

Développement d'une méthode sérologique sensible pour la détection spécifique de *Macrophomina phaseolina*, agent causal de la pourriture cendrée du niébé (*Vigna unguiculata*)

AFOUDA¹ L, WYDRA²K. & WOLF³ G.

1. Université de Parakou, Bénin; 2. Université de Goettingen, Allemagne

Colloque International sur la Gestion des Risques Phytosanitaires
9-11 Novembre 2009, Marrakech, Maroc

Plan

I Introduction

II Objectif

III Matériel et méthodes

IV Résultats et discussions

V Conclusion

1- Introduction

➤ *Macrophomina phaseolina*

- ✓ Pathogène du sol et des semences
- ✓ Virulent dans les conditions de stress (H_2O , T°)
- ✓ 300 plantes hôtes de plusieurs familles botaniques, dont *Vigna unguiculata* (Cowpea)

1- Introduction (Suite)

➤ *Vigna unguiculata* (Cowpea)

✓ Importance

Valeur nutritionnelle (24-28% protéines; fixation N₂; résistance à la sécheresse)

Production (millions x tones): 2, 5 dans le monde
dont 2 en Afrique

✓ Symptômes de *M. Phaseolina* sur *Vigna unguiculata*



Symptômes de *M. Phaseolina* sur *Vigna unguiculata*

2- Objectif

➤ Objectif général

détection spécifique de *Macrophomina phaseolina*

➤ Objectifs spécifiques

- ✓ Evaluer l'état phytosanitaire des lots de semence
- ✓ Quantifier *M. phaseolina* dans les différents organes d'une plante infectée
- ✓ Evaluer les antagonistes candidats à une lutte biologique contre *M. phaseolina*

3- Matériel et méthodes

➤ Préparation de l'antigène

- ✓ A partir du **mycélium** de *M. phaseolina* cultivé sur membrane de polysulfon ajustement concentration protéine à 1mg/mL
- ✓ A partir du **milieu de culture**: dialyse dans du PBS (24h, 7°), concentration par ultracentrifugation et ajustement concentration protéine à 0,1mg/mL

3- Matériel et méthodes (Suite)

➤ **Production, purification et biotinylation des anticorps**

✓ **Immunisation des lapins**

4 injections, dont les 3 1^{ères} à 2 semaines d'intervalle et la dernière 1 mois plus tard.

Prélèvement de sérum 1 semaine après chaque injection

✓ **Purification des IgG:** par précipitation au sulfate d'ammonium (Clark et Adam, 1977)

