

per ✓

UTILISATION DE LA TECHNIQUE "ELISA"  
DANS LE DIAGNOSTIC DE LA MOSAÏQUE DE L'IGNAME

J.C. THOUVENEL & C. FAUQUET

Laboratoire de Virologie, ORSTOM, B.P. V-51 ABIDJAN (Côte d'Ivoire)

RESUME

La Mosaïque de l'Igname constitue le problème phytopathologique majeur de la culture de l'Igname en Côte d'Ivoire. Cette maladie se transmet par le tubercule et il est important de reconnaître le matériel sain pour l'obtention des semenceaux sains. Le contrôle des plants d'Igname est difficile car les symptômes de la maladie tendent à disparaître avec la croissance de la plante. Un antisérum spécifique a été préparé, mais son utilisation par la technique de microprécipitation n'est possible qu'avec un extrait clarifié des plants à tester. Grâce à la technique ELISA il est maintenant possible de tester rapidement de nombreux plants à partir de leur extrait brut. Le contrôle des collections de cultivars d'Igname en Côte d'Ivoire par cette méthode a été commencé.

YAM MOSAIC DIAGNOSIS BY ELISA METHOD

SUMMARY

Yam mosaic is the most important phytopathological problem of yam crops in Ivory Coast. This disease is propagated by the tuber seeds, and consequently is important to get virus-free tubers for planting. Controlling the plants is difficult because symptoms disappear when plants are aging. Specific antiserum was prepared, but its use in microprecipitin tests is only possible with clarified leaf extract. ELISA method permit to test rapidly numerous plant using crude extract. Survey in yam collections of Ivory Coast is made by this method.

Fonds Documentaire ORSTOM



010010740

Fonds Documentaire ORSTOM

Cote: Bx 10740 Ex: 1

- THOUVENEL, J.-C. & FAUQUET C. (1980). Utilisation de la technique "ELISA" dans le diagnostic de la mosaïque de l'Igname. 2ème Conférence Internationale sur l'Impact des Maladies à Virus sur le Développement des Pays Africains et du Moyen Orient, Nairobi, 2-6 décembre 1980.

L'igname constitue un des éléments de base du régime alimentaire en Afrique de l'Ouest. Le principal problème phytopathologique est une maladie à virus : la Mosaïque de l'igname. Cette maladie a été étudiée et décrite en Côte d'Ivoire (THOUVENEL & FAUQUET, 1977, 1979) ainsi qu'au Nigeria (TERRY, 1976). Le virus responsable appartient au groupe des potyvirus. Cette maladie est transmise par les aphides, elle se transmet également par le tubercule mais pas par les graines.

Du fait de la propagation végétative de l'igname, la transmission par le tubercule est certainement responsable du taux élevé de plantes malades rencontrées (jusqu'à 100 % dans les champs de la Basse Côte d'Ivoire). Les symptômes de la maladie ; une chlorose internervaire ou une mosaïque souvent accompagnées de déformations, sont bien visibles sur les jeunes plantes. Par contre sur la plante adulte il est difficile de les observer et il est quasiment impossible de les retrouver au moment de la récolte ; il est donc impossible de sélectionner les tubercules provenant de pieds sains.

Un antisérum spécifique a été préparé pour permettre un diagnostic sûr par sérologie. Cet antisérum réagit parfaitement avec du virus purifié ; mais si l'on teste des extraits bruts d'igname, la forte quantité de mucilages présents ne permet pas d'observer la réaction en test de microprécipitation. Il faut clarifier l'extrait par du chloroforme, et souvent le concentrer par une ultra-centrifugation, car la concentration du virus dans les plantes adultes est faible.

Nous avons essayé la technique ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) adaptée au virus de plantes (CLARK & ADAMS, 1977), cette méthode s'est révélée satisfaisante. Nous exposons ici la technique utilisée et les résultats obtenus dans les tests effectués sur quelques cultivars de *Dioscorea alata* et de *D. cayenensis* dans les collections de Côte d'Ivoire.

## MATERIEL ET METHODES

L'antisérum a été préparé en injectant par piqure intramusculaire à un lapin environ 1 mg de virus purifié par semaine pendant 5 semaines. Les globulines ont été purifiées à partir de l'antisérum. Une partie de ces globulines a été conjuguée à de la phosphatase alcaline (Type VII, Sigma Chem. Co.) d'après la méthode de CLARK et ADAMS (1977).

Les tests ELISA ont été effectués d'après la méthode des anticorps doubles (appelée aussi technique du "sandwich"), dans des plaques "Microelisa" en plastique spécial (Dynatech Laboratories).

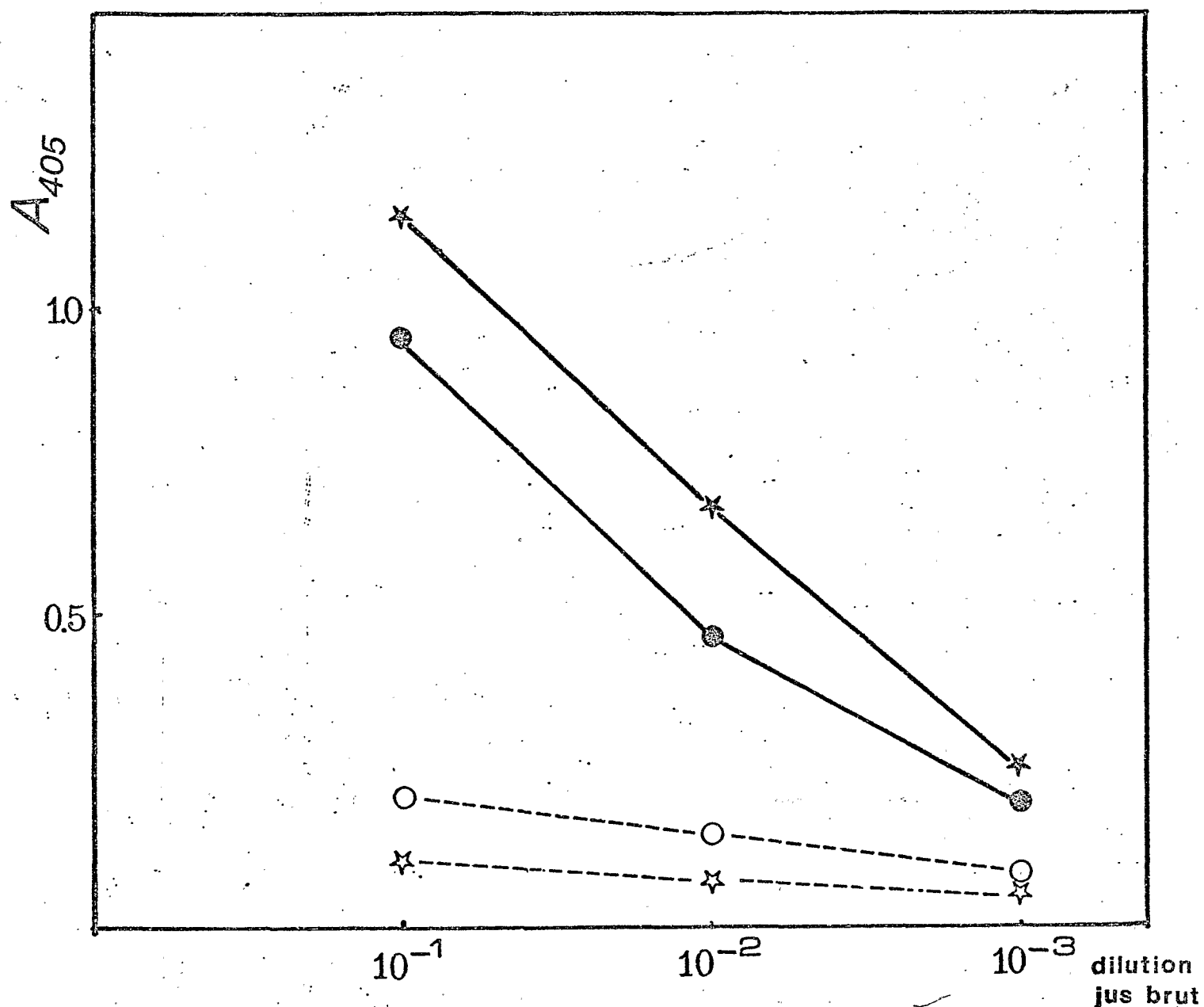
L'extrait brut de plante a été réalisé en broyant les feuilles à tester dans un tampon phosphate-NaCl (tampon PBS), pH 7,4 contenant 0,05% de Tween 20, 2% de polyvinyl pyrrolidone et 0,2% d'albumine d'oeuf. Les dilutions ont été effectuées dans le même tampon.

La réaction colorée a été mesurée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 405 nm.

## MISE AU POINT DU TEST ELISA SUR L'IGNAME

L'antisérum utilisé a un titre de 1/1 024 en microprécipitation sous huile de paraffine, avec une réaction contre les protéines normales de l'igname inférieure à 1/8.

Nous avons déterminé les conditions optimales du test ELISA en faisant varier la concentration des globulines de 0,1 à 10 µg/ml, et la concentration du conjugué "globuline-enzyme" de 1/200 à 1/3 200. Les conditions retenues ont été une concentration de globulines de 10 µg/ml et un conjugué dilué au 1/500. Dans ces conditions il ne se produit aucune réaction avec les extraits de plantes saines.



Détection du Virus de la Mosaïque de l'Igname par la méthode ELISA. Absorption à 405 nm des échantillons obtenus à partir de différentes dilutions du jus brut dans le tampon PBS-Tween de Dioscorea cayenensis malade (●—●) et de Nicotiana benthamiana malade (★—★) - Précoating 10 $\mu$ /ml, dilution du conjugué 1:200 - ; les témoins respectifs à partir de plantes saines sont figurés en pointillé.

## RESULTATS

La figure 1 donne les valeurs obtenues au spectrophotomètre avec des dilutions variant de  $10^{-1}$  à  $10^{-3}$  provenant de plantes malades et de plantes saines. Pour l'Igname il est possible de détecter le virus de façon significative jusqu'à une dilution de  $10^{-3}$ , la valeur obtenue avec l'extrait de plante malade est encore double de celle obtenue avec l'extrait de plante saine.

Les valeurs obtenues avec l'extrait de *Nicotiana benthamiana* infecté par la Mosaïque de l'Igname sont plus différenciées. Cela est dû à la concentration plus forte du virus dans le plant de tabac, et à l'absence des protéines normales spécifiques de l'Igname dans l'extrait de tabac sain.

A la suite de ces expériences, nous avons commencé à tester différents cultivars dans les collections de la Côte d'Ivoire. Les tests ont été effectués avec un extrait brut de la plante à tester dilué 10 fois et 50 fois. Les résultats obtenus sont exposés dans les tableaux I et II.

Le tableau I donne le résultat du test sur 29 cultivars de *D. cayenensis* ; à l'exception des cultivars Tamí et Sepela ils sont tous malades (27/29).

Le tableau II donne le résultat pour 17 cultivars de *D. alata*. La majorité (12/17) est malade à l'exception des cultivars Binagos, Florido, Nza Seguela, Smooth Statia et Yro.

Les cultivars reconnus comme indemne de Mosaïque ne présentaient évidemment pas de symptômes ; par contre, de nombreux autres qui ne présentaient pas de symptômes lors de l'observation en champs, se sont révélés malades à l'analyse, particulièrement chez *D. alata*.

Les tests ont été également effectués sur des cultivars de *D. bulbifera*, *D. dumetorum*, *D. esculenta* et *D. trifida* qui présentaient de légers symptômes de maladie. Ils ont été positifs. Il faut noter que lors des tests par inoculation *D. bulbifera* semblait résistant à la Mosaïque par inoculation (THOUVENEL et FAUQUET, 1979), nous voyons maintenant que certains cultivars de *D. bulbifera* sont susceptibles.

## DISCUSSION

Les avantages de cette méthode dans l'indexage de l'Igname sont multiples :

- . Ce test est utilisable sur un extrait brut de la plante, il est inutile de procéder à une clarification de l'extrait.
- . Ce test est très sensible (significatif jusqu'à une dilution de  $10^{-3}$  de l'extrait). Il n'est donc pas nécessaire de procéder à une concentration préalable de l'échantillon.
- . Ce test est extrêmement spécifique.
- . Ce test est rapide, les résultats sont obtenus dans les 24 heures.

Il est donc maintenant possible de tester rapidement un grand nombre de plantes par cette méthode ; ceci peut être utilisé pour déterminer avec certitude les plants sains avant de récolter les tubercules destinés à servir de semence. Il devient également possible de reconnaître avec sûreté les cultivars résistants à la maladie ; cette information aidera les généticiens dans leur programme de sélection.

## REFERENCES

- CLARK, M.F. & A.N. ADAMS (1977) - Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.*, 34, 475-483.
- TERRY, E.R. (1976) - Incidence, symptomatology and transmission of a *Dioscorea* spp. virus in Nigeria. *Proc. 4 th Symp. Int. Soc. Trop. Root Crops*, pp. 170-173.
- THOUVENEL, J.C. & C. FAUQUET (1977) - Une mosaïque de l'Igname (*Dioscorea cayenensis*) causée par un virus filamenteux en Côte d'Ivoire. *C.R. Acad. Sc. Paris*, t. 284, ser. D, 1947-1949.
- THOUVENEL, J.C. & C. FAUQUET (1979) - Yam mosaic, a new potyvirus infecting *Dioscorea cayenensis* in the Ivory Coast. *Ann. Appl. Biol.*, 93, 279-283.

Contrôle sérologique par la méthode ELISA de différents cultivars de Dioscorea cayenensis provenant des collections de l'ENSA et de l'ORSTOM en Côte d'Ivoire.

Cultivar	Origine E= ENSA O= ORSTOM	Symptômes présents	Test ELISA
A 10	O	+	+
DAZOPLE	E	+	+
DEZOPLE	E	-	+
GBANGNAN	O	+	+
GNINGNOUGOU	E	+	+
GOROGODO	O	+	+
KANGBA	O	+	+
KEPEPALA	E	-	+
KINGUILIN	E	+	+
KINGUINLE	E	+	+
KOFFI orig. SINKHA	O	+	+
KOTTO	O	+	+
KPAN	O	+	+
KPONA	O	-	+
KRENGLE	O	+	+
KRENGLE JAUNE	O	+	+
LOKOBRE	O	+	+
LOKPA	O	+	+
MAPAN	E	-	+
MAPAN	E	+	+
SAVIE	E	-	+
SAVIE	O	+	+
SEPELA	O	-	-
SIARA	E	+	+
SP DOUCE	O	+	+
TAMI	O	-	-
TANGAMMOUROUGA	O	+	+
TELELA	O	+	+
WABORO	E	+	+

Contrôle sérologique par la méthode ELISA de différents cultivars de Dioscorea alata provenant des collections de l'ENSA et de l'ORSTOM en Côte d'Ivoire.

Cultivar	Origine E= ENSA O= ORSTOM	Symptômes présents	Test ELISA
BETE BETE	O	+	+
BINOGOS	E	-	-
BRAZO FUERTE	O	-	+
DOUBLE	O	-	+
DOUBLE feuilles violettes	O	+	+
FLORIDO	E	-	-
KINAMPAY	O	+	+
N'DJUE KOUDOU	O	-	+
NZA ROSE	O	+	+
NZA SEGUELA	E	-	-
NZA SP	O	+	+
NZA YASSOI	O	-	+
N'ZIOUA	O	+	+
SEA 20	O	+	+
SMOOTH STATIA	O	-	-
WHITE LISBON	O	+	+
YRO	E	-	-