

ANALYSE PAR ELISA ET IMMUNOCAPTURE-RT-PCR DES VIRUS ASSOCIES A LA JAUNISSE NANISANTE DE L'ORGE (BYD) SUR BLE TENDRE

Reçu le 01/12/1999 – Accepté le 20/05/2002

Résumé

L'étude épidémiologique, menée sur blé tendre var HD 1220 en 1998 dans la région de Blida, a montré que l'incidence de la jaunisse nanisante de l'orge (BYD) est de 27,23%. Les résultats du test DAS et TAS-ELISA ont montré l'abondance de l'infection simple du BYDV-PAV (28%), BYDV MAV (25%), CYDV-RPV (14%) et RMV (13%). Les infections mixtes sont représentées le plus souvent en infection double (BYDV PAV + BYDV MAV (11,22%), suivie de BYDV-PAV + CYDV RPV (3,74%), BYDV MAV + CYDV-RPV (1,87%), BYDV-MAV + CYDV-RPV, BYDV-PAV + RMV, BYDV MAV + RMV et BYDV-PAV + SGV (0,93%) chacune. L'infection triple est représentée par BYDV-PAV + BYDV-MAV + CYDV-RPV (3,74%). Les analyses de l'immunocapture - RT - PCR ont révélé la présence de 7 isolats de BYDV-PAV profil de type A et 5 isolats de BYDV-PAV profil de type B. L'analyse de la variabilité biologique a montré que le BYDV-PAV A est agressif sur orge cv Plaisant par rapport au BYDV-PAV B. Sur avoine cv Coast Black, le RMV induit des symptômes typiques de BYD.

Mots clés: Luteovirus, virus associés au BYD, céréales, épidémiologie, puceron vecteur de virus.

Abstract

Study of epidemiology conducted on bread wheat HD 1220 in Blida region in 1998, shown that the incidence of BYDV was 27.23%. The ELISA results shown that the simple infection was prevalent particularly by BYDV-PAV (28%), followed by BYDV-MAV (25%), CYDV-RPV (14%), RMV (13%). But the mixtes infections were represented often by the double infection BYDV-MAV + BYDV-PAV (11.22%), BYDV-PAV + CYDV-RPV (3.74%), BYDV-MAV + CYDV-RPV (1.87%), BYDV PAV + RMV, BYDV-MAV + RMV, BYDV-PAV + SGV (0.93%). The triple infection was represented by BYDV-PAV + CYDV-RPV + BYDV-MAV (3.74%). The analyses of immunocapture - RT - PCR were revealed 7 isolats of BYDV-PAV type A and 5 isolats of BYDV-PAV type B. The biological variability shown that BYD-PAV A was severe in barley cv Plaisant than BYDV-PAV B. In oat cv Coast Black BYD-like symptoms was observed by RMV.

Key words: Luteovirus, viruses associated to BYD, cereals, epidemiology, aphids virus vector.

H. BELKAHLA

Université de Blida
Institut d'Agronomie
Laboratoire de Virologie
BP.270 Blida, Algérie

H. LAPIERRE

I.N.R.A.
Station de Pathologie Végétale
Route de Saint
78026 Versailles, France

ملخص

إن دراسة انتشار العدوى المجرات على زراعة القمح اللين HD 1220 في منطقة البلدية 1998، بينت أن نسبة الإصابة بمرض اصفرار التقرمي للشعير (BYD) قدرت بـ 27.23%. أن نتائج التحليل بـ ELISA قد بين ان توزيع نسب هذه الفيروسات مختلف، حيث لوحظ أن الإصابة الأحادية كانت السائدة ممثلة بـ: BYDV-PAV (28%) متبوع بـ BYDV-MAV (25%)، RMV (13%)، CYDV-RPV (14%)، الإصابة الزوجية كانت ممثلة بـ BYDV-PAV + BYDV-MAV (11.22%)، BYDV-PAV + CYDV-RPV (3.74%)، BYDV-MAV + CYDV-RPV (1.87%)، BYDV-PAV + RMV، BYDV-MAV + RMV، BYDV-PAV + SGV (0.93%) الإصابة الثلاثية تمثلت بـ BYDV-PAV + BYDV-MAV + CYDV-RPV (3.74%). النتائج المتحصل عليها من إختبار PCR قد ثبتت وجود 7 عوازل BYDV-PAV A و 5 عوازل BYDV-PAV B. الكلمات المفتاحية: القمح، مرض اصفرار التقرمي للشعير، إصابة.

