:MG133A4:09]	2009	-22.02985	47.96643	0
B	EACMKV	[MG:Vat:MG133A21:09]	2009	-22.02985	47.96643	0
B	EACMKV	[MG:Vat:MG133A45:09]	2009	-22.02985	47.96643	0
B	EACMKV	[MG:Vat:MG137A2:09]	2009	-22.25146	47.88152	19
B	EACMCV	[MG:Vat:MG137A12:09]	2009	-22.25146	47.88152	19
B	EACMKV	[MG:Vat:MG138A2:09]	2009	-22.36905	47.83994	0
B	EACMKV	[MG:Atm:MG140B23:09]	2009	-22.65112	47.80243	50
B	EACMKV	[MG:Atm:MG142A1:09]	2009	-22.80462	47.76955	24
B	EACMKV	[MG:Atm:MG142A6:09]	2009	-22.80462	47.76955	24
B	EACMKV	[MG:Atm:MG144A1:09]	2009	-22.80462	47.76955	24
B	EACMKV	[MG:Atm:MG145A1:09]	2009	-22.81548	47.73644	37
B	EACMKV	[MG:And:MG178A2:09]	2009	-23.3342	43.68936	0
B	EACMKV	[MG:And:MG179A9:09]	2009	-23.3342	43.68936	0
B	EACMKV	[MG:And:MG202A1:09]	2009	-23.959352	45.031272	496
B	EACMKV	[MG:And:MG209A1:09]	2009	-23.735342	44.387127	272
B	EACMKV	[MG:And:MG209A4:09]	2009	-23.735342	44.387127	272
B	EACMKV	[MG:And:MG210A1:09]	2009	-23.735342	44.387127	272
B	EACMKV	[MG:And:MG212A1:09]	2009	-23.735342	44.387127	272
B	ACMV	[MG:Ana:MG214B1:08]	2008	-18.875448	47.558234	1273
B	EACMKV	[MG:Men:MG223A3:10]	2010	-19.7251	45.47622	79
B	EACMKV	[MG:Men:MG225A2:10]	2010	-19.7251	45.47622	79
B	EACMKV	[MG:Men:MG239B11:10]	2010	-20.35304	45.59957	134
B	EACMKV	[MG:Men:MG248A1:10]	2010	-20.45655	45.21628	236
B	EACMKV	[MG:Men:MG251A8:10]	2010	-20.41257	44.81799	129
B	EACMKV	[MG:Men:MG253A1:10]	2010	-20.41257	44.81799	129
B	EACMCV	[MG:Men:MG262B1:10]	2010	-20.25628	44.4135	21
B	EACMKV	[MG:Men:MG273A1:10]	2010	-19.68065	44.54804	28
B	EACMKV	[MG:Men:MG275A7:10]	2010	-19.68065	44.54804	28
B	EACMKV	[MG:Men:MG295A1:10]	2010	-20.28234	44.40048	21
B	ACMV	[MG:Ita:MG295A5:10]	2010	-18.96022	46.81824	1215
B	EACMKV	[MG:Anj:MG321A2:10]	2010	-17.059	49.82	5
B	EACMKV	[MG:Anj:MG328A4:10]	2010	-17.059	49.82	5

B	EACMKV	[MG:Anj:MG333A5:10]	2010	-17.1	49.8	8
B	EACMKV	[MG:Anj:MG334A5:10]	2010	-17.1	49.8	8
B	EACMKV	[MG:Anj:MG335A1:10]	2010	-17.1	49.8	8
B	EACMKV	[MG:Anj:MG336A1:10]	2010	-17.059	49.82	5
B	EACMKV	[MG:Anj:MG337A3:10]	2010	-17.059	49.82	5
B	EACMKV	[MG:Anj:MG338A5:10]	2010	-17.059	49.82	5
B	EACMKV	[MG:Anj:MG339A5:10]	2010	-17.059	49.82	5
B	EACMKV	[MG:Anj:MG340A7:10]	2010	-17.059	49.82	5
B	EACMKV	[MG:Anj:MG341A5:10]	2010	-17.059	49.82	5
B	EACMKV	[MG:Ala:MG343A5:11]	2011	-18.79075	48.24318	916
B	ACMV	[MG:Ala:MG343B1:11]	2011	-18.79075	48.24318	916
B	ACMV	[MG:Ala:MG343B6:11]	2011	-18.79075	48.24318	916
B	ACMV	[MG:Ala:MG349B1:11]	2011	-18.29938	48.26901	907
B	EACMKV	[MG:Ala:MG369A9:11]	2011	-17.69421	48.4656	779
B	EACMKV	[MG:Ala:MG373A4:11]	2011	-17.69421	48.4656	779
B	ACMV	[MG:Ala:MG379B1:11]	2011	-17.69421	48.4656	779
B	EACMKV	[MG:Ala:MG400A2:11]	2011	-17.69421	48.4656	779
B	EACMKV	[MG:Ala:MG403A6:11]	2011	-17.69421	48.4656	779
B	EACMKV	[MG:Ala:MG404A5:11]	2011	-17.69421	48.4656	779
B	EACMKV	[MG:Ala:MG409A1:11]	2011	-17.69421	48.4656	779
B	EACMKV	[MG:Ala:MG411A6:11]	2011	-17.75855	48.44202	777
B	EACMKV	[MG:Ala:MG414A2:11]	2011	-17.69421	48.4656	779
B	EACMKV	[MG:Ala:MG419A1:11]	2011	-17.69421	48.4656	779
B	EACMKV	[MG:Ala:MG420A2:11]	2011	-17.69421	48.4656	779
B	EACMKV	[MG:Ala:MG446A1:11]	2011	-17.70228	48.17656	782
B	EACMKV	[MG:Bet:MG467A2:11]	2011	-16.95695	46.92775	204
B	EACMKV	[MG:Bet:MG468A1:11]	2011	-16.95695	46.92775	204
B	EACMKV	[MG:Bet:MG571A8:11]	2011	-16.95695	46.92775	204
B	EACMKV	[MG:Bet:MG473A3:11]	2011	-16.74869	47.05305	69
B	EACMKV	[MG:Bet:MG474A3:11]	2011	-16.74869	47.05305	69
B	EACMKV	[MG:Boe:MG489A1:11]	2011	-16.42382	47.13034	36
B	EACMKV	[MG:Boe:MG491A1:11]	2011	-16.42382	47.13034	36
B	EACMKV	[MG:Boe:MG507A6:11]	2011	-15.69669	46.41512	10
B	EACMKV	[MG:Boe:MG511A1:11]	2011	-15.64531	46.40096	16
B	EACMKV	[MG:Boe:MG520A1:11]	2011	-15.66452	46.37225	22
B	EACMKV	[MG:Boe:MG537A2:11]	2011	-15.90058	46.5806	160
B	EACMKV	[MG:Boe:MG545A5:11]	2011	-16.31979	47.30378	71
B	EACMKV	[MG:Boe:MG549A2:11]	2011	-16.31979	47.30378	71
B	EACMKV	[MG:Sof::MG561A1:11]	2011	-16.01449	47.65034	42
B	EACMKV	[MG:Sof::MG565A1:11]	2011	-15.56734	47.66085	16
B	EACMKV	[MG:Sof::MG570A1:11]	2011	-15.58861	47.6543	18
B	EACMKV	[MG:Sof::MG571A5:11]	2011	-15.58861	47.6543	18
B	EACMKV	[MG:Sof::MG593A1:11]	2011	-14.87214	48.07824	41
B	EACMKV	[MG:Sof::MG617A7:11]	2011	-14.21064	48.06968	15