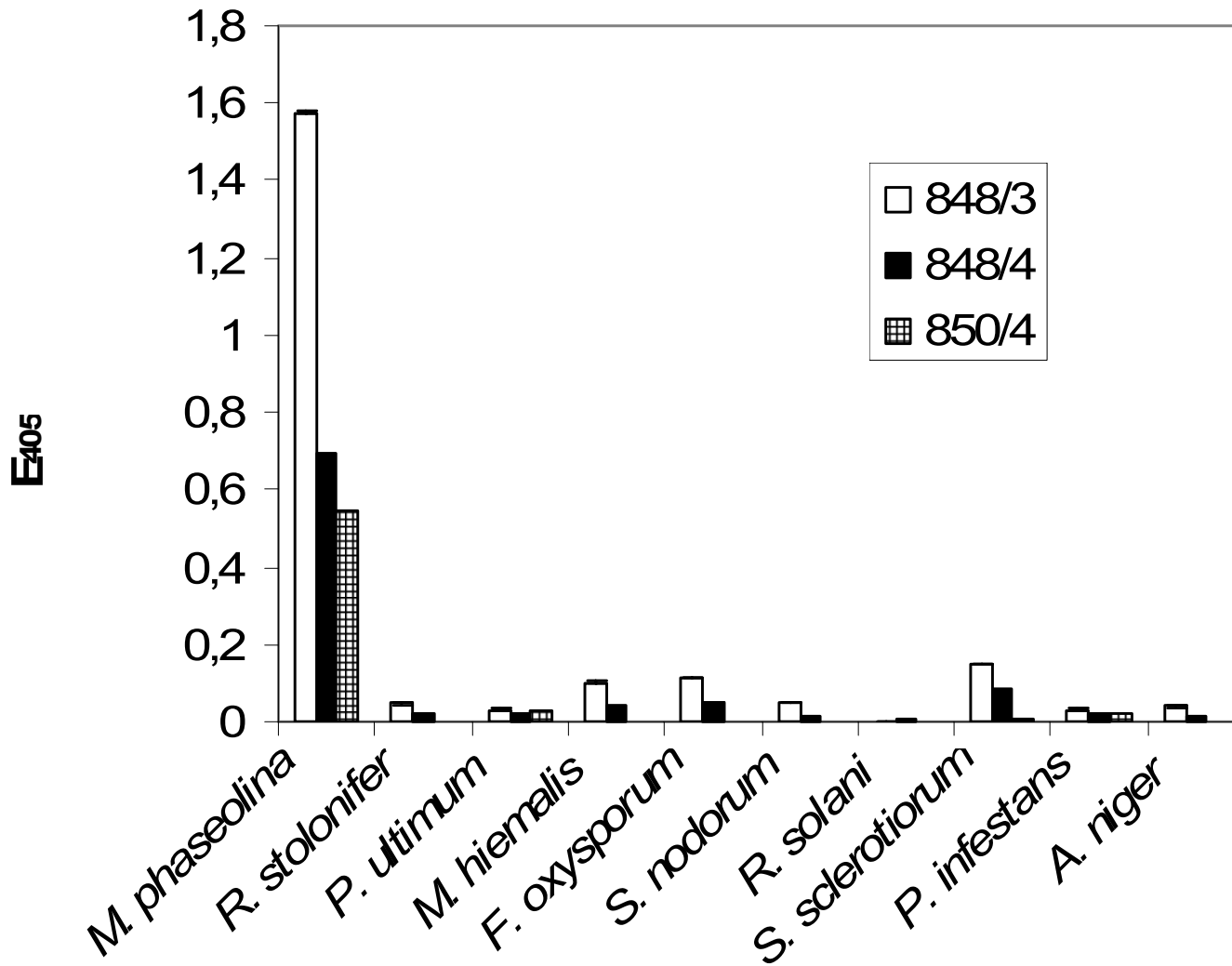
✓ **Biotinylation des anticorps:** dialyse dans solution tampon, puis couplage à la biotine

✓ **Procédure ELISA :** (Clark et Adam, 1977)

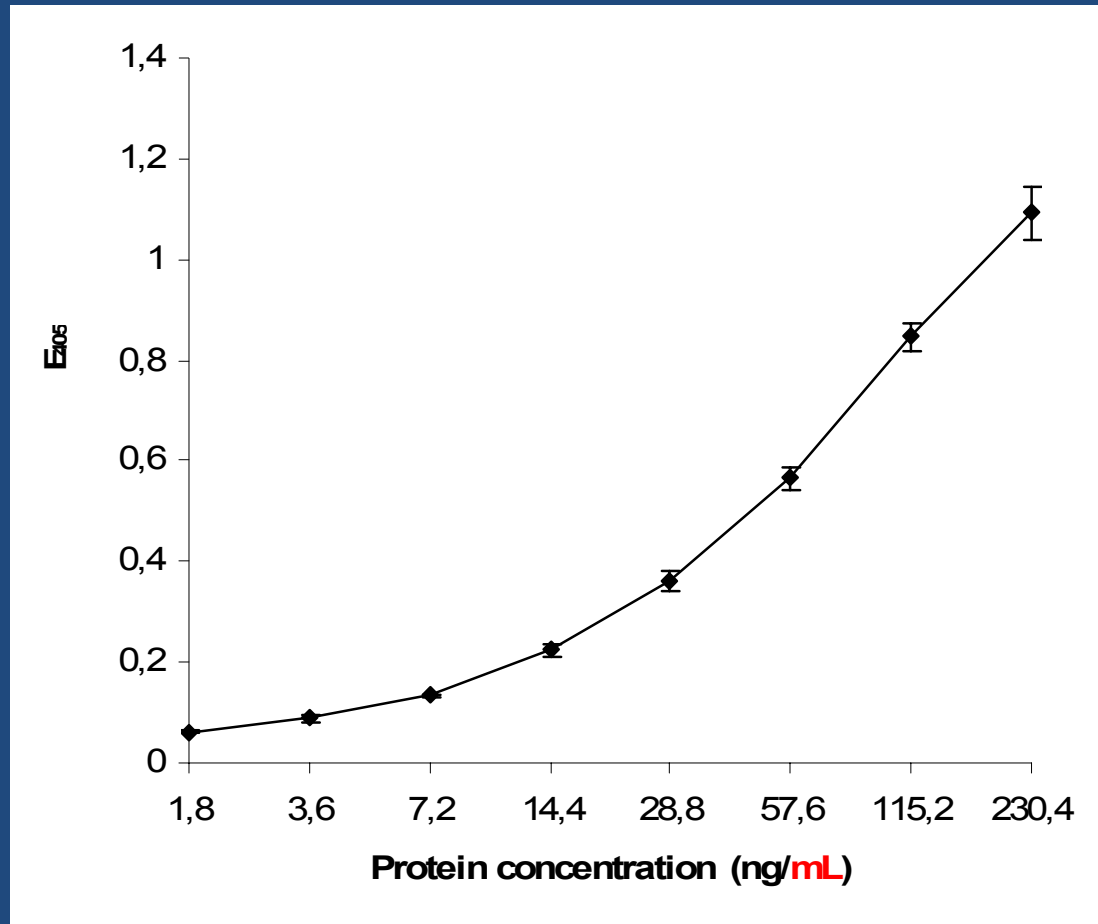
4- Résultats

Dilutions									
	1:500			1:1000			1:2000		
IgG	A	I	H	A	I	H	A	I	H
848/3	1,16	1,24	0,12	0,97	0,83	0,07	0,52	0,42	0,05
848/4	0,70	1,20	0,23	0,41	0,62	0,09	0,20	0,31	0,04
850/ 3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
850/4	0,48	0,13	0,0 3	0,35	0,07	0,02	0,21	0,06	0,03

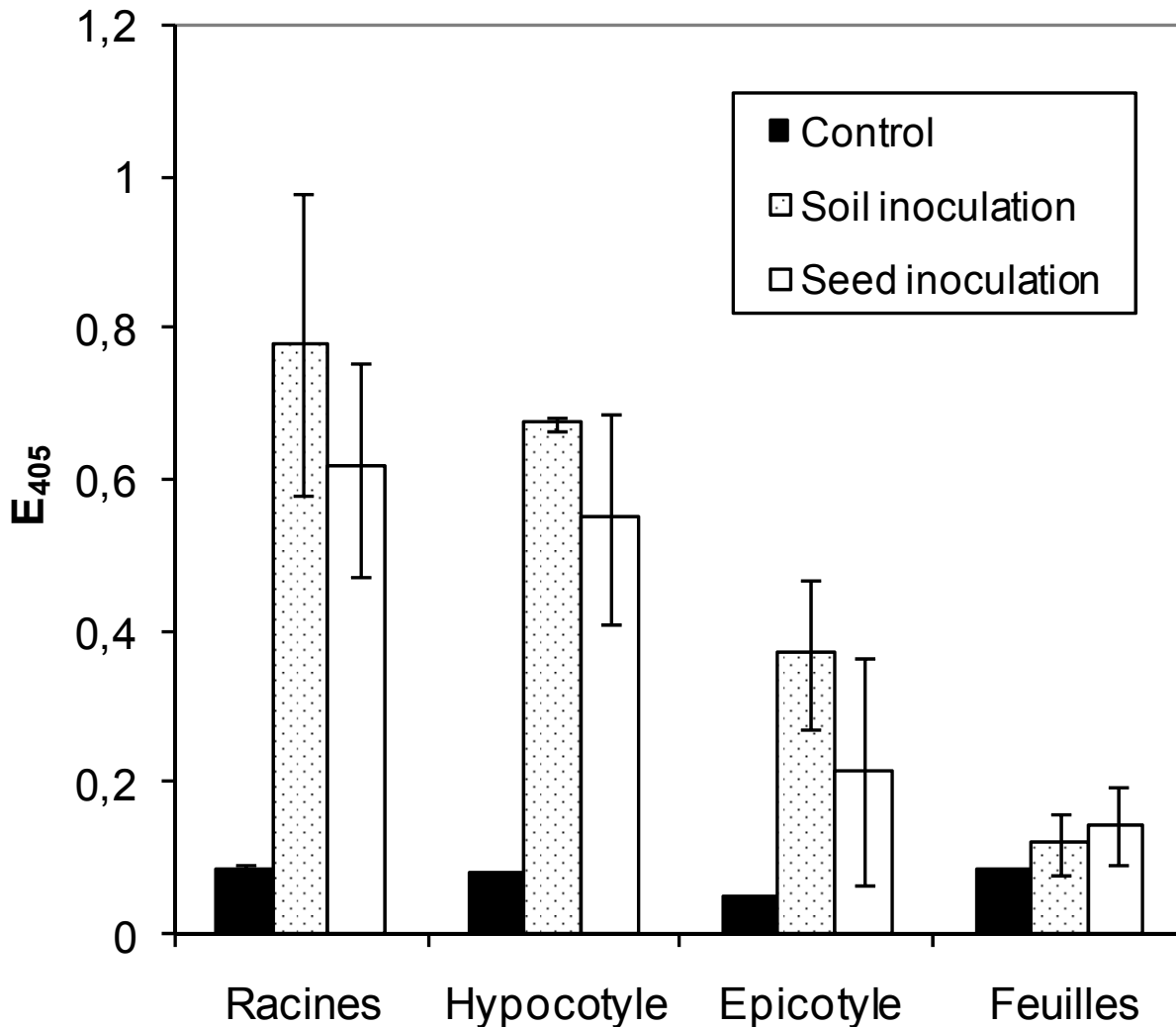
valeurs ELISA d'extraits mycéliens de *M. phaseolina* (A), de tiges infectées par *M. phaseolina* (I) et de plantes saines (H) testés par les anticorps développés



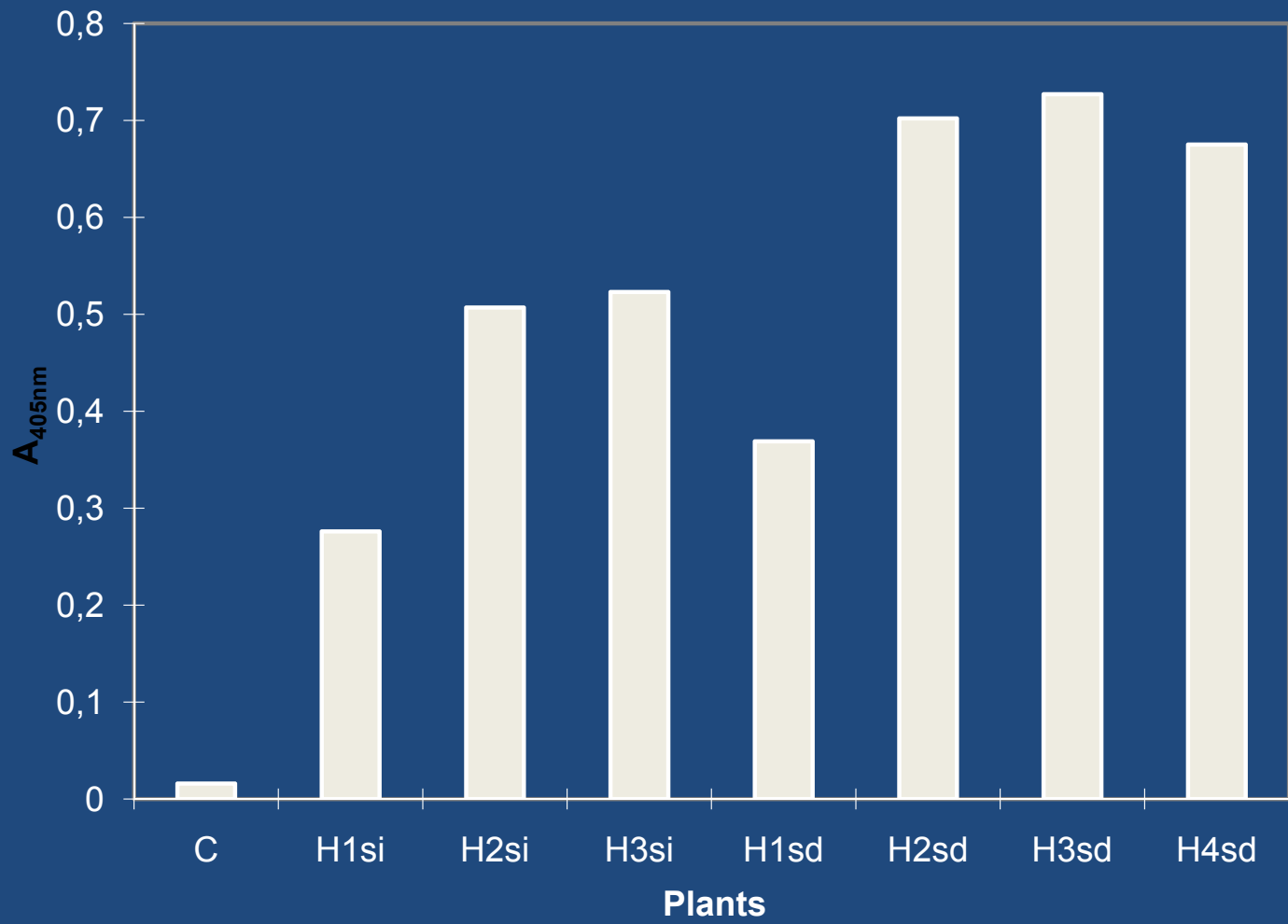
Spécificité des anticorps développés



Sensibilité de l'anticorps 848/3 testé avec différentes concentrations protéiniques, de Mycélium de *M. phaseolina*



Distribution de *M. phaseolina* dans les organes de plantes de niébé après inoculation des semences ou du sol par le champignon



Infection latente de *M. phaseolina*

Niveaux d'infection de différents lots de semences testés par les méthodes sur agar et ELISA

Origin	% infection testé par	
	Méthode agar	ELISA
Semences du marché	7	13
Semences du marché (suspectés) ¹	92	100
Semences du marché (Maradi)	23	47
TN 5-78 (Niger-station de recherche)	2	0
IT93K-734 (IITA- Nigeria)	0	0

Evaluation de l'effet du traitement des semences avec *Bacillus subtilis* A11 sur *M. phaseolina* par la méthode ELISA

Treatment	Disease incidence (in %)	Fresh weight (in g)	E ₄₀₅ ± SD
<i>B. subtilis</i>			
A11	12	53.4	0.24±0.08
K+	74	25.4	0.74±0.09
K-	0	51.5	0.11±0.03

Conclusion

- Développement d'anticorps spécifiques et sensibles pour la détection de *M. phaseolina*
- Quantification de *M. phaseolina* à l'intérieur d'une plante infectée
- Détection de *M. phaseolina* dans les semences (quarantaine)
- Evaluation de l'effet des antagonistes pour une lutte intégrée contre *M. phaseolina*

Merci de votre aimable attention