La jaunisse nanisante de l'orge est une maladie agronomiquement importante sur les cultures de céréales dans le monde. Les dégâts cultures de céréales dans le monde. Les dégâts causés par ces virus varient suivant l'année, la localisation géographique et les plantes hôtes. Cette maladie peut causer des baisses de rendements importants sur les céréales à paille [1]. En Algérie, la jaunisse nanisante de l'orge a été signalée par Benbelkacem [2] et Makkouk et al. [3]. La présence du BYDV-PAV, BYDV-MAV et du CYDV-RPV a été rapportée par El-Yamani et al. [4]. La maladie est principalement causée par une infection simple ou mixte par le BYDV-PAV, BYDV-MAV et le CYDV-RPV, mais le BYDV-PAV est le plus souvent dominant [5-7]. L'infection primaire des virus associés au BYD sur les semis d'automne de céréales est très dommageable et est principalement associée aux vols des pucerons ailées virulifères de *R. padi*, vecteurs de virus.

L'objectif de ce travail est de surveiller les contaminations primaires par les tests de détection sur des plants de blé tendre extériorisant des symptômes de type jaunisse nanisante de l'orge et par les tests de transmission sur les pucerons ailés prélevés sur ces même plants.

MATERIELS ET METHODES

Etude épidémiologique du BYD

Afin d'estimer l'impact probable de l'infection primaire sur les semis automnaux et de calculer chaque semaine l'indice d'infectivité proposé par Plumb, (1983, 1995), Plumb et al. (1982), un essai épidémiologique

sur blé tendre cv HD 1220 a été mené à la station expérimentale de l'institut d'Agronomie de Blida en 1998.

TERRAIN EXPERIMENTAL

Le terrain expérimental se compose 7 parcelles non espacées entre elles, de dimensions 30m x 15m. La superficie totale des 7 parcelles est de 3150 m². Le terrain expérimental est limitée à l'ouest par un verger et au sud-est et au nord par des pâturages.

Observations et prélèvements d'échantillons

Les observations ont commencé au stade fin de tallage. La progression de l'épidémie a été suivie en observant régulièrement -tous les 3 jours- les plants présentant:

*des symptômes de type BYD qui sont des rougissements et enroulements des feuilles,

*des pucerons vecteurs du BYD qui sont *R. padi*, *R. maidis*, *S. avenae*, *S. fragariae*, *Schizaphis graminum*.

Les notations visuelles sont confirmées toutes les semaines par des contrôles TAS-ELISA vis-à-vis du *BYDV-PAV*, *BYDV-MAV*, *CYDV-RPV* et DAS-ELISA vis-à-vis du *RMV*, *SGV*. Des prélèvements hebdomadaires de 70 plants (10 plants par parcelle) ont été effectués du stade tallage-début montaison jusqu'au stade épiaison correspondant ainsi à 8 semaines de prélèvement. Le nombre total d'échantillons prélevés est de 560.

Tests immunoenzymatiques

Pour la détection des virus associés au BYD, nous avons utilisé la méthode directe DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich) et TAS-ELISA (Triple Antibody Sandwich) avec des antisérum polyclonaux et monoclonaux, afin d'étudier les différents sérotypes et les relations entre les souches des virus associés au BYD [8,9].

DAS-ELISA

Les virus présents dans l'extrait de la plante à tester réagissent avec les anticorps polyclonaux (AcsPCx) : *BYDV-PAV*, *BYDV-MAV*, *CYDV-RPV*, *RMV* et *SGV*. Ils sont dilués au 1/1000^{ième} et fixés sur la plaque de microtitration. Les virus sont ensuite mis en contact avec une préparation d'AcsPCx couplée à l'enzyme phosphatase alcaline à une dilution de 1/2000^{ième}. La double réaction sérologique est mise en évidence par la réaction du substrat de l'enzyme le paranitrophényl phosphate (1mg/ml), ce qui conduit à une réaction colorée dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'antigène fixée. La lecture des densités optiques s'effectue à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 405 nm. Les témoins sains utilisés sont des plants d'orge cv Plaisant. Les échantillons sont considérés positifs lorsque la valeur de la densité optique (DO) est 3 fois supérieure à celle du témoin sain.