B	ACMV	[MG:Sof::MG619B2:11]	2011	-14.21064	48.06968	15
B	EACMKV	[MG:Sof::MG624A2:11]	2011	-13.96449	48.18154	139
B	ACMV	[MG:Sof::MG624B2:11]	2011	-13.96449	48.18154	139
B	EACMCV	[MG:Dia:MG637A6:11]	2011	-13.6221	48.41063	18
B	ACMV	[MG:Dia:MG648B2:11]	2011	-13.71197	48.42555	31
B	ACMV	[MG:Dia:MG688B1:11]	2011	-12.69894	49.25484	499
B	EACMKV	[MG:Dia:MG698A1:11]	2011	-12.605	49.37422	181
B	EACMKV	[MG:Dia:MG712A10:11]	2011	-12.59414	49.38832	163
B	EACMKV	[MG:Dia:MG718A1:11]	2011	-12.59414	49.38832	163
B	EACMKV	[MG:Dia:MG729A2:11]	2011	-12.32696	49.27625	33
B	EACMKV	[MG:Dia:MG730A1:11]	2011	-12.32696	49.27625	33

Molecular epidemiology, genetic diversity and phylogeography of cassava mosaic geminiviruses in Madagascar

Cassava is a staple food for hundreds of millions of African people. Cassava mosaic disease (CMD) caused by cassava mosaic geminiviruses (CMGs) is one of the major constraints of its culture in Africa and Madagascar. This study aimed (1) to determine the genetic diversity of CMGs, (2) to identify the main epidemiological factors associated with CMD and (3) to determine the origin and the dispersal pattern of CMGs in Madagascar.

Sampling surveys allowed to collect hundreds of cassava leaf samples and to identify the main epidemiological factors associated with CMD. Six CMG species were diagnosed with *African cassava mosaic virus* (ACMV), *East African cassava mosaic Cameroon virus* (EACMCV), *East African cassava mosaic Kenya virus* (EACMKV), *East African cassava mosaic virus* (EACMV), *South African cassava mosaic virus* (SACMV) and the new species named Cassava mosaic Madagascar virus (CMMGV). The CMD prevalence and abundance of the insect vector *Bemisia tabaci* were correlated with altitude. Thus, the lowlands (0-200m) were the most affected regions with the higher prevalence of CMD and abundance of *B. tabaci*. CMD infection was primarily due to the use of infected cuttings (> 89%) for plantings. In addition, 21% of the samples tested were mixed infected by two to four CMG species and showed more severe symptoms. EACMCV was frequently detected in mixed infection while ACMV and SACMV were rather found in single infection. Distinct geographical distributions were observed for the six species. ACMV was more prevalent in highlands (> 800m) while EACMV-like were more prevalent in coastal lowlands.

Phylogenetic and recombination analysis of the genome sequences of CMMGV allowed to determine the recombinant features of this species. With the exception of two recombinant regions that resembled a CMG, the non-recombinant part of the DNA-A component is most closely related to monopartite begomovirus infecting tomato in the south west Indian Ocean islands. Whereas the DNA-B component possesses one recombinant region originating from an unidentified virus, the rest of the genome is closely related to CMGs described in East Africa.

The complete nucleotide sequences of a new alphasatellite molecule named Cassava mosaic Madagascar Alphasatellite (CMMGA) have been isolated from cassava mosaic diseased plant. The most closely related sequence is that of Coton leaf curl Gezira alphasatellite isolated in Sudan (80% nucleotide similarity). The occurrence of CMMGA in cassava culture especially from northern region of Madagascar raises questions about its implication on pathogenicity of CMGs and the expression of CMD symptoms.

Cloning and sequencing methods allowed to find 400 complete nucleotide sequences which confirm the occurrence of six CMG species in Madagascar. The phylogeographic analysis suggested a single and recent introduction of ACMV from Africa mainland to Madagascar that occurred around 1993. The genetic variability within Malagasy isolates of ACMV was highly correlated with geographical distance. Diffusion of ACMV species seemed to be highly influenced by human factor.

These findings raise questions about the origin, the consequences and the epidemiological risks of such CMG diversity in Madagascar especially the recombination risk causing the emergence of new and severe virus strains.

Epidémiologie moléculaire, diversité génétique et phylogéographie des bégomovirus responsables de la maladie de la mosaïque du manioc à Madagascar

Le manioc est l'aliment de base d'un demi-milliard de personnes en Afrique. La maladie de la mosaïque ou *cassava mosaic disease* (CMD) causée par l'infection des bégomovirus du manioc ou *cassava mosaic geminiviruses* (CMGs) est une des contraintes majeures de sa culture en Afrique et à Madagascar. Ce travail de thèse traite (1) l'inventaire complet de la pression parasitaire virale sur la culture, (2) les principaux facteurs épidémiologiques de la CMD et (3) l'origine et le mode de diffusion des CMGs à Madagascar.

Les campagnes d'échantillonnages ont permis de collecter des centaines d'échantillons foliaires de manioc et d'identifier les principaux facteurs épidémiologiques associés à la CMD. Une description sans précédent de six espèces de CMGs a été réalisée : *African cassava mosaic virus* (ACMV), *East African cassava mosaic Cameroon virus* (EACMCV), *East African cassava mosaic Kenya virus* (EACMKV), *East African cassava mosaic virus* (EACMV), *South African cassava mosaic virus* (SACMV) et une nouvelle espèce virale nommée *Cassava mosaic Madagascar virus* (CMMGV). La prévalence de la CMD et l'abondance de l'insecte vecteur *Bemisia tabaci* ont été corrélées avec l'altitude. Les régions les plus affectées par la CMD et *B. tabaci* sont principalement celles de basse altitude (< 200m). L'infection est très majoritairement liée à l'utilisation de boutures contaminées (95%). Par ailleurs, 21% des échantillons étaient coinfestés par deux voir quatre espèces de CMGs, avec des symptômes significativement plus sévères. L'EACMCV est plus fréquemment détectée en infection mixte à l'inverse de l'ACMV et du SACMV. La répartition géographique des CMGs est distincte. L'ACMV est prévalent en altitude (> 800m) sur les Hauts-Plateaux, tandis que les EACMV-like sont plus prévalent en basse altitude (0-200m) dans les zones côtières.

Le remplacement phylogénétique du CMMGV et l'analyse de recombinaison démontrent l'origine recombinante de ce virus. A l'exception des deux régions recombinantes de l'ADN-A apparentées aux CMGs, la région non-recombinante de l'ADN-A est génétiquement plus apparentée aux bégomovirus monopartites caractérisés sur tomate dans les îles du sud ouest de l'océan Indien. Le composant d'ADN-B possède une région recombinante issue d'un virus encore inconnu tandis que le reste du génome est apparenté aux CMGs décrits en Afrique de l'Est. Une nouvelle espèce d'alphasatellite nommée *Cassava mosaic Madagascar Alphasatellite* (CMMGA) a également été identifiée. La séquence nucléotidique la plus proche (80%) est celle d'un isolat soudanais du Coton leaf curl Gezira alphasatellite isolée sur coton. L'occurrence du CMMGA dans les cultures de manioc du Nord de Madagascar amène à s'interroger sur son implication dans la pathogénicité des CMGs et l'expression des symptômes de la CMD.

Le clonage et le séquençage de génomes complets de bégomovirus a permis d'obtenir une description sans précédente de 400 molécules d'ADN qui ont confirmé la présence des six espèces de CMGs à Madagascar. Les analyses phylogéographiques suggèrent une seule introduction récente de l'ACMV à Madagascar depuis le continent Africain, datée aux alentours de 1993. La variabilité génétique entre les isolats malgaches d'ACMV étant fortement corrélée avec la distance géographique, la diffusion de l'ACMV semble fortement influencée par le facteur humain. Ces résultats nous ont amené à nous interroger sur les origines, les conséquences et les risques épidémiologiques d'une telle diversité de CMGs à Madagascar, notamment face aux risques d'apparition de nouveaux variants sévères par recombinaison.