



LPRC

Laboratoire de Phytovirologie des Régions Chaudes

CIRAD

IRD

## Rapport de stage

22 Février – 19 Mars 1999

Acquisition des techniques d'indexation virologique  
et des techniques de cryoconservation d'apex  
par encapsulation/déshydratation  
chez l'Igname (*Dioscorea* spp.).

Dans le cadre du projet AUPELF/UREF :

Recherches pour l'éradication du virus de la mosaïque de l'igname (YMV) chez l'igname de Pilimpikou au Burkina Faso, et étude de l'environnement virologique des formes sauvages au Bénin et au Togo (*D. praehensilis*, *D. abyssinica*).

Par

**Bonaventure C. Ahohuendo**

Faculté Sciences Agronomiques (FSA)

Université Nationale du Bénin (UNB)

République du Bénin

### Responsables de stage :

*Culture in vitro & cryoconservation*  
*Indexation virologique*

**B. Malaurie**

**M. Bousalem**

GeneTrop, Unité GAP

LPRC /CIRAD

IRD, Montpellier

IRD, Montpellier



## **1. Introduction**

L'igname (*Dioscorea* sp) est une liane rattachée aux monocotylédones dont les organes de réserve, des tubercules souterrains, constituent une importante source alimentaire pour des dizaines de millions d'hommes dans le monde et principalement en Afrique Intertropicale (Coursey et Martin, 1970). Sa production, aujourd'hui dans le monde, est en constante augmentation (FAO, 1996). Au Bénin, la production de l'igname vient après celle du manioc, soit 1 440 800 tonnes contre 1 503 000 tonnes pour le manioc en 1996/97 ; les tubercules sont consommés sous diverses formes : tubercules frais, cossettes, etc.

Sa culture, pratiquée depuis les temps anciens, se fait à partir des fragments de tubercules qui proviennent d'une domestication très ancienne. Des informations récentes en provenance de la Côte d'Ivoire (Hamon *et al.*, 1992) et du Bénin (Dumont, 1997) montrent que la domestication d'espèces spontanées est encore pratiquée de nos jours.

La majorité des cultivars du Bénin proviennent de deux espèces sauvages observées le plus souvent en sympatrie : *D. abyssinica* et *D. praezensilis*. La première espèce se rencontre au nord dans les savanes arborées de plaines ou de collines et la deuxième dans les forêts galeries du sud.

Les enquêtes récentes de Dumont (1997) ont montré que les paysans continuent la domestication des ignames spontanées des deux espèces sauvages, et les clones issus de cette domestication sont ajoutés aux clones habituellement cultivés par le paysan.

On peut tirer deux conséquences de cette pratique traditionnelle de la domestication des formes sauvages : la possibilité d'avoir un stock de génotypes bien plus larges et plus intéressants puisque les deux espèces se multiplient essentiellement par voie sexuée et la possibilité d'avoir des génotypes particulièrement intéressants pour leur comportement vis-à-vis des parasites.

## **2. Objectif et cadre des travaux.**

Les maladies et les insectes constituent des obstacles majeurs à une meilleure intégration de l'igname dans un système moderne d'agriculture en Afrique. Du fait de leur mode de multiplication, les variétés cultivées d'ignames sont particulièrement sujettes aux infections virales dont la plus dommageable à la culture de l'igname en Afrique est la mosaïque due à un potyvirus (YMV). Cette maladie cause d'importantes chutes de rendement (Thouvenel et Dumont, 1990).

Eu égard à tout ce qui précède et pour comprendre les raisons d'une pratique continue de la domestication des ignames spontanées, une étude sur les conditions de développement de ces formes spontanées et des conditions phytosanitaires qui prévalent dans ces zones où se trouvent ces ignames s'avère nécessaire. Cette étude contribuerait à une identification des différents virus présents dans les ignames spontanées, à une étude de la réaction de ces espèces et des relations éventuelles entre les viroses de ces ignames spontanées et celles des ignames cultivées. La maîtrise des outils de diagnostic virologique de routine constitue également un préalable pour cette étude.

Les objectifs des présents travaux sont :

- la familiarisation avec les nouvelles techniques d'indexation virologique (immunocapture rt/PCR) et les techniques de culture *in vitro*.
- l'évaluation de la situation phytosanitaire de deux espèces d'ignames spontanées *D. praezensilis* et *D. abyssinica*. Ceci permettra d'évaluer leur comportement lors du passage au stade cultivé et de mettre au point des techniques de sanitation appropriées.

Les travaux se sont déroulés dans le cadre d'un programme initié par l'IRD en collaboration avec l'AUPEL-UREF, Réseau Biotechnologies végétales : amélioration des plantes et sécurité alimentaire, action N° 1.10.03.01.3/97.35.3.

### **3. Matériel et méthodes.**

#### **3.1. Matériel.**

##### **- Matériel végétal.**

Le matériel végétal utilisé dans le cadre des activités virologiques provient essentiellement d'une collecte réalisée dans les forêts du nord Bénin entre 1.20046° et 2.69963° latitude Est et 8.90266° et 10.30674° longitude Nord. Cinquante cinq tubercules de *D. abyssinica* et quatre tubercules de *D. praezensilis* ont été prélevés à cette occasion (Tableau 1).

Dix-huit ignames spontanées et cultivées provenant de la collection d'ignames qui se trouve à la Station de Recherche de l'Institut International d'Agronomie Tropicale (IITA) de Cotonou ont été également testés.

Afin de disposer du matériel sain et infecté pour les activités de culture *in vitro*, le matériel végétal utilisé provient des serres du CIRAD/Montpellier. Il s'agit de onze (11) génotypes sains de *D. trifida* : Site (1) Saul ; MP (Sophie) ; E6 ; Elae 4 ; S8 ; S10 ; S17 ; Dumput ; S14 ; Kleber ; Guyane Balata et d'un (1) génotype (C6) virosé de *D. cayenensis* : « Igame de Pilimpikou ».

##### **- Les anticorps.**

- Les antiséras utilisés pour le test ELISA sont :

anticorps monoclonal potyvirus universel

anticorps anti-souris pour potyvirus conjugué à la phosphatase alcaline.

- Pour réaliser l'amplification enzymatique, l'immunocapture a été effectuée à l'aide d'anticorps monoclonaux Mab 351. La transcription reverse et l'amplification ont été réalisées avec une transcriptase reverse AMVRTase Pharmacia, une DNA polymérase Hi Taq biotrob et deux amorces YMV poly 1 et YMV poly 2.

#### **3.2. Méthodologie.**

Pour la détermination des virus, deux tests sérologiques ont été réalisés. Il s'agit :

- du test ACP ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) Potyvirus
- de l'Amplification Enzymatique *in vitro* (PCR).

Le test ELISA (Clark & Adams, 1977) est un test immunoenzymatique classique utilisé pour détecter les particules virales chez les végétaux. Plusieurs variantes de ce test existent. Celle utilisée pour la réalisation de cette étude est l'ACP ELISA Potyvirus. La procédure utilisée est celle standardisée au LPRC/CIRAD/Montpellier (cf. Annexe 1). Le Laboratoire de Biologie Végétale à l'Université Nationale du Bénin, Cotonou (Bénin) dispose déjà de l'équipement nécessaire et est à même de réaliser ce test si quelques compléments de petit matériel et de produits chimiques sont disponibles.

L'amplification enzymatique *in vitro* (PCR) a été réalisée pour déterminer la présence du virus de la mosaïque des ignames YMV. Le protocole utilisé a été mis au point au LPRC/CIRAD/Montpellier (cf. Annexe 2). Sous peu l'équipement nécessaire à la réalisation de ce test sera disponible au Laboratoire de Biologie Végétale à Cotonou, mais il faudra des compléments de produits nécessaires. Le coût de mise en œuvre de la PCR est plus élevé que dans le cas de l'ELISA, mais il est beaucoup plus sensible que ce dernier.



**Tableau I** : Répartition des échantillons de tubercules de *D. praezensilis* et *D. abyssinica* récoltés.

Village	Longitude Est	Latitude Nord	N° Echantillon	Nbre tubercules
Tchaourou	2,56602	8,90266	1210- 1211	2
Tchaourou	2,50131	8,90888	1212	1
Goro	2,46338	8,97824	1213- 1214	2
Goro	2,34489	9,08294	1215 à 1217	3
Oubérou	2,23188	9,20869	1218- 1219	2
Oubérou	2,18317	9,28553	1220 à 1223	4
Gorobani	2,00879	9,47880	1224- 1225	2
Sérou	1,69979	9,66634	1226- 1227	2
Kota	1,43536	10,21461	1228	1
Kota	1,43757	10,21297	1229 à 1234	6
Koussoukouingou	1,20046	10,17454	1235 à 1246	12
Koussoukouingou	1,82424	10,27166	1248	1
Péhunco	1,91573	10,24979	1249 à 1252	4
Tobré	2,16400	10,17536	1253 à 1259	7
Tobré	2,38832	10,30674	1260 à 1263	4
Tobré	2,51648	10,04269	1265- 1266	2
N'Dali	2,69963	9,77000	1267 à 1270	4

- **Mise en culture *in vitro* du matériel végétal.**

Six boutures uninodales à partir de chaque cultivar de *D. trifida* (cf. 3.1.) ont été désinfectées sous une hotte à flux laminaire dans du chlorure mercurique à 1% pendant 3 minutes. La désinfection est suivie de trois rinçages à l'eau distillée stérilisée (Maurie *et al.*, 1993) et la culture des boutures a été effectuée dans des tubes à essai sur le milieu de culture 2GG (sans charbon actif).

- **Conservation à long terme par cryoconservation dans de l'azote liquide à -196°C.**

La technique de cryoconservation utilisée pour l'igname est l'encapsulation/déshydratation décrite pour la première fois par Dereuddre *et al.* (1990) sur des apex caulinaires de poirier. Le protocole expérimental utilisé lors du stage est celui de Maurie *et al.* (1998) adapté aux apex d'ignames. Sous une hotte à flux laminaire et à partir de trois bocal contenant respectivement 48, 44 et 41 microboutures du cultivar 'Igname de Pilimpikou' virosé (C6), les apex ont été excisés. De ces microboutures 40, 40 et 32 apex ont été obtenus. Les apex ainsi excisés sont transférés immédiatement dans des boîtes de Petri contenant un milieu de préconditionnement MS50- 'MS standard medium contenant 5% de sucrose' (Maurie *et al.*, 1998b). Après une nuit en une chambre de culture, le matériel excisé, soit 107 apex, a été encapsulé dans une solution d'alginate et la polymérisation a lieu après transfert dans une solution de chlorure de calcium. Ensuite, les apex encapsulés sont prétraités dans 30 ml d'une solution de saccharose à 0,9 M et 1,0 M comme l'indique le tableau 3 ci-dessous (Maurie *et al.*, 1998c) puis agités à 90 rpm pendant 7 jours dans une chambre de culture.

**Tableau 2 : Protocole expérimental pour la conservation à long terme des apex excisés par la cryoconservation .**

	Cryo 0,9 M	Témoins	Nbre erlen	Cryo 1,0 M	Témoins	Nbre erlen
8 H	10	7	1	10	7	1
18 H	10	8	1	10	8	1
23 H	10	8	1	10	8	1

Après le prétraitement au saccharose, le poids des apex encapsulés a été mesuré suivi d'une dessiccation dans un bocal contenant du silicagel pendant 8h, 18h et 23h en vue de l'obtention du poids frais à  $t_0$  du matériel végétal encapsulé. Après la dessiccation, dix billes contenant les apex de chaque traitement de dessiccation (8h ; 18h ; 23h) sont mises dans de petits tubes puis placées dans l'azote liquide pendant au moins deux heures et dans certains cas pendant une nuit. Après ce traitement à l'azote liquide à  $-196^{\circ}\text{C}$ , les billes de chaque traitement sont reprises et mises en culture dans des boîtes de Pétri contenant un milieu de reprise (4-50) contenant des régulateurs de croissance (Malaurie *et al.* 1998).