TAS-ELISA

Le virus est capté par les anticorps monoclonaux (AcsMCx) spécifiques (P2, P14, M2, PM63 et MAC 91) dilués au 1/10^{ième}. Ces derniers sont mis en évidence par l'anticorps anti-gamma globuline de souris dilué au 1/1000^{ième} pour le *BYDV-PAV* et le *BYDV-MAV* et

l'anticorps anti-gamma globuline de rat dilué au 1/2000^{ième} pour le *CYDV-RPV*.

Immunocapture-reverse transcriptase-polymerase chain reaction (IC-RT-PCR)

Les particules virales extraites des tissus foliaires sont fixées sur une plaque de microtitration préalablement coâtée avec un AcPC *BYDV-PAV* dilué au 1/500^{ième}. Après dépôt de l'inhibiteur de l'enzyme ribonucléase (Rnase), la plaque est soumise à 2 cycles de congélation à -20°C et décongélation au bain-marie à 50°C. Par la suite, l'enzyme transcriptase inverse est utilisée pendant 1h à 42°C en présence d'une amorce indirecte Lu-4 (GTCTACCTATTTGG) correspondant des nucléotides 3455 à 3468 de l'isolat *BYDV-PAV-Vic* [10]. L'amplification est réalisée par addition d'une amorce directe Lu-1 (CCAGTGGTTATGGTC) correspondant du nucléotide 2938 à 2952 de l'isolat *BYDV-PAV-Vic* [10].

L'amplification par PCR se compose d'une étape initiale de dénaturation de 5 min. à 95°C suivie de 35 cycles de 95°C pendant 15 sec, 50°C pendant 30 sec, 72°C pendant 15 min. La polymérisation en chaîne se termine par une étape d'élongation de 10min. à 72°C.

Transmission par aphides

Les pucerons virulifères sont déposés à l'aide d'un pinceau légèrement humecté sur des plants d'orge sain cv Plaisant. Ces derniers sont recouverts de bonnettes et maintenus en chambre climatique à 14°C à une photopériode de 16h. Après 48h d'inoculation (IAP), les pucerons sont retirés et un traitement aphicide est appliqué (Pirimor 0.75g/l). Afin d'éviter l'apparition de champignon au cours de notre essai, un traitement fongique (Galbène 0.75g/l) préventif est effectué chaque semaine.

RESULTATS

Incidence des virus associés au BYD

L'incidence de la jaunisse nanisante de l'orge était de 27,36% (107/391).

Pendant les 8 semaines de prélèvement des échantillons, le *BYDV-PAV* (32 isolats), *BYDV-MAV* (30 isolats), *CYDV-RPV* (22 isolats) et le *RMV* (16 isolats) étaient présents. Le *SGV* était très rare, uniquement 1 seul a été détecté par l'AcPC *SGV* la dernière semaine de prélèvement des échantillons. L'AcMC PM63 a détecté seulement 12 isolats (Tab. 1).

Fréquence des sérotypes du BYD en infection simple

Les résultats du test DAS et TAS-ELISA ont montré l'abondance de l'infection simple du *BYDV-PAV* (28%), *BYDV-MAV* (25%), *CYDV-RPV* (14%) et *RMV* (13%) (Fig.1a).

