



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.



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 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 ^{poty} 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

(++) 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 ^{poty} 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
8h	14	2/7	15	0/10	16	2/7	17	0/10
18h	18	0/8	19	0/10	20	0/8	21	0/10
23h	22	1/8	23	1/10	24	0/8	25	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.

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.

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 HgCl₂, 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 (CaCl₂) 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).