Le reste des billes, soit :

7 billes témoins pour chaque prétraitement saccharose (0,9 M ; 1 M) pour le traitement de 8h

8 billes témoins pour chaque prétraitement saccharose (0,9 M ; 1M) pour le traitement de 18h

8 billes témoins pour chaque prétraitement saccharose (0,9 M ; 1M) pour le traitement de 23h,  
est mis également en culture sur le milieu de reprise (4-50).

#### 4- Résultats et discussions.

##### - Concernant les activités virologiques.

Les résultats des tests ELISA sont consignés dans les tableaux 3 ; 4 et 5 ci-dessous et ceux de la PCR sont consignés dans le tableau 4. Pour les tests ELISA, les densités optiques (DO) considérées sont celles obtenues 24 heures après l'application du substrat.

Le tableau 3 présente les résultats des tests ELISA réalisés sur 48 échantillons d'ignames sauvages dont 45 échantillons de *D. praehensilis* et 3 de *D. abyssinica*. Ces tests ont été entrepris pour détecter la présence de potyvirus universels dans les échantillons. Il ressort de l'analyse de ce tableau qu'aucun échantillon de *D. praehensilis* n'a montré la présence de potyvirus puisque toutes les valeurs des DO obtenues ont été en dessous de la limite requise (ici  $\text{DO} = 0,1$ ) pour être considérées comme positives. Par contre sur un total de 45 échantillons de *D. abyssinica*, 8 échantillons ont été testés positifs quant à la présence de potyvirus, soit environ 17% du total des *D. abyssinica*, avec 2 % des échantillons montrant une très forte infection de la virose (++++); 2% des échantillons montrant une assez forte infection ; 11% avec une infection moyenne et finalement 2% qui montre la présence du virus, mais avec une valeur de la DO suffisamment proche de la valeur limite requise. Les résultats obtenus avec les *D. praehensilis* confirment ceux déjà obtenus par Bousalem (communication personnelle) qui n'a décelé aucune présence de potyvirus après un test ELISA à l'aide d'anticorps potyvirus universel sur une cinquantaine d'échantillons de *D. praehensilis* récoltés au Bénin. Ces résultats montrent par ailleurs le comportement différentiel vis-à-vis des infections virales en zones de forêt des deux espèces de *Dioscorea* spontanées analysées.



**Tableau 3** : Résultats des tests ELISA pour la détection de potyvirus chez deux espèces d'ignames spontanées, *D. praezensilis* et *D. abyssinica* du Bénin.

Echantillon	Espèce	Site de collecte	ELISA <sup>poty</sup> Tubercule	Observations
1211	<i>D. praezensilis</i>	Tchaourou	-	Forêt
1226	<i>D. praezensilis</i>	Sérou	-	Forêt
1227	<i>D. praezensilis</i>	Sérou	-	Forêt
1213	<i>D. abyssinica</i>	Goro	-	Savane
1214	<i>D. abyssinica</i>	Goro	++++	Savane
1215	<i>D. abyssinica</i>	Goro	-	Savane
1216	<i>D. abyssinica</i>	Goro	-	Savane
1217	<i>D. abyssinica</i>	Goro	-	Savane
1218	<i>D. abyssinica</i>	Oubérou	-	Savane
1220	<i>D. abyssinica</i>	Oubérou	-	Savane
1221	<i>D. abyssinica</i>	Oubérou	-	Savane
1222	<i>D. abyssinica</i>	Oubérou	-	Savane
1225	<i>D. abyssinica</i>	Gorobani	-	Savane
1229	<i>D. abyssinica</i>	Kota	-	Savane
1230	<i>D. abyssinica</i>	Kota	-	Savane
1231	<i>D. abyssinica</i>	Kota	-	Savane
1232	<i>D. abyssinica</i>	Kota	-	Savane
1233	<i>D. abyssinica</i>	Kota	-	Savane
1234	<i>D. abyssinica</i>	Kota	-	Savane
1235	<i>D. abyssinica</i>	Koussoukoingou	-	Savane
1236	<i>D. abyssinica</i>	Koussoukoingou	-	Savane
1237	<i>D. abyssinica</i>	Koussoukoingou	-	Savane
1238	<i>D. abyssinica</i>	Koussoukoingou	-	Savane
1239	<i>D. abyssinica</i>	Koussoukoingou	-	Savane
1240	<i>D. abyssinica</i>	Koussoukoingou	-	Savane
1241	<i>D. abyssinica</i>	Koussoukoingou	-	Savane

Légende : DO = 0,1 (+) ; 0,1 < DO ≤ 0,9 (++)  
0,9 < DO ≤ 2 (+++); DO > 2 (++++); - = négatif

**Tableau 3 (Suite)**

Echantillon	Espèce	Site de collecte	ELISA <sup>poty</sup> Tubercule	Observations
1242	<i>D. abyssinica</i>	Koussoukoingou	-	Savane
1243	<i>D. abyssinica</i>	Koussoukoingou	-	Savane
1244	<i>D. abyssinica</i>	Koussoukoingou	-	Savane
1245	<i>D. abyssinica</i>	Koussoukoingou	++	Savane
1246	<i>D. abyssinica</i>	Koussoukoingou	+++	Savane
1247	<i>D. abyssinica</i>	Koussoukoingou	-	Savane
1249	<i>D. abyssinica</i>	Pehunco	-	Savane
1250	<i>D. abyssinica</i>	Pehunco	++	Savane
1251	<i>D. abyssinica</i>	Pehunco	-	Savane
1252	<i>D. abyssinica</i>	Pehunco	++	Savane
1253	<i>D. abyssinica</i>	Tobré	-	Savane
1254	<i>D. abyssinica</i>	Tobré	-	Savane
1255	<i>D. abyssinica</i>	Tobré	-	Savane
1256	<i>D. abyssinica</i>	Tobré	+	Savane
1258	<i>D. abyssinica</i>	Tobré	++	Savane
1259	<i>D. abyssinica</i>	Tobré	-	Savane
1261	<i>D. abyssinica</i>	Tobré	-	Savane
1263	<i>D. abyssinica</i>	Tobré	++	Savane
1265	<i>D. abyssinica</i>	Tobré	-	Savane
1268	<i>D. abyssinica</i>	N'Dali	-	Savane
1269	<i>D. abyssinica</i>	N'Dali	-	Savane
1270	<i>D. abyssinica</i>	N'Dali	-	Savane

Légende : DO = 0,1 (+) ; 0,1 < DO ≤ 0,9 (++)  
0,9 < DO ≤ 2 (+++) DO > 2 (++++) ; - = négatif .

Dans le tableau 4 sont résumés les résultats des tests ELISA et PCR effectués simultanément sur dix échantillons d'ignames spontanées et un échantillon d'igname cultivée. La PCR a été réalisée pour détecter une présence éventuelle de YMV (Yam Mosaic Virus) dans les échantillons testés dans le cas d'une réponse positive des échantillons aux tests ELISA potyvirus universel.

**Tableau 4 : Résultats des tests ELISA<sup>Potyvirus universel</sup> et PCR<sup>YMV</sup> avec 10 échantillons d'ignames spontanées et 1 échantillon d'igname cultivée du Bénin.**

Echantillons	Espèce	Site de collecte	ELISA <sup>poty</sup> Tubercule	PCR <sup>YMV</sup> Tubercule	Observations
1210	<i>D. praeensis</i>	Tchaourou	-	-	Savane
1212	<i>D. abyssinica</i>	Tchaourou	-	-	Savane
1219	<i>D. abyssinica</i>	Oubérou	-	-	Savane
1223	<i>D. abyssinica</i>	Oubérou	-	-	Savane
1224	<i>D. abyssinica</i>	Gorobani	-	-	Savane
1228	<i>D. abyssinica</i>	Kota	-	-	Savane
1257	<i>D. abyssinica</i>	Tobré	-	-	Savane
1262	<i>D. abyssinica</i>	Tobré	-	-	Savane
1266	<i>D. abyssinica</i>	Tobré	++	-	Savane
1267	<i>D. abyssinica</i>	N'Dali	+	-	Savane
Assoura G1	<i>D. cayenensis-rotundatasp</i>	Gorobani	-	-	Cultivé

égende : DO = 0,1 (+) ; 0,1 < DO ≤ 0,9 (++) ;  
,9 < DO ≤ 2 (+++) ; DO > 2 (++++) ; - = négatif

Comme l'indique le tableau 4, seulement deux échantillons de l'espèce *D. abyssinica* sur un total de neuf échantillons pour la même espèce ont réagi positivement au test ELISA potyvirus universel avec une valeur de la DO assez élevée

(++) pour l'un (1266) et faible (+) pour l'autre. Par contre la PCR n'a révélé la présence d'aucun potyvirus chez ces deux échantillons. L'échantillon de *D. praehensilis* et celui de l'igname cultivée Assoura G1 n'ont révélé la présence d'aucun potyvirus. Ces résultats suggèrent que les potyvirus identifiés dans les deux échantillons de *D. praehensilis* diffèrent de celui associé à la mosaïque de l'igname (YMV), puisque les analyses réalisées par PCR pour identifier le virus de la mosaïque de l'igname dans les échantillons se sont avérées vaines chez les deux échantillons positifs au test ELISA potyvirus universel. La procédure de la PCR utilisée IC-RT-PCR et mise au point au LPRC/Montpellier est bien appropriée même pour déterminer de très faibles quantités de potyvirus de la mosaïque de l'igname (Dallot *et al.* 1998, sous presse).

Le tableau 5 présente les résultats des tests ELISA potyvirus universel réalisés avec huit échantillons de *D. praehensilis* et neuf échantillons de *Dioscorea* sp cultivées au Bénin. Les échantillons de *D. praehensilis* sont prélevés sur les parcelles expérimentales de l'Institut International d'Agriculture Tropicale (IITA-Bénin) à Abomey-Calavi.

**Tableau 5 : Détection de potyvirus par ELISA chez des ignames spontanées mises en culture et chez des ignames cultivées.**

Echantillons	Espèce	Site de collecte	latitude N / longitude E	ELISA <sup>poty</sup> Tubercule	Observations
71a	<i>D. praehensilis</i>	Sonoumo		++++	En culture
71k	<i>D. praehensilis</i>	Sonoumo		++++	En culture
71	<i>D. praehensilis</i>	Sonoumo		+++	En culture
183	<i>D. praehensilis</i>	Drahoun	7.34-1.64	++++	En culture
267	<i>D. praehensilis</i>	Pénessoulou	9.24-1.54	++	En culture
S 713	<i>D. praehensilis</i>	Drahoun	7.34-1.64	++	En culture
725a	<i>D. praehensilis</i>	Gougouta	7.41-1.72	++++	En culture
725	<i>D. praehensilis</i>	Gougouta	7.41-1.72	+++	En culture
Assoura G2	<i>D. cayenensis-rotundata</i>	Gorobani		-	Cultivé
Assoura G4	<i>D. cayenensis-rotundata</i> D.	Gorobani		++++	Cultivé
Assoura G7	<i>cayenensis-rotundata</i> D.	Gorobani		++	Cultivé
Assoura S.k	<i>cayenensis-rotundata</i> D.	Gorobani		++	Cultivé
Assoura S.	<i>cayenensis-rotundata</i> D.	Gorobani		++	Cultivé
Kokoro B.	<i>cayenensis-rotundata</i> D.	Oubérou		-	Cultivé
Yanon K.p	<i>cayenensis-rotundata</i>	Koussoukouingou		++	Cultivé
Yanon K.	<i>D. cayenensis-rotundata</i>	Koussoukouingou		++	Cultivé
Yanon	<i>D. cayenensis-rotundata</i>	Koussoukouingou		++	Cultivé

Légende : DO = 0,1 (+) ; 0,1<DO≤0,9 (++) ; 0,9<DO≤2 (+++)  
DO>2 (++++) ; - = négatif ; n.d. = non déterminé

Du tableau 5 il ressort qu'en dehors de deux échantillons d'ignames cultivées, notamment Assoura G2 et Kokoro B qui n'ont montré aucune présence virale, le reste des échantillons a été contaminé par des potyvirus, c'est le cas des échantillons 71a ; 71k ; 183 ; 725a de l'espèce *D. praehensilis* et de l'espèce cultivée Assoura G4 qui sont très



fortement infectés (++++), mais aussi des échantillons 71 et 725a de l'espèce *D. praehensilis* qui ont montré une DO très élevée (+++).

- **Concernant les activités de culture *in vitro* de matériel végétal.**

Les essais sont actuellement en cours à l'IRD/Montpellier (anciennement ORSTOM). Il faut cependant noter qu'à onze jours de la mise en culture, aucune contamination n'a été observée sur l'ensemble du matériel végétal mis en culture.

**Les résultats à quatre mois de leur introduction *in vitro*, des génotypes de *D. trifida* mis en culture,**

Nom génotype	Nb tubes mis en culture	Nb tubes + PF *	Nb tubes + contamination	Nom génotype	Nb tubes mis en culture	Nb tubes + PF *	Nb tubes + contamination
Site (1) Saul	6	2	1	S17	6	5	
MP (Sophie)	6	6		Dumput	6	0	1
E6	6	2 +/-		S14	6	0	1
Elae 4	6	5		Kleber	6	2	1
S8	6	4		Guyane	6	5	1
				Balata			
S10	6	5	1				

\* PF : pousse feuillée enracinée.

L'introduction *in vitro* ne présente pas, en général, de problèmes de contamination avec l'utilisation de chlorure mercurique, cependant il faut pour cela que le matériel utilisé soit maintenu au préalable en serre, et traité contre les cochenilles et autres agents ravageurs ou infectieux. Les génotypes, prélevés en serre, n'avaient justement pas encore bénéficiés de traitements du fait de leur récent envoi.

Au niveau du développement du ou des bourgeons axillaires, on peut noter une certaine variabilité génotypique au sein des 11 génotypes de *D. trifida* issus d'une collecte en Guyane. Cependant, cette différence de réponse peut-être, en partie, dû à l'état physiologique du matériel après envoi.

**Résultats concernant la cryoconservation d'apex d'igname**

**Estimation de la survie des apex selon le traitement subit** (observations à 15 jours de la fin de la déshydratation et de la sortie de l'azote liquide)

	0.9M				1.0M			
	N°	-AL	N°	+AL	N°	-AL	N°	+AL
<b>8h</b>	<b>14</b>	2/7	<b>15</b>	0/10	<b>16</b>	2/7	<b>17</b>	0/10
<b>18h</b>	<b>18</b>	0/8	<b>19</b>	0/10	<b>20</b>	0/8	<b>21</b>	0/10
<b>23h</b>	<b>22</b>	1/8	<b>23</b>	1/10	<b>24</b>	0/8	<b>25</b>	0/10

A 15 jours de la fin de la déshydratation et de la sortie de l'azote liquide, la survie n'a été constatée que pour un traitement (23h, 0.9M) pour les apex ayant été immergés dans de l'azote liquide, et 3 traitements pour les apex témoins (8h et 23h, 0.9M ; 8h, 1.0M). Aucune contamination n'a été observée lors de cette initiation au procédé de cryoconservation.

## 5- Conclusions et actions envisagées.

Les résultats obtenus montrent bien que l'environnement des ignames spontanées n'est pas totalement sain au Bénin et que des potyvirus sont présents dans certains tubercules d'ignames spontanées en l'occurrence chez l'espèce *D. abyssinica* récoltées dans les savane au nord Bénin. La nature de ces potyvirus reste à être précisée par des études plus fines.

A partir des résultats préliminaires ci-dessus (Tableaux 3 et 5) et de ceux de Bousalem (communication personnelle) il peut être supposé que les échantillons de *D. praehensilis* récoltées jusqu'ici sont saines. Ainsi, des échantillons de *D. praehensilis* initialement sains récoltés dans les forêts de Sonoumo, Drahoun et Gougouta ont été très rapidement et fortement infectés par des potyvirus après leur mise en culture (Tableau 5).

Ces données, bien que préliminaires, sont particulièrement intéressantes pour être prises en considération dans le cadre d'un programme d'amélioration génétique. Chez l'espèce *D. abyssinica*, la pression virale a été particulièrement très forte dans les zones de Goro et de Koussoukouingou.

Il apparaît nécessaire de compléter ces résultats par les actions suivantes :

- une collecte d'échantillons dans les zones d'infestation des ignames sauvages ; l'identification complète des potyvirus infectant les ignames dans les zones prospectées et ceux infectant les ignames cultivées des mêmes zones à l'aide de tests ELISA (espèce par espèce ; cultivar par cultivar, zone par zone).
- une étude de la symptomatologie des plantes des différentes espèces d'ignames spontanées infectées et leur état de développement. Ceci permettra une comparaison avec le comportement des ignames cultivées rencontrées dans les zones d'étude.
- une étude des conditions qui prévalent dans ces zones (distance des cultures d'ignames par rapport aux lieux de prélèvement des échantillons ; présence de vecteurs dans les zones prospectées, etc.) en vue d'étudier l'importance relative des différentes voies de transmission possibles : vecteurs, semences, etc.
- une étude de la diversité génétique des potyvirus qui seront identifiés.
- une étude de voies possibles d'assainissement des clones infectés.

Les résultats, obtenus en culture *in vitro* pour l'introduction de nouveaux génotypes d'igname, montrent que la technique de désinfection du matériel végétal permet un taux de réussite important, si l'on respecte au préalable de ne prélever que du matériel à un bon stade de développement, débarrassé des ravageurs et autres agents infectieux pouvant nuire à une bonne désinfection et à une bonne reprise.

Lors de notre stage d'initiation en cryoconservation, pour l'acquisition de cette technique, nous avons appliqué le procédé, mis au point sur 2 génotypes d'igname appartenant à deux espèces *D. alata* et *D. bulbifera* (Malaurie et al. 1998), sur un génotype du complexe *D. cayenensis-D. rotundata*. Les résultats observés à 15 jours semblent ne pas correspondre totalement à ceux observés par Malaurie et Trouslot pour une même durée. Cette différence pourrait être expliquée, soit par au niveau technique d'application du procédé, soit par l'état phytosanitaire du génotype infecté par le YMV, soit par la forte différence génotypique observée déjà sur l'igname en collection *in vitro*.

Dans le cadre d'un programme de conservation des ressources génétiques le développement de technique de cryoconservation nécessiterait d'un minimum de matériel (cryotank de stockage, cryotubes, conteneur Deward, ...), et surtout de l'assurance de pouvoir compter sur un approvisionnement régulier en azote liquide.

## 6- Littérature.

- Bousalem, M., 1995. Mise au point d'outils immunologiques et moléculaires pour la détection et la caractérisation des potyvirus infectant l'igname. Caractérisation moléculaire préliminaire de l'isolat BF C56 du yam mosaic virus. Montpellier, France, LPRC-ORSTOM, (document interne), 22p.
- Bousalem, M., Pinel, A., Dubern, J., Frutos, R. et Fargette, D., 1997. Evaluation de la variabilité moléculaire du virus de la mosaïque de l'igname. Comptes Rendus des sixièmes rencontres de virologie végétale, Aussois, France 9-13 mars 1997, p.72. Strasbourg, France, Ecole thématique, Délégation Régionale Alsace du CNRS.
- Bousalem, M., Dubern, J., Fargette, D., Malaurie, B., 1998. Les viroses de l'igname : bilan et perspectives, rapport technique, 38p.
- Clark, M.F. and Adams, A.N., 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34, 475-483.
- Coursey, D.G. and Martin, F.W., 1970. The past and future of yams as crop plants. *Proc. 2<sup>nd</sup> Int. Symp. Root Crops*, Hawaii, 1, 87-90 ; 99-101.
- Dallot, S., Bousalem, M. and Malaurie, B., (1998). A highly sensitive IC-RT-PCR test for the detection of yam mosaic potyvirus in both leaves and tubers of yam species. (sous presse).
- Dumont, R., (1977). Domestication des ignames en Afrique. In *Proc. International seminar: Yam, old plant and new crop*, Montpellier, June 1997, 12p.
- FAO, 1996. FAOSTAT, December, 1996. Rome, Italy, 68 p.
- Hamon, P., Zoundjehkpon, J., Dumont, R., Tio-Touré, B., 1992. La domestication de l'igname (*Dioscorea* sp.): conséquences pour la conservation des ressources génétiques. Complexes d'espèces, flux de gènes et ressources génétiques des plantes. Actes du Colloque International en hommage à J. Pernès, 8-10 janvier 199. 175-184. Paris, BRG/Lavoisier.
- Malaurie, B., Pungu, O., Dumont, R. and Trouslot, M.-F., 1993. The creation of an *in vitro* germplasm collection of yam (*Dioscorea* spp) for genetic resources preservation. *Euphytica* 65 : 113-122. *Corrigendum* 66 : 243
- Malaurie B & M-F Trouslot. 1995. Les Ignames. In: CNED-AUPELF-UREF, Biotechnologies végétales BV9D, Chapitre 10, 49-77.
- Malaurie B, O Pungu & M-F Trouslot. 1995. Effect of growth regulators concentrations on morphological development of meristem-tips in *Dioscorea cayenensis-D. rotundata* complex and *D. praehensilis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 41: 229-235.
- Malaurie, B. et Thouvenel, J.C. and Pungu, O., 1995b. Effet of meristem-tip size and location on morphological development in *Dioscorea cayenensis-rotundata* complex 'Grosse Caille' and one genotype of *D. praehensilis*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 42 : 215-218
- Malaurie, B. and Trouslot, M.-F., 1996. Cryopreservation of *in vitro* yam (*Dioscorea* sp) apices by the encapsulation-dehydration technique. *Eucarpia, Meeting on Tropical Plants*, Marsh 11-15 1996, France, Abstract, p252.
- Malaurie, B. and Trouslot, M.-F., Engelmann, F. and Chabrilange, N., 1998. Effect of pretreatment conditions on cryopreservation of *in vitro*-cultured yam (*Dioscorea alata* 'Brazo Fuerte' and *Dioscorea bulbifera* 'Nouméa Imboro') shoot apices by encapsulation- dehydration. *Cryo-Letters* 19 : 15-26
- Malaurie B., Trouslot M-F., Berthaud J., (1998). Conservation et échange de germoplasme chez les ignames (*Dioscorea* spp.). 'L'igname : Plante Séculaire et Culture d'Avenir'. eds. J. Berthaud, N. Bricas, J.-L. Marchand, Montpellier 3-6 Juin 1997, In : Acte du séminaire international Cirad-Inra-Orstom-Coraf, France. 135-161
- Malaurie B., Trouslot M.-F., Berthaud J., Chabrilange N., Récalc C. & Dussert S., 1998. The use of slow growth condition culture and cryopreservation in liquid nitrogen for medium and long term conservation and utilisation of *in vitro* yam (*Dioscorea* spp.) germplasm. *Proceedings of the Workshop on Conservation & Utilisation of Cassava, Sweetpotato and Yam Germplasm in Sub-Saharan Africa*. Nairobi, November 11 to 13, 1997, (in press).
- Malaurie, B., Trouslot M.-F., Berthaud J., Bousalem M., Pinel A., Dubern J. (1998). Medium-term and long-term *in vitro* conservation and safe international exchange of yam (*Dioscorea* spp.) germplasm. FAO ed. In: *Proceedings of the 3<sup>rd</sup> Latin-American Meeting on Plant Biotechnology, REDBIO'98*, Jun 1-5 1998, Palacio de Convenciones de la Habana, Cuba, Abstract Book, p. 190
- Malaurie B., Bousalem M., Dubern J., Berthaud J., 1998. Facilitating safe movement of yam (*Dioscorea* spp.) germplasm. Current knowledge, facilities, cost, and international collaboration. 7<sup>th</sup> Triennial Symposium of the International Society for Tropical Root Crops.-Africa Branch (ISTRC-AB), Cotonou, Bénin, 11-17 Oct. 1998, Poster Abstract, p. 119
- Malaurie, B., Trouslot, M.-F., Berthaud, J., Bousalem, M., Pinel, A., and Dubern J., (1998). Medium-term and long-term *in vitro* conservation and safe international exchange of yam (*Dioscorea* spp.) germplasm. *Electronic Journal of Biotechnology* at <http://ejb.ucv.cl/content/vol1/issue3/full/2>.
- Malaurie, B., Trouslot, M.-F., Chabrilange, N., Engelmann, F. (1998). Survival and recovery in yam (*Dioscorea* spp.) after a simple cryoconservation process. In : JIRCAS/IPGRI joint international Workshop : Cryoconservation of tropical plant germplasm, Current research progress and applications, Tsukuba, Japan, 20-23 October, 1998. *Poster Abstract*.
- Thouvenel, J.C. et Dumont, R., 1990. Pertes de rendement de l'igname infectée par le virus de la mosaïque de l'igname en Côte d'Ivoire. *L'agronomie Tropicale* 45 (2), 125-129.



## **Annexe 1 : ACP ELISA POTYVIRUS**

### **Coating :**

Broyer le matériel végétal au 1/20 (0,25g de matériel végétal dans 5ml de tampon) dans le tampon coating pH 9,6 + 2% de PVP

Centrifuger 5 min à 8000 tpm

Déposer 100 µl/puits

Incuber 2 heures à 37°C ou une nuit à 4°C.

1 rinçage rapide suivi de 3 rinçages de 3 min avec du PBST 1X.

### **Saturation :**

PBST 1X additionné de lait écrémé 3%, 200 µl/puits (dans tous les puits)

Incuber 1 heure à 37°C.

1 rinçage de 3 min

### **Premier anticorps :**

Diluer l'anticorps monoclonal potyvirus à la dilution appropriée (ici 1/200) dans du PBST 1X/PVP 2%BSA0,2%.

Déposer 100 µl/puits

Incuber 1 nuit à 4°C ou 3 heures à 37°C

1 rinçage rapide suivi de 3 rinçages de 3 min

### **Deuxième anticorps :**

Diluer l'anticorps anti-souris conjugué à la phosphatase alcaline au 1/200 dans du PBST 1X/PVP2%BSA0,2%.

Déposer 100 µl/puits

Incuber 3 heures à 37°C.

1 rinçage rapide suivi de 3 rinçages de 3 min

### **Substrat :**

Déposer 100 µl/puits de pNPP dissout dans le tampon diéthanolamine (1 comprimé pour 5 ml de tampon) ;

Incuber 1 heure ou plus à T° ambiante.

Lire la DO à 405 nm.

## **Annexe 2 : Protocole IC-RT-PCR pour YMV Polyvalent YMV Poly 1/Poly 2**

### **1/ Immunocapture :**

- **Coating** : tube Robbins 0,5 ml. Mab 351 au 1/100 dans du tampon Carbonate, 100 µl/tube. Incubation à 37°C pendant 4 heures.
- Rinçage : 1 rinçage dans du PBST 0,05% autoclavé.
- Dépôt des extraits de plantes virosées (0,5 g de matériel végétal broyé dans PBS-T + PVP2% + Dieca 0,45%) au 1/5. Incubation 4°C pendant une nuit.  
Clarification 5 min/10000t/min
- 2 Rinçages dans du PBS-T (+ 1 rinçage avec H<sub>2</sub>O DEPC pour les tubes 0,2 ml).

### **2/ Reverse Transcriptase et PCR couplées (RT/PCR) :**

#### **Préparation du milieu réactionnel :**

		50 µl
- Triton x 100 1,7%		6 µl
- Tampon 10X Hi-Taq		5 µl
- dNTP à 2,5 mM chacun		5 µl
- Amorce YMV poly 1 à 100 pmol		0,5 µl
- Amorce YMV poly 2 à 100 pmol		0,5 µl
- AMV Rtase pharmacia (13,67 U/µl)	2 U soit	0,14 µl
- Hi-Taq bioprobe (5 U/µl)	1 U soit	0,2 µl
- Eau ultrapure		32,66 µl

#### **Cycle exécuté au cours de l'amplification enzymatique (Programme IC/YMV)**

Rétro-transcription :	42°C	45 min
Dénaturation :	95°C	5 min

<i>Dénaturation</i> :	92°C	20s	} 37 fois
<i>Hybridation</i> :	52°C	20s	
<i>Elongation</i> :	72°C	40s	

Elongation :	72°C	10 min
--------------	------	--------

#### **Migration des produits PCR :**

Sur gel d'agarose à 1%, avec tampon TBE, à 120 V pendant environ 50 min.  
La détermination des bandes de l'ADN viral est réalisée par référence au marqueur 1kb GIBCO.

## PROTOCOLE DE LA CULTURE IN VITRO ET CRYOCONSERVATION D'APEX D'IGNAME

### I. Introduction *in vitro* de matériel végétal

#### 1.1 Matériel et méthodes.

L'étude a été réalisée sur 11 géotypes, indemnes de YMV, de *D. trifida*.

#### 1.1.2 Méthodes

##### 1.1.2.1 Désinfection du matériel végétal

La désinfection a été réalisée selon la méthode de Malaurie *et al*, (1993). Elle utilise le Chlorure mercurique et se fait suivant le protocole suivant :

- Solution de Chlorure mercurique 1%
- Solution de départ : solution de Chlorure mercurique à 5%
- On prélève 100ml de HgCl<sub>2</sub>, que l'on ajuste à 500ml avec de l'eau distillée.
- Trempage des fragments de tige dans la solution pendant 3mn (agiter régulièrement).
- Rinçage (3 fois) des fragments à l'eau distillée stérile.

##### 1.1.2.2 Mise en culture des géotypes

Six boutures uni-nodales par géotype sont prélevées et mises en culture sur le milieu 2GGC (Malaurie *et al*, 1993) sans charbon actif, pour voir le développement éventuel de champignons ou bactéries.

### II Conservation de matériel végétal par cryoconservation dans de l'azote liquide à -196°C

#### 2.1. Matériel et méthodes

##### 2.1.1 Matériel végétal

L'étude a porté sur le géotype C1 virosé du cultivar d'igname, « Igname de Pilimpikou ». Les plants traités sont des vitroplants obtenus à partir de microboutures uninodales cultivées *in vitro* sur le milieu M50 contenant du charbon actif (Malaurie *et al*, 1998).

#### 2.1.2 Méthodes

##### 2.1.2.1 Excision des apex

Des apex de 2 à 5mm de long ont été prélevés sur les vitroplants puis placés, durant une nuit, dans des boîtes de Pétri sur le milieu de pré-conditionnement MS50, " MS contenant 5% de sucrose " (Malaurie *et al*, 1998).

Au total 137 apex ont été obtenus sur 135 microboutures mises en culture au départ.

##### 2.1.2.2 Encapsulation et prétraitement saccharose des apex encapsulés

Les apex sont immergés dans une solution d'alginate de sodium, puis précipités, goutte à goutte, dans une solution de Chlorure de Calcium (CaCl<sub>2</sub>) 100mM. Une durée minimum de 20 minutes a été observée, pour permettre une complète polymérisation des billes.

Les apex encapsulés sont prétraités, après essorage, dans des erlens contenant 30 ml de solution de saccharose de différentes concentrations : 0.9M, 1M. Le prétraitement a été réalisé sur table d'agitation à 90 rpm. Pendant une durée de 4 jours. Trois lots ont été constitués en fonction de la durée de dessiccation retenue (8H, 18H, 23H).

*Protocole expérimental :*

	0.9M CRYO & Témoin	Nombre d'erlen		1.0M CRYO & Témoin	Nombre d'erlen
8 H	20	1		20	1
18 H	20	1		17	1
23 H	20	1		20	1

A la fin du prétraitement, les billes sont transférées sur du gel de silicate pour dessiccation de 8H, 18H, 23H.

### 2.1.2.3 Transfert rapide dans l'azote liquide et réchauffement des apex

A la fin de la dessiccation, les apex encapsulés sont introduits dans des cryotubes, à raison de 10 apex encapsulés par traitement et par cryo-tube et transférés directement dans de l'azote liquide à  $-196^{\circ}\text{C}$ . Les billes d'alginate sont sorties de l'azote liquide après au moins 2 heures puis repiquées sur du milieu contenant les macro et les microéléments de 2GGC (Malaurie et al, 1998), sans charbon actif, 50g/l saccharose, 1mg/l BA et 0.01mg/l ANA. Les témoins, soit 10 apex par traitement, sont repiqués sur le même milieu.

*Protocole expérimental :*

	0.9M Témoin (-AL)	CRYO (+AL)		1.0M Témoin (-AL)	CRYO (+AL)
8 H	10	10		10	10
18 H	10	10		10	7
23 H	10	10		10	10



### **Annexe 3 : Programme du stage**

Samedi 20 février	:	Départ de Cotonou
Dimanche 21 février 1999	:	Arrivée à Montpellier
Lundi 22 février 1999	:	Règlement des problèmes administratifs
Mardi 23 février 1999	:	IC/RT/PCR + ELISA
Mercredi 24 février 1999	:	IC/RT/PCR + ELISA
Jeudi 25 février 1999	:	IC/RT/PCR + ELISA
Vendredi 26 février 1999	:	IC/RT/PCR + ELISA
Lundi 01 mars 1999	:	IC/RT/PCR avec échantillons du Bénin
Mardi 02 mars 1999	:	Résultats IC/RT/PCR et discussions
Mercredi 03 mars 1999	:	ELISA avec échantillons du Bénin
Jeudi 04 mars 1999	:	Résultats ELISA
Vendredi 05 mars 1999	:	Résultats ELISA + Discussions, Bibliographie
Lundi 08 mars 1999	:	Prélèvement de nœuds de tiges en serre (CIRAD) Mise en culture de nouveaux génotypes
Mardi 09 mars 1999	:	Prélèvement des apex sous loupe binoculaire Mise en culture sur milieu de prétraitement
Mercredi 10 mars 1999	:	Encapsulation des apex et mise en culture sur milieu de prétraitement saccharose
Jeudi 11 mars 1999	:	Mise au propre des travaux effectués
Vendredi 12 mars 1999	:	Mise au propre des travaux effectués
Lundi 15 mars 1999	:	Arrêt du prétraitement saccharose, mise en déshydratation pour une durée de 8h
Mardi 16 mars 1999	:	Arrêt du prétraitement saccharose, mise en déshydratation pour une durée de 18h, immersion dans l'azote liquide, mise en culture Présentation des résultats lors d'un séminaire
Mercredi 17 mars 1999	:	Arrêt du prétraitement saccharose, mise en déshydratation pour durée de 23 h, immersion dans l'azote liquide, mise en culture.
Jeudi 18 mars 1999	:	Mise au propre des travaux
Vendredi 19 mars 1999	:	Mise au propre des travaux ; Fin du stage

### **Personnes ayant contribué au déroulement du stage :**

- 1- Agbangla Clément, Enseignant Chercheur UNB-FAST/Bénin
- 2- Arribi Jamel, Technicien LPRC-CIRAD/Montpellier
- 3- Berthaud Julien, Chercheur GeneTrop-IRD/Montpellier
- 4- Bousalem Mustapha, Chercheur LPRC-CIRAD/Montpellier
- 5- Malaurie Bernard, Chercheur GeneTrop-IRD/Montpellier
- 6- Pinel Agnès, LPRC-CIRAD/Montpellier
- 7- Rostagno Christelle, Technicienne LPRC-CIRAD/Montpellier
- 8- Tostain Serge, IRD-FAST/Bénin.