Fréquence des sérotypes du BYD en infection mixte

Les infections mixtes sont représentées le plus souvent en infection double (*BYDV-PAV* + *BYDV-MAV*), (*BYDV-PAV* + *CYDV-RPV*), (*BYDV-PAV* + *RMV*), (*BYDV-PAV* +

Semaine de végétation	Nb. plants prélevés	Nb. plants testés	Nb. plants positifs	TAS-ELISA			DAS-ELISA			Conclusion
				MC P2 et P14	MC M2	MC PM63	PC RPV	PC RMV	PC SGV	
S1	70	47	14	*	*	*	*	*	0	PAV, MAV, RPV, PAV/MAV
S2	70	41	15	*	*	*	*	*	0	PAV, MAV, RPV, RMV, PAV/MAV
S3	70	52	21	*	*	*	*	*	0	PAV, MAV, RPV, RMV, PAV/MAV
S4	70	70	19	*	*	*	*	*	0	PAV, MAV, RPV, RMV, PAV/MAV
S5	70	65	17	*	*	*	*	*	0	PAV, MAV, RPV, RMV, PAV/MAV
S6	70	55	10	*	*	*	*	*	0	PAV, MAV, RPV, RMV, PAV/MAV
S7	70	21	2	0	0	*	0	0	0	PAV/MAV
S8	70	40	8	*	*	*	*	0	*	PAV, MAV, RPV, SGV, PAV/MAV
Total	560	391	107	32	30	12	22	16	1	

Tableau 1: Résultats de la TAS et DAS-ELISA (D.O. 405 nm) // *: positif; 0: négatif; PAV: *Padi avenae virus*; MAV: *Macrosiphum avenae virus*; RPV: *Rhopalosiphum padi virus*; SGV: *Schizaphis graminum virus*; RMV: *Rhopalosiphum maidis virus*.

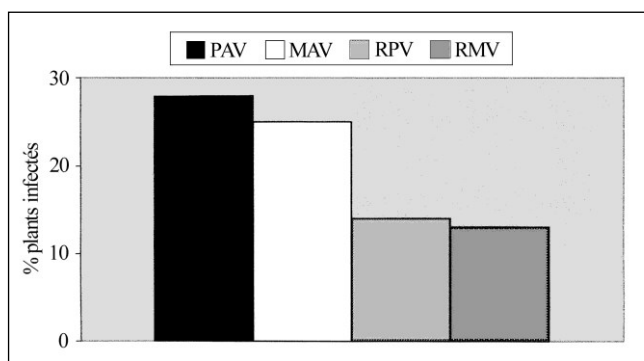


Figure 1a: Fréquences des sérotypes du BYD en infection simple sur blé tendre.

SGV), (*BYDV-MAV+CYDV-RPV*) et (*BYDV-MAV+CYDV-RMV*) et en infection triple (*BYDV-PAV+BYDV-MAV+CYDV-RPV*). En infection double, (*BYDV-PAV+BYDV-MAV*) est dominant avec une fréquence de 11,22%, suivi de (*BYDV-PAV+CYDV-RPV*) 3,74%, (*BYDV-MAV+CYDV-RPV*) 1,87%, alors que (*BYDV-MAV+CYDV-RPV*), (*BYDV-PAV+RMV*), (*BYDV-MAV+RMV*) et (*BYDV-PAV+SGV*) ont enregistré une fréquence de 0,93% chacun. L'infection triple est représentée par (*BYDV-PAV+BYDV-MAV+CYDV-RPV*) avec une fréquence de 3,74% (Fig. 1b).

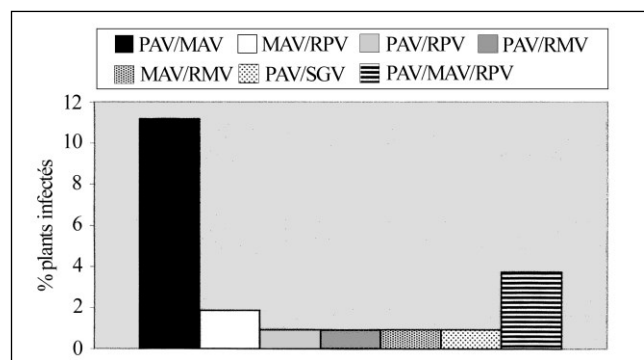


Figure 1b: Fréquences des sérotypes du BYD en infection mixte sur blé tendre.

Variabilité moléculaire des BYDV-PAV

Seuls les échantillons à valeurs de DO très élevée en TAS-ELISA avec les AcMCx P14 et P2 ont été testés en

immunocapture-RT-PCR. Les analyses effectuées sur 12 isolats ont révélé la présence de 5 isolats de *BYDV-PAV* profil de type B et 7 isolats de *BYDV-PAV* profil de type A (Fig. 2).

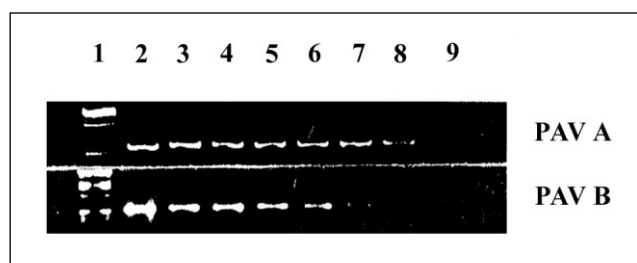


Figure 2: Détection du *BYDV-PAV A* et *PAV B* par IC-RT-PCR sur orge cv Plaisant.

Bande 1: ADN KB marqueur	Bande 1: ADN KB marqueur
Bande 2, 3, 4, 5, 6, 7 PAV A	Bande 2, 3, 4, 5 PAV B
Bande 9: Témoin	Bande 7: Témoin

Variabilité biologique du BYDV-PAV et RMV

Deux semaines après la transmission des virus, les plantes ont extériorisé des symptômes de type BYD. Le symptôme le plus commun est le jaunissement progressif des feuilles sous forme de bandes parallèles à partir de leur extrémité vers la base commençant par les jeunes feuilles vers les plus âgées. Le *BYDV-PAV CpA* provoque des symptômes sévères sur orge cv Plaisant. Les plantes présentent généralement un retard de croissance important ainsi qu'une réduction de l'espace interfoliaire (Fig. 3). Le *BYDV-PAV CpB* provoque des symptômes légers, et sont de type jaunisse modérée (Fig. 4). Sur avoine cv Coast Black, le *RMV* induit des symptômes de rougissement des feuilles, suivi de nanisme et tallage excessifs des plants (Fig. 5).

DISCUSSION

L'étude épidémiologique menée en 1998 a montré la présence des virus associés au BYD avec des fréquences variables des différents sérotypes rencontrés. L'incidence du BYD était de 27,23%. Le *BYDV-PAV* était dominant (28%) suivi respectivement du *BYDV-MAV* (25%), *CYDV-RPV* (14%) et *RMV* (13%). Nos résultats se rapprochent de ceux obtenus dans la région de West Asia and North Africa (WANA), où les virus rencontrés chaque année étaient

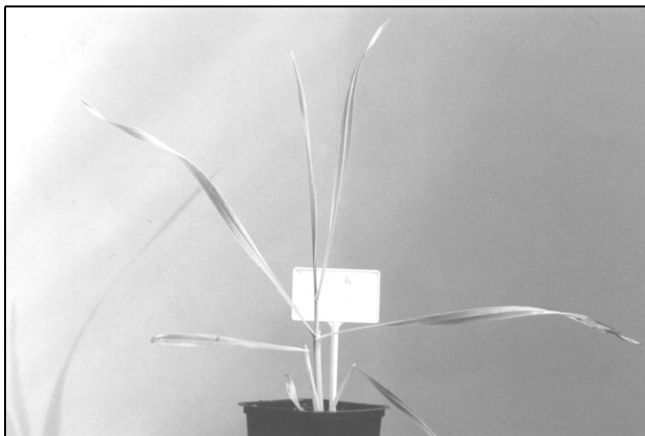


Figure 3: Symptômes provoqués par le *BYDV-PAV CpA* sur orge cv Plaisant.

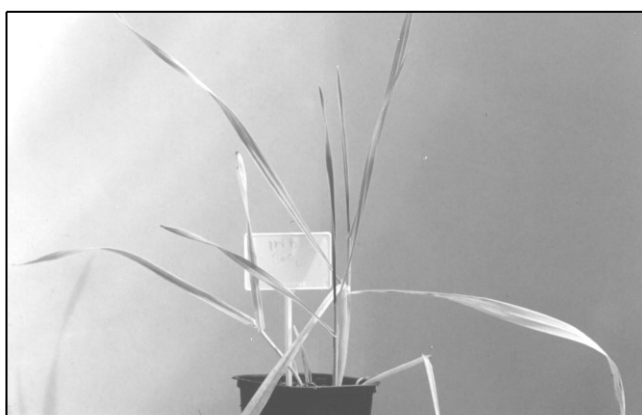


Figure 4: Symptômes provoqués par le *BYDV-PAV CpB* sur orge cv Plaisant.



Figure 5: Symptômes provoqués par le *RMV* sur avoine cv Coast Black.

principalement le *BYDV-PAV*, *BYDV-MAV*, *CYDV-RPV* et *RMV*, avec une fréquence importante du *BYDV-PAV* dans la nature par rapport à celle des autres virus associés au BYD [11, 12]. Nos résultats concordent également avec ceux obtenus en Australie [13,14] en Californie [15] et au Portugal [7]. Les fréquences des infections mixtes sont

faibles. La fréquence du *BYDV-PAV* + *BYDV-MAV* est de 11,43% suivie de *BYDV-PAV* + *BYDV-MAV* + *CYDV-RPV* (3,74%), *BYDV-MAV* + *CYDV-RPV* (1,87%). Le *BYDV-PAV* + *RPV*, *BYDV-PAV* + *RMV*, *BYDV-PAV* + *SGV* et *BYDV-MAV* + *RMV* ont enregistré une fréquence identique de 0,93% chacune. En France et en Grande Bretagne, l'infection mixte est représentée par *BYDV-PAV*+*BYDV-MAV*,*BYDV-PAV* + *BYDV-MAV* + *RPV*,*BYDV-PAV* + *RPV*, *BYDV-MAV* + *CYDV-RPV* [6].

La prédominance du *BYDV-PAV* peut être expliquée par sa large gamme d'hôtes en particulier par rapport à celle du *CYDV-RPV* [16-19] et par sa transmission non spécifique par *R. padi* et occasionnellement par *S. avenae* [17,20]. Des travaux récents ont montré que *S. fragariae* est un vecteur efficace du *BYDV-PAV* [21].

Les résultats de l'immunocapture-RT-PCR ont montré une variabilité entre les 12 isolats du *BYDV-PAV*. Ainsi, les isolats ont été répartis en 2 types : *BYDV-PAV* profil de type A (7 isolats) et *BYDV-PAV* de type B (5 isolats), avec une prédominance des *BYDV-PAV* de type A.

L'analyse de la variabilité biologique a montré que les *BYDV-PAV CpA* extériorisent des symptômes, de type jaunisse, forts, alors que ceux des *BYDV-PAV CpB* sont faibles. Les symptômes du *RMV* sur avoine Coast Black sont des rougissements.

Remerciements

Nous remercions Mmes MASTARI Jamila, LEBRUN Isabelle et BEUVE Monique pour leur aide dans les expériences de biologie moléculaire. Que le personnel de la station expérimentale de l'Institut d'Agronomie de Blida, ainsi que celui de la serre de pathologie de Versailles, soit vivement remercié pour sa disponibilité et surtout son aide pour la réalisation de ce travail.

REFERENCES

- [1]- D'arcy C.J. and Burnett P.A. (1995). Barley yellow dwarf virus: A brief introduction. Pages 1-5 in Barley yellow dwarf. Forty years of progress. D'Arcy C.A. and P.A. Burnett, eds.1995. St Paul APS Press. Minn. 374 pp
- [2]- Benbelkacem A. (1991). The BYDV situation in Algeria: 1-2. In Barley yellow dwarf virus Newsletter N° 4. CIMMYT, Mexico, D.F., Mexico. 511 p.
- [3]- Makkouk K.M., Azzam O., Skaf J., El-Yamani M., Chérif C. and Zouba A. (1990). Situation review of barley yellow dwarf virus in West Asia and North Africa. Pages 61-70 in World perspectives on barley yellow dwarf. Burnett P.A. eds., CIMMYT, Mexico DF 511 p.
- [4]- El-Yamani M. and Bencharki B. (1996). La jaunisse nanisante de l'orge: Caractérisation et épidémiologie au Maghreb. Pages 63-68 in Proc. Symp. Régional maladies des céréales et des légumineuses alimentaires. Rabat, Maroc. 370 p.
- [5]- El-Yamani M. and Hill J.H. (1992). Characterization of grass hosts and epidemiology of barley yellow dwarf virus isolates in west central Morocco. *Phytopathol. Medit.* 31: 163-169.
- [6]- Henry M., Georges S., Arnold G.M., Dedryver C.A., Kendall D.A., Robert Y. and Smith B.D. (1993). Occurrence of barley yellow dwarf virus (BYDV) isolates in different farmland habitats in western France and south-west England. *Ann. Appl. Biol.*123: 315-359.
- [7]- Pereira A.M.N. (1993). Epidemiology of barley yellow dwarf virus in Portugal. *Phytopathol. Medit.*32: 211-222.

- [8]- Martin R.R. and D'arcy C.J. (1990). Relationships among luteoviruses based on nucleic acid hybridation and serological studies. *Intervirol* 31: 23-30.
- [9]- Rochow W.F. and Duffus J.E. (1981). Luteoviruses and yellows diseases: 147-170. In *Handbook of plant infections comparative diagnosis*. Kurstak E. eds., Elsevier, Nord Holland, Amsterdam. Biomed Press. 443 p.
- [10]- Robertson N.L., Roy F. and Gray S.M. (1991). Use of group-specific primers and the polymerase chain reaction for the detection and identification of luteovirus. *J. Gen. Virol.* 72: 1473-1477.
- [11]- El-Yamani M. and Hill J.H. (1990). Identification and importance of barley yellow dwarf virus (BYDV) in Morocco. *Plant Dis.* 74: 291-294.
- [12]- El-Yamani M., Makkouk K.M., Hafidi B. and El-Kacemi K. (1992). Contribution to the study of barley yellow dwarf virus in the Souss-Massa, region of Morocco. *Phytopathol. Medit.* 32: 41-45.
- [13]- Ealling D.R., Cunningham P.J., Sward R.J. and Halloran G.M. (1989). The incidence of barley yellow dwarf virus isolates in perennial ryegrass (*Lolium perenne*) in the south-western Victoria. *Plant Pathol.* 38: 403-413.
- [14]- Guy P.L., Johnston G.R. and Morris D.I. 1987. Barley yellow dwarf virus in, aphids on, grasses (including cereals) in Tasmania. *Aust. J. Agri. Res.* 38: 139-152.
- [15]- Gildow F.E. and Rochow W.F. (1983). Barley yellow dwarf in California: Vector competence and luteovirus identification. *Plant Dis.* 67: 140-143.
- [16]- Belkahla H. and Lapierre H. (1999a). Serodetection of viruses associated to barley yellow dwarf (BYD) on cereals in Algeria. *Phytoprotection* 80 (3) : 169-177.
- [17]- Beuve M. and Lapierre H. (1992). Resistance to RPV barley yellow dwarf virus in genus *Bromus*. *Can. J. Bot.* 70: 32-37.
- [18]- Beuve M. and Lapierre H. 1993 Résistance spécifique du maïs (*Zea mays* L.) au BYDV-RPV, un virus de la jaunisse nanisante de l'orge. *C.R. acad. Sci. Paris, t.316, Série III*: 275-280.
- [19]- D'arcy C.J. (1995). Symptomatology and host range of barley yellow dwarf. Pages 9-28 in *Barley yellow dwarf. Forty years of progress*. D'Arcy C.A. and P.A. Burnett, eds. 1995. St Paul APS Press. Minn. 374 pp
- [20]- Guo J.Q. (1995). Transmission par pucerons des luteovirus de la jaunisse nanisante de l'orge (JNO): étude de l'interaction virus-aphide à l'estimation du risque épidémique. *Th. Doc. ès. Sciences. Univ. Paris XI Orsay*, 173 p.
- [21]- Belkahla H. and Lapierre H. (1999b). Efficacité de la transmission des virus associés à la jaunisse nanisante (BYD) par *Sitobion fragariae* Walk. *Can J. Phytopathol.* 37(4) : 158-170. □