



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

Kwasi Dzola AYISAH

Ecole Supérieure d'Agronomie (ESA)

Université du Bénin (UB)

République du TOGO

Responsables de stage :

Culture in vitro et cryo-conservation
Indexation virologique

B. Malaurie

M. Bousalem

GeneTrop, Unité GAP

LPRC /CIRAD

IRD, Montpellier

IRD, Montpellier





INTRODUCTION

L'igname, (*Dioscorea* sp), est une culture de grande importance en Afrique de l'ouest, berceau du complexe *Dioscorea cayenensis-rotundata* (Coursey, 1967). Elle constitue la nourriture de base pour des millions de personnes et son importance socio-culturelle et économique est aussi considérable.

Dans la sous-région ouest africaine, le développement rapide des villes s'accompagne de l'augmentation rapide de la consommation rapide urbaine d'igname avec la création de nouveaux marchés qu'il faut régulièrement approvisionner. La réponse à la demande sans cesse croissante des ignames est la tendance vers une intensification de la culture. Les changements des conditions de culture des ignames impliquent toutefois, de nouvelles contraintes dont les problèmes phytosanitaires. En effet, l'intensification de la culture favorise le développement des parasites notamment des maladies virales auxquelles sont particulièrement sensibles les ignames du complexe *Dioscorea cayenensis-rotundata*, l'espèce la plus appréciée des consommateurs. Les virus causent des dégâts et pertes considérables aux cultures d'ignames (Thouvenel et Dumont, 1990).

Au Togo les viroses constituent le problème majeur de l'igname (Adjata, 1991). Des études menées sur les différentes espèces d'ignames cultivées sur place, ont conduit à l'identification des virus (potyvirus) suivants :

- *Dioscorea* Green Banding Mosaic Virus (DGBMV) isolé sur *D. rotundata* (Reckaus, 1979)
- *Dioscorea alata* Ring mottle Virus (DaRMV) isolé sur *D. alata* (Porth et Nienhaus, 1983).
- Yam Mosaic virus (YMV) isolé sur *D. cayenensis-rotundata*, *D. alata* et sur *D. togoensis*, une igname sauvage (Gumédzoe, *et al* 1991).
- Potyvirus I en association avec Badnavirus, isolés sur *D. alata* (Gumédzoe, 1996).

Pour limiter les pertes dues aux viroses le moyen le plus efficace est la création de nouvelles variétés d'ignames résistantes ou tolérantes au virus et qui répondent au goût des consommateurs en utilisant comme matériel végétal de base des formes spontanées du complexe *D. cayenensis-rotundata* c'est-à-dire, *Dioscorea abyssinica* et *D. praehensilis* qui sont impliquées dans le processus de domestication par les paysans. Les ignames spontanées de par leur mode de multiplication par les graines peuvent offrir une diversité génétique plus grande et peuvent en conséquence servir de sources nouveaux génotypes à la création variétale. Il est indispensable, pour faire une sélection fiable, de bien connaître l'environnement virologique des ignames spontanées et des formes en domestication. Il s'agira d'étudier la diversité des virus des ignames spontanées et de rechercher si les principaux virus identifier chez les formes cultivées y sont présents, notamment les potyvirus dont le YMV, le plus prévalent chez *D. cayenensis-rotundata* (Gumédzoe, 1996). Ceci permettra d'évaluer les échanges de virus entre les deux formes d'igname et de prévoir les risques potentiels de l'intensification de la culture. C'est dans cette optique que le projet de recherche sur la domestication des ignames au Bénin et au Togo a été initié.

Le présent stage que nous avons effectué à l'IRD (ex ORSTOM) et au Laboratoire de Phytovirologie des Régions chaudes (Laboratoire mixte IRD/CIRAD) au CIRAD, se situe dans le cadre dudit projet. Il porte sur l'aspect environnement virologique des ignames spontanées et les formes en domestication au Togo.

L'objectif du stage c'est d'acquérir les techniques de l'IC-RT-PCR comme outil de diagnostic performant des potyvirus de l'igname et de cryoconservation de matériel végétal sous forme d'apex pour la conservation à long terme, tout en travaillant directement sur du matériel végétal apporté du Togo. Ces techniques devront nous servir à poursuivre, dans notre laboratoire d'origine, les études commencées dans les laboratoires LPRC et GeneTrop, au CIRAD et à l'IRD.

INDENTIFICATION DES POTYVIRUS DES ESPECES D'IGNAME SPONTANEEES PAR L'IC-RT-PCR et ACP-ELISA

Rappel des objectifs de l'étude

L'objectif principal de la présente étude est d'évaluer la diversité des virus des ignames et tout particulièrement des formes sauvages et des formes en domestication, sources de nouveaux génotypes pour la création variétale nouvelle. Ceci permettra d'évaluer les échanges de virus entre les deux formes d'igname et de prévoir les risques potentiels de l'intensification de la culture d'ignames.

Les objectifs spécifiques visent l'étude de la situation phytosanitaire des ignames sauvages du point virologique et rechercher si les principaux virus détectés chez les formes cultivées y sont présents. Il s'agira de préciser si les populations virales retrouvées chez les formes sauvages d'igname montrent les mêmes caractéristiques que celles des formes cultivées. Dans le cadre de la présente étude, nous nous attacherons principalement aux potyvirus dont les formes de Yam Mosaic Virus reconnus comme les plus dommageables des virus de l'igname.

I Matériel et méthodes

I.1 Matériel

I.1.1 Matériel végétal

La présente étude a été réalisée principalement sur des tubercules de deux espèces spontanées de *Dioscorea*, *Dioscorea praehensilis* et de *Dioscorea abyssinica* impliquées dans le processus de domestication paysane (parents du complexe *Dioscorea cayenensis-rotundata*) et sur quelques espèces d'ignames cultivées (tableau n°1). D'autres espèces de spontanées de *Dioscorea* sont également collectées. Certains des échantillons sont issus d'espèces spontanées en domestication dans les champs des paysans et à la station d'expérimentation de l'Ecole Supérieure d'Agronomie de l'Université du Bénin (Togo) où d'autres espèces d'ignames sont cocultivées.

Des feuilles de *Dioscorea smilacifolia* (une autre espèce de *Dioscorea* spontanée) portant des symptômes de virose également, ont été aussi collectées. Cette espèce de *Dioscorea* pousse dans les champs d'igname et dans les grandes forêts où pousse également *Dioscorea praehensilis*. Elle peut par conséquent, porter des virus capables d'infecter les autres espèces d'ignames.

La récolte des échantillons a été effectuée du 10 au 13 Février 1999, période pendant laquelle il n'y a presque plus de végétation.

Tableau 1 : Liste des échantillons de tubercules d'igname (du Togo) identifiés par le test ACP-ELISA

Numéro	Espèce	Cultivar	Zone de collecte	Localité	Numéro du site
1/20-3/99	<i>D. dumetorum</i>	Cultivé	Champ d'igname	Agodzololo	107
2/11-6/99	<i>D. abyssinica</i>	en domestication	Champ d'igname	Karouwè-kopé	106
3/11-1/99	<i>D. abyssinica</i>	sauvage	Loin des cultures	Elavanyo	201
4/14-5/99	<i>D. abyssinica</i>	sauvage	Réserve naturelle	Naboulgou	111
5/14-1/99	<i>D. abyssinica</i>	sauvage	Réserve naturelle	Naboulgou	111
6/14-6/99	<i>D. abyssinica</i>	sauvage	Réserve naturelle	Naboulgou	111
8/14-3/99	<i>D. abyssinica</i>	sauvage	Réserve naturelle	Naboulgou	111
9/11-4/99	<i>D. sp</i>	sauvage	Loin des cultures	Elavanyo	201
10/20-6/99	<i>D. cayenensis-rotundata</i>	Kratsi (cultivé)	Champ d'igname	Agodzololo	107
11/20-1/99	<i>D. cayenensis-rotundata</i>	Coucou (cultivé)	Champ d'igname	Agodzololo	107
12/15-3/99	<i>D. praehensilis</i>	cultivé	Champ d'igname	Agoé-kopé	103
13/28-10/99	<i>D. praehensilis</i>	sauvage	Proche des champs d'ignames	Klabé-Lomnava	105
14/3-10/99	<i>D. abyssinica</i>	sauvage	Proche des champs de sorgho	Agadaradè	112

Numéro	Espèce	Cultivar	Zone de collecte	Localité	Numéro du site
15/10-1/99	<i>D. preussii</i>	sauvage	Loin des cultures	Mélou	110
16/3-2/99	<i>D. praehensilis</i>	kokassé (cultivé)	Proche des champs de sorgho	Agadaradè	112
17/20-2/99	<i>D. alata</i>	cultivé	Champ d'igname	Agodzololo	107
18/3-14/99	<i>D. abyssinica</i>	sauvage	Proche des champs de sorgho	Agadaradè	112
19/1-2/99	<i>D. praehensilis</i>	cultivé	Champ de cacaoyer	Kebo-Dalavé	101
21/11-3/99	<i>D. dumetorum</i>	sauvage	Loin des cultures	Karouwè-kopé	106
22/20-7/99	<i>D. cayenensis-rotundata</i>	Kratsi (cultivé)	Champ d'igname	Agodzololo	107
23/28-1/99	<i>D. dumetorum</i>	cultivé	Champ d'igname	Klabé-Lomnava	105
24/10-1/99	<i>D. esculenta</i>	cultivé	Champ d'igname	Défalé	109
25/1-1/99	<i>D. praehensilis</i>	cultivé	Champ de cacaoyer	Agou-Apégamé	102
26/11-18/99	<i>D. cayenensis-rotundata</i>	cultivé	Champ d'igname	Elavanyo	201
27/11-13/99	<i>D. praehensilis</i>	sauvage	Loin des cultures	Elavanyo	201
28/14-4/99	<i>D. abyssinica</i>	sauvage	Loin des cultures	Péssidè	108
29/11-2/99	<i>D. dumetorum</i>	sauvage	Loin des cultures	Karouwè-kopé	106
30/11-7/99	<i>D. praehensilis</i>	sauvage	Loin des cultures	Elavanyo	201
31/11-12/99	<i>D. praehensilis</i>	sauvage	Loin des cultures	Elavanyo	201
32/11-8/99	<i>D. abyssinica</i>	sauvage	Loin des cultures	Elavanyo	201
33/15-1/99	<i>D. bulbifera</i>	cultivé	Champ d'igname	Agoé-kopé	103
34/3-5/99	<i>D. praehensilis</i>	kokassé (cultivé)	Proche des champs de sorgho	Agadaradè	112

Tableau 1 (suite)

Numéro	Espèce	Cultivar	Zone de collecte	Localité	Numéro du site
37/11-9/99	<i>D. dumetorum</i>	sauvage	Loin des cultures	Karouwè-kopé	106
38/3-1/99	<i>D. abyssinica</i>	sauvage	Proche des champs de sorgho	Agadaradè	112
39/1-13/99	<i>D. praehensilis</i>	sauvage	Loin des cultures	Elavanyo	201
40/3-3/99	<i>D. abyssinica</i>	sauvage	Proche des champs de sorgho	Agadaradè	112
41/14-4/99	<i>D. preussii</i>	sauvage	Loin des cultures	Péssidè	108
42/11-14/99	<i>D. praehensilis</i>	sauvage	Loin des cultures	Elavanyo	201
43/14-3/99	<i>D. preussii</i>	sauvage	Loin des cultures	Péssidè	108
44/26-1/99	<i>D. esculenta</i>	cultivé	Champ d'igname	Adjengré	114
45/26-2/99	<i>D. esculenta</i>	cultivé	Champ d'igname	Adjengré	114
46/26-3/99	<i>D. esculenta</i>	cultivé	Champ d'igname	Adjengré	114
47/28-2/99	<i>D. bulbifera</i>	cultivé	Champ d'igname	Klabé-Lomnava	105
48/14-1/99	<i>D. abyssinica</i>	sauvage	Loin des cultures	Péssidè	108
49/20-5/99	<i>D. cayenensis-rotundata</i>	Coucou (cultivé)	Champ d'igname	Agodzololo	107
50/12-1/99	<i>D. alata</i>	cultivé	Champ d'igname	F.E.S.A	115
51/12-2/99	<i>D. alata</i>	cultivé	Champ d'igname	F.E.S.A	115
52/12-3/99	<i>D. esculenta</i>	cultivé	Champ d'igname	F.E.S.A	115
53/12-4/99	<i>D. esculenta</i>	cultivé	Champ d'igname	F.E.S.A	115
54/12-5/99	<i>D. alata</i>	cultivé	Champ d'igname	F.E.S.A	115
55/12-6/99	<i>D. alata</i>	cultivé	Champ d'igname	F.E.S.A	115
56/12-7/99	<i>D. alata</i>	cultivé	Champ d'igname	F.E.S.A	115
57/12-8/99	<i>D. sp</i>	laboko en domestication	Champ d'igname	F.E.S.A	115
58/12-9/99	<i>D. alata</i>	cultivé	Champ d'igname	F.E.S.A	115
59/12-10/99	<i>D. alata</i>	cultivé	Champ d'igname	F.E.S.A	115
60/12-11/99	<i>D. alata</i>	cultivé	Champ d'igname	F.E.S.A	115
61/12-12/99	<i>D. alata</i>	cultivé	Champ d'igname	F.E.S.A	115

1.1.2 Les antiséras et enzymes utilisés

Nous avons utilisé, pour la détection des potyvirus en général, un anticorps monoclonal universel anti-potyvirus commercialisé par Agdia pour le test ACP-ELISA et un anticorps monoclonal Mab 351 pour l'immuno-capture des particules de YMV.

Par ailleurs, nous avons utilisé pour la RT-PCR, deux amorces YMV poly1 et YMV poly2 de 196pb, une transcriptase reverse, AMV Rtase Pharmacia, une DNAPolymérase Hitaq biotrope. La détection du YMV sur gel d'agarose a été réalisée avec un marqueur ladder de 1kb.

1.2 Méthodes

1.2.1 Collecte des échantillons de tubercules

La collecte des tubercules a couvert quatre des cinq Régions économique du Togo (Région Maritime, Région des Plateaux, Région Centrale, Région de la Kara). Le choix des échantillons n'a pas été basé sur l'observation des symptômes caractéristiques de virose sur les plants d'igname comme il conviendrait de le faire; les feuilles étant desséchées; ce qui a fait que les échantillons sont constitués presque essentiellement de tubercules. Par contre, la collecte a été organisée de manière à couvrir les zones de grande production d'ignames au Togo et différents environnements capables d'influencer les infections. Ainsi, les tubercules d'igname ont été récoltés soit dans des zones éloignées de toute culture soit dans des forêts situées à proximité des champs d'ignames. Les espèces cultivées sont prélevées dans des champs de paysans et station d'expérimentation.

Après la récolte, les tubercules (petits tubercules) sont conservés à +4°C pendant une semaine avant leur transport à Montpellier où ils sont entreposés à la serre du C.I.R.A.D..

1.2.2 Identification du YMV dans les tubercules d'igname par l'IC-RT-PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction ou amplification enzymatique *in vitro* d'ADN (SAIKI et al., 1985 ; ERLICH, 1989) est une technique qui permet d'amplifier de façon sélective un fragment d'ADN compris entre deux séquences nucléotidiques utilisées comme amorces de la synthèse de brin d'ADN correspondant à la matrice. La synthèse de la séquence cible d'ADN est réalisée par une ADNpolymérase stable à haute température. Pour la détection des ARN génomiques, la technique de reverse transcriptase PCR est utilisée. Dans ce cas, une première étape de transcription inverse permet d'obtenir des ADNc complémentaires des ARNs en utilisant une amorce oligo-dt. L'ADNc correspondant au transcript recherché est alors amplifié à l'aide d'amorces spécifiques. Dans la technique immuno-capture –RT-PCR utilisée dans le cadre de notre stage, le virus est d'abord capturée par des anticorps spécifiques puis l'ARN viral est transcrit en ADNc complémentaire qui est ensuite amplifié.

Dans le cadre de notre étude, la détection de YMV dans les tubercules et feuilles d'igname par la technique d'immuno-capture a été réalisée suivant le protocole placé en annexe. Ici, la transcription reverse et l'amplification sont couplées.

Les échantillons broyés sont prélevés dans la partie proximale des tubercules (tête de tubercule) où la concentration des particules virales est plus élevée.

1.2.3 Identification des potyvirus dans les tubercules d'igname par la méthode immuno-enzymatique ACP – ELISA

L'identification des potyvirus a été réalisée suivant le protocole placé en annexe. Elle a porté sur tous les échantillons à l'exception des feuilles de *Dioscorea smilacifolia*. Les fragments broyés ont été également prélevés dans la partie proximale des tubercules (tête de tubercule).

Nous avons utilisé un anticorps monoclonal universel pour les analyses.

II Résultats et discussion

2.1 Détection du YMV dans les tubercules et les feuilles par l'IC-RT-PCR

Au total 18 échantillons ont été analysés dont 12 sont des tubercules et 6 sont des feuilles de *D. smilacifolia*. Sur les 18 échantillons 15 sont issus d'espèces d'igname spontanées, 1 en domestication et 3 proviennent d'ignames cultivées (tableau n°2). Mais aucun des échantillons ne contient le YMV.

Tableau 2 : Liste des échantillons analysés par l'IC-RT-PCR

Numéro	Espèce	Cultivar	Zone de collecte	YMV	
				Tubercules	Feuilles
11-6/99	<i>D. abyssinica</i>	En domestication (Pô-Hè)	Champ d'igname	-	
11-1/99	<i>D. abyssinica</i>	Sauvage	Loin des cultures	-	
14-5/99	<i>D. abyssinica</i>	Sauvage	Réserve naturelle	-	
14-6/99	<i>D. abyssinica</i>	Sauvage	Réserve naturelle	-	
3-10/99	<i>D. abyssinica</i>	Sauvage	Proche des champs de sorgho	-	
11-13/99	<i>D. praehensilis</i>	Sauvage	Loin des cultures	-	
14-4/99	<i>D. abyssinica</i>	Sauvage	Loin des cultures	-	
11-12/99	<i>D. praehensilis</i>	Sauvage	Loin des cultures	-	
3-1/99	<i>D. abyssinica</i>	Sauvage	Proche des champs de sorgho	-	
3-3/99	<i>D. abyssinica</i>	Sauvage	Proche des champs de sorgho	-	
12-6/99	<i>D. alata</i>	Cultivé	Champ d'igname	-	
12-7/99	<i>D. alata</i>	Cultivé	Champ d'igname	-	
28-1/99	<i>D. smilacifolia</i>	Sauvage	Loin des cultures		-
28-2/99	<i>D. smilacifolia</i>	Sauvage	Loin des cultures		-
28-3/99	<i>D. smilacifolia</i>	Sauvage	Loin des cultures		-
28-4/99	<i>D. smilacifolia</i>	Sauvage	Loin des cultures		-
28-5/99	<i>D. smilacifolia</i>	Sauvage	Loin des cultures		-
28-6/99	<i>D. smilacifolia</i>	Sauvage	Loin des cultures		-

Les échantillons analysés peuvent, toutefois, contenir des potyvirus infectant des ignames différents du YMV ou d'autres souches de YMV que l'anticorps monoclonal utilisé ne peut identifier. Par ailleurs, ils ne représentent en fait qu'une partie des échantillons à tester ; le reste des échantillons encore non analysé peut être infecté par YMV ou par d'autres potyvirus de l'igname.

2.2 Identification des potyvirus dans les tubercules par le test ACP - ELISA

Nous avons analysé 57 échantillons tous des tubercules dont 25 sont issus des espèces spontanées de *Dioscorea*. Deux espèces sauvages sont en domestication. Sur les 57 échantillons 8, soit 14,04%, ont réellement réagi positifs au test (tableau n°3). Leurs D.O. sont supérieures ou égales 0,330. Dix neuf autres échantillons ont très faiblement réagi avec des D.O. comprises entre 0,121 et 0,310 et ne sont pas par conséquent pris en compte. Leur analyse sera refaite.

Sur les 8 échantillons positifs 5 sont issus d'espèces spontanées. Les trois autres échantillons positifs sont constitués de 2 *Dioscorea esculenta* cultivées et un des échantillons d'ignames spontanées en domestication.

Tableau 3 : Liste des échantillons de tubercules d'igname (du Togo) identifiés par le test ACP-ELISA.

Numéro	Espèce	Cultivar	Zone de collecte	Test tubercule		
				Poty	Observations	
1/20-3/99	<i>D. dumetorum</i>	Cultivé	Champ d'igname	+		
2/11-6/99	<i>D. abyssinica</i>	en domestication (Pô-hè)	Champ d'igname	-		
3/11-1/99	<i>D. abyssinica</i>	sauvage	Loin des cultures	++		
4/14-5/99	<i>D. abyssinica</i>	sauvage	Réserve naturelle	+		
5/14-1/99	<i>D. abyssinica</i>	sauvage	Réserve naturelle	-		
6/14-6/99	<i>D. abyssinica</i>	sauvage	Réserve naturelle	+		
8/14-3/99	<i>D. abyssinica</i>	sauvage	Réserve naturelle	+++		
9/11-4/99	<i>D. sp</i>	sauvage	Loin des cultures	-		
10/20-6/99	<i>D. cayenensis-rotundata</i>	kratsi (cultivé)	Champ d'igname	-		
11/20-1/99	<i>D. cayenensis-rotundata</i>	coucou (cultivé)	Champ d'igname	-		
12/15-3/99	<i>D. praehensilis</i>	cultivé	Champ d'igname	-		
13/28-10/99	<i>D. praehensilis</i>	sauvage	Proche des champs d'ignames	-		
14/3-10/99	<i>D. abyssinica</i>	sauvage	Proche des champs de sorgho	+		
15/10-1/99	<i>D. preussii</i>	sauvage	Loin des cultures	-		
16/3-2/99	<i>D. praehensilis</i>	kokassé (cultivé)	Proche des champs de sorgho	+		
17/20-2/99	<i>D. alata</i>	cultivé	Champ d'igname	-		
18/3-14/99	<i>D. abyssinica</i>	sauvage	Proche des champs de sorgho	+		
19/1-2/99	<i>D. praehensilis</i>	cultivé	Champ de cacaoyer	-		
21/11-3/99	<i>D. dumetorum</i>	sauvage	Loin des cultures	+		
22/20-7/99	<i>D. cayenensis-rotundata</i>	kratsi (cultivé)	Champ d'igname	-		
23/28-1/99	<i>D. dumetorum</i>	cultivé	Champ d'igname	+		
24/10-1/99	<i>D. esculenta</i>	cultivé	Champ d'igname	+		
25/1-1/99	<i>D. praehensilis</i>	cultivé	Champ de cacaoyer	-		
26/11-18/99	<i>D. cayenensis-rotundata</i>	cultivé	Champ d'igname	-		
27/11-13/99	<i>D. praehensilis</i>	sauvage	Loin des cultures	+		Ecart entre les deux D.O.
28/14-4/99	<i>D. abyssinica</i>	sauvage	Loin des cultures	+		
29/11-2/99	<i>D. dumetorum</i>	sauvage	Loin des cultures	+++		
30/11-7/99	<i>D. praehensilis</i>	sauvage	Loin des cultures	-		
31/11-12/99	<i>D. praehensilis</i>	sauvage	Loin des cultures	-		

Légende : Degrés de réaction des échantillons au test ACP-ELISA.

0.120≤D.O.≤0.320 = réaction faible : +; 0.321≤D.O.≤0.421 = réaction modérée : ++ ; 0.422≤D.O.≤0.522 = réaction forte : +++ ; 0.523≤D.O. = réaction très forte : ++++

Tableau n°3 (suite)

Numéro	Espèce	Cultivar	Zone de collecte	Test tubercule	
				Poty	Observation
32/1-8/99	<i>D. abyssinica</i>	sauvage	Loin des cultures	++++	
33/15-1/99	<i>D. bulbifera</i>	cultivé	Champ d'igname	+	
34/3-5/99	<i>D. praezensilis</i>	kokassé cultivé)	Proche des champs de sorgho	+	
37/11-9/99	<i>D. dumetorum</i>	sauvage	Loin des cultures	++++	
38/3-1/99	<i>D. abyssinica</i>	sauvage	Proche des champs de sorgho	-	
39/1-13/99	<i>D. praezensilis</i>	sauvage	Loin des cultures	-	
40/3-3/99	<i>D. abyssinica</i>	sauvage	Proche des champs de sorgho	+	
41/14-4/99	<i>D. preussii</i>	sauvage	Loin des cultures	-	
42/11-14/99	<i>D. praezensilis</i>	sauvage	Loin des cultures	-	
43/14-3/99	<i>D. preussii</i>	sauvage	Loin des cultures	+	
44/26-1/99	<i>D. esculenta</i>	cultivé	Champ d'igname	-	
45/26-2/99	<i>D. esculenta</i>	cultivé	Champ d'igname	-	Ecart entre les deux D.O.
46/26-3/99	<i>D. esculenta</i>	cultivé	Champ d'igname	+	
47/28-2/99	<i>D. bulbifera</i>	cultivé	Champ d'igname	+	Ecart entre les deux D.O
48/14-1/99	<i>D. abyssinica</i>	sauvage	Loin des cultures	-	(feuilles virosées)
49/20-5/99	<i>D. cayenensis-rotundata</i>	coucou(cultivé)	Champ d'igname	-	Ecart entre les deux D.O
50/12-1/99	<i>D. alata</i>	cultivé	Champ d'igname	+	(feuilles virosées)
51/12-2/99	<i>D. alata</i>	cultivé	Champ d'igname	+	
52/12-3/99	<i>D. esculenta</i>	cultivé	Champ d'igname	+++	
53/12-4/99	<i>D. esculenta</i>	cultivé	Champ d'igname	++	
54/12-5/99	<i>D. alata</i>	cultivé	Champ d'igname	-	
55/12-6/99	<i>D. alata</i>	cultivé	Champ d'igname	-	
56/12-7/99	<i>D. alata</i>	cultivé	Champ d'igname	-	
57/12-8/99	<i>D. sp</i>	laboko en domestication	Champ d'igname	++++	
58/12-9/99	<i>D. alata</i>	cultivé	Champ d'igname	-	
59/12-10/99	<i>D. alata</i>	cultivé	Champ d'igname	-	
60/12-11/99	<i>D. alata</i>	cultivé	Champ d'igname	-	
61/12-12/99	<i>D. alata</i>	cultivé	Champ d'igname	-	

Au niveau de chacune des espèces, on note que 3 des 13 échantillons de *D. abyssinica* testés, contiennent les particules de potyvirus de même que 2 des 3 échantillons de *D. dumetorum* spontanés. Par contre aucun des échantillons de *D. praezensilis* n'a réagi positif au test; ce qui confirmerait les résultats de Bousalem (communication personnelle).

L'isolat 11-1/99 (*Dioscorea abyssinica*) qui a réagi positivement au test ACP-ELISA, a été négatif au test précédent (test IC-RT-PCR). Ce qui prouve qu'il a été infecté par des potyvirus autre que YMV. En effet, au laboratoire de virologie végétale de l'Ecole Supérieure d'Agronomie (Université du Bénin - Togo) plusieurs potyvirus ont été aussi identifiés sur des échantillons de feuilles virosées d'igname qui étaient différents du YMV (Gumedzoe, 1996).

Si nous considérons l'environnement dans lequel les échantillons ont été prélevés, nous constatons que les deux échantillons de *D. dumetorum* spontanés ayant réagi positifs au test, ont été tous récoltés dans des zones situées en dehors de toute culture; il en est de même pour les trois échantillons positifs de *D. abyssinica*. Ces résultats montrent que les ignames spontanées, même poussant en dehors des zones de culture d'igname, sont tout autant infectées par des potyvirus. Toutefois la nature des potyvirus identifiés sur ces ignames spontanées est encore inconnue de même que leurs liens avec ceux qui sont identifiés sur les formes cultivées. La connaissance de ces éléments s'avère indispensable pour une bonne exploitation des résultats obtenus.

Il faut remarquer, par ailleurs, que l'effectif des échantillons analysés est très restreint (25 échantillons d'espèces spontanées et 2 échantillons d'igname en domestication). Ainsi pour pouvoir faire une bonne interprétation des résultats, il conviendra de travailler sur un nombre d'échantillons beaucoup plus grand.

CULTURE *IN VITRO* ET CRYOCONSERVATION D'APEX D'IGNAME

Rappel des objectifs :

Les ignames cultivées en raison de leur mode de multiplication par voie végétative, sont sujettes à une accumulation des infections virales. Ces virus gênent la conservation des ignames *in situ* de par les énormes dégâts qu'ils causent aux plants (élimination complète parfois de clones) et empêchent les échanges internationaux de matériel génétique. Pour résoudre ces problèmes l'une des solutions consiste à assainir les plants par la culture d'apex ou de méristèmes *in vitro* et à les conserver dans de l'azote liquide à -196°C (cryoconservation).

L'objectif principal de cette partie de notre étude est de nous familiariser avec la technique de cryoconservation utilisées comme moyen de conservation du matériel végétal de reproduction d'igname sous forme d'apex. Cette technique devra nous servir à la conservation de clones d'igname après leur assainissement.

Nous avons effectué le présent stage à l'IRD GeneTrop (ex ORSTOM) au laboratoire de culture *in vitro* de l'Unité de Génétique et Amélioration des Plantes (GAP).

Il comprend un volet culture *in vitro* de fragments uninodaux d'igname et un volet cryoconservation d'apex d'igname.

I. Introduction *in vitro* de matériel végétal

Matériel et méthodes.

L'étude a été réalisée sur 11 génotypes de *D. trifida* indemnes de YMV (tableau^o1).

Numéro	Nom de génotype	Numéro	Nom de génotype
1	Site (1) Saul	7	S17
2	MP (Sophie)	8	Dumput
3	E6	9	S14
4	Elae 4	10	Kleber
5	S8	11	Guyane Balata
6	S10		

La désinfection du matériel végétal a été réalisée selon la méthode de Malaurie *et al*, (1993). Elle utilise le Chlorure mercurique (voir protocole en annexe).

Après la désinfection, six boutures uni-nodales par génotype sont prélevées et mises en culture sur le milieu 2GGC (Malaurie *et al*, 1993) sans charbon actif.

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

Matériel et méthodes

L'étude a porté sur le génotype C1 virosé du cultivar d'igname, « igname de Pilimpikou ». Les plants traités sont des vitroplants obtenus à partir de microboutures uni-nodales cultivées *in vitro* sur le milieu M50 contenant du charbon actif (Malaurie *et al*, 1995).

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

Les apex ont été encapsulés dans le gel d'alginate de sodium et prétraités dans une solution de saccharose. Les billes d'alginate sont séchées sur du gel de silicate pendant 8H, 18H, 23H (voir protocole en annexe). A la fin de la dessiccation, les apex encapsulés sont introduits directement dans de l'azote liquide à -196°C. Ils sont sortis après pour être repiqués sur du milieu contenant les macro et microéléments de 2GGC (Malaurie *et al*, 1998), sans charbon actif, additionné de 50g/l saccharose, 1mg/l BA et de 0.01mg/l ANA

Résultat des activités de culture *in vitro*.

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 au niveau de la mise en culture de géotypes de *D. trifida*, à quatre mois de leur introduction *in vitro*

Nom géotype	Nb tubes mis en culture	Nb tubes + PF *	Nb tubes + contamination	Nom géotype	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 géotypes, 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 géotypes 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	N°	+AL
8h	1	3/10	2	1/10	3	7/10	4	0/10		
18h	5	1/10	6	0/10	7	1/10	8	0/10	9	0/8
23h	10	2/10	11	3/10	12	0/10	13	2/10		

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.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES DES ETUDES

Les résultats préliminaires obtenus à la suite de la présente étude, indiquent que les espèces spontanées de *Dioscorea*, *D. abyssinica* et *D. dumetorum* au Togo sont infectés par des potyvirus comme les ignames cultivées, bien que le nombre d'échantillons ayant réagi positivement au test ACP-ELISA soit faible. Quelques uns des potyvirus seraient différents du YMV. De même un des échantillons d'ignames spontanées en domestication est également infecté. Par contre *D. praehensilis* n'est pas infecté par ces potyvirus, de même que l'échantillon de *D. abyssinica* en domestication.

La nature, toutefois, des potyvirus ayant infecté ces ignames sauvages ainsi que leurs liens avec ceux qui infectent les ignames cultivées n'est pas encore inconnu.

Concernant la représentativité des échantillons analysés, on peut remarquer que les effectifs des échantillons d'ignames sauvages testés sont très restreints; soit 13 échantillons de *D. abyssinica*, 6 *D. praehensilis*, 3 *D. dumetorum*, 1 *D. abyssinica* en domestication et une autre espèce de *Dioscorea* également en domestication.

Certains échantillons dont les réactions au test ACP-ELISA sont encore douteuses, n'ont pas été pris en compte. Ils seront testés à nouveau. De même, le test sur le YMV sera fait.

Les résultats ainsi obtenus ont permis d'avoir une première idée sur l'environnement virologique des ignames spontanées mais ne permettent pas de tirer une conclusion sur le niveau de susceptibilité de celles-ci vis à vis des potyvirus, étant donné le faible pourcentage des échantillons qui ont réellement réagi positivement au test et l'effectif réduit du matériel végétal traité. Il s'avèrerait donc important que l'étude soit poursuivie, en travaillant cette fois-ci sur un grand nombre d'échantillons de matériel végétal y compris les feuilles et les tubercules. L'étude portera sur la connaissance des diverses souches des potyvirus qui infectent les ignames spontanées et leur comparaison avec celles des ignames cultivées à travers une étude de variabilité moléculaire. Elle concernera également les modes de transmissions ou de dissémination des potyvirus dans l'habitat naturel des ignames spontanées tout en essayant de comprendre le mode de propagation des ignames spontanées elles mêmes.

L'étude telle que présentée, si elle est réalisée, devrait permettre d'une part, de connaître le degré de susceptibilité des ignames spontanées aux viroses et d'autre part de comprendre les types d'échanges qui peuvent exister entre les ignames spontanées et les formes cultivées sur la plan virologique. Elle devrait ensuite permettre d'évaluer les limites de la domestication et enfin de prévoir les risques de l'intensification de la culture des ignames.

Pour ce faire, la démarche de la deuxième phase de l'étude consistera à :

- retourner sur les sites de collecte en vue de récolter les feuilles et les tubercules des ignames sauvages ayant réagi positivement au test ACP-ELISA pour l'identification du YMV et la caractérisation moléculaire des souches de potyvirus identifiées en utilisant la PCR .

- poursuivre la collecte d'autres échantillons (feuilles et tubercules) d'ignames spontanées et de celles qui sont en cours de domestication dans d'autres localités du Togo en se basant surtout sur l'observation des symptômes sur les feuilles. Il sera également prélevé des échantillons de feuilles d'ignames cultivées. Pour cela les prospections seront faites à une période où il y a encore de la verdure c'est-à-dire entre les mois de Juillet et Septembre.

- les échantillons seront analysés par les tests ACP et DAS-ELISA pour l'identification des potyvirus dont YMV. Les échantillons qui auront réagi positivement aux tests, seront analysés par la PCR pour la caractérisation moléculaire des virus.

- il sera comparé les souches de potyvirus des espèces d'ignames sauvages et celle des formes cultivées.

La recherche des modes de transmission des potyvirus infectant les ignames spontanées, sera faite dans l'habitat naturel des plantes par études symptomatologiques sur plants de *Nicotiana benthamiana* et au laboratoire par inoculation avec *Aphis crassivora*, vecteur reconnu des potyvirus des ignames cultivées. Certaines souches des potyvirus peuvent servir au criblage des ignames spontanées pour rechercher des cultivars résistants ou tolérants.

Les connaissances acquises durant ce stage peuvent nous permettre de réaliser cette deuxième partie des études dans notre laboratoire d'origine si nous disposons tout le matériel nécessaire. Ainsi pour la suite des travaux nous aurons besoin du matériel suivant :

- un thermocycleur
- un spectrophotomètre (lecteur de plaques ELISA)
- des anticorps et autres réactifs pour le test ELISA et la PCR;
- des plaques ELISA
- du matériel et réactifs pour la culture *in vitro*.

- et aussi des moyens financiers pour la réalisation des prospections.

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 au procédé de cryoconservation, mis au point sur l'igname par Malaurie et Trouslot, nous avons appliqué le procédé sur un génotype du complexe *D. cayenensis-D. rotundata*. Les résultats observés à 15 jours semblent ne pas correspondre totalement à ceux observés sur 2 génotypes d'igname appartenant à deux espèces *D. alata* et *D. bulbifera* (Malaurie et al. 1998). Cette différence pourrait être expliquée, soit par au niveau technique d'application du procédé lors de cette première familiarisation, 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 Dewar, ...), et surtout de l'assurance de pouvoir compter sur un approvisionnement régulier en azote liquide.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adjata, K.D., 1991. Application du test Immuno-enzymatique (test ELISA) à la détection des potyvirus de l'igname (*Dioscorea spp*). Mémoire de fin d'études agronomiques n°90/01/PV – E.S.A. –UB. (Lomé-Togo), 122p.
- Anonyme, 1991. L'amplification enzymatique (PCR). Technique future de détection des agents phytopathogènes. Phytoma 430 : 48p. Numéro spécial.
- Berthaud J., Bousalem M., Daïnou O., Dubern J., Malaurie B., Tostain S., 1998. Can yam domestication and participatory breeding be new ways to improve this crop and conserve its genetic resources ? 7th Triennial Symposium of the International Society for Tropical Root Crops.-Africa Branch (ISTRC-AB), Cotonou, Bénin, 11-17 Oct. 1998, Abstract of an oral communication, p. 109
- Bousalem, M., Pinel, A., Dubern, J., Frutos, R., Fargette, D., 1997. Evaluation de la variabilité moléculaire du virus de la mosaïque de l'igname. Compte rendu des 6^{ième} rencontres de virologie végétale, I.N.R.A.-C.N.R.S. ?9-13 Mars 1997, Aussois,
- Coursey, D.G., 1967. Yams. Longman. London. 230p.
- Dallot S., Bousalem M., 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. 7th Triennial Symposium of the International Society for Tropical Root Crops.-Africa Branch (ISTRC-AB), Cotonou, Bénin, 11-17 Oct. 1998, Poster Abstract.
- Gumedzoe, Y.M.D., Plante, E., Thottappilly, Thouvenel, J.-C., 1991. Importance des maladies virales de l'igname au Togo. In Proc. 4th triennial symposium I.S.T.R.C.-Africa Branch, Kinshasa (Zaire), 5-8 déc. 1989 ; 295-301.
- Gumedzoe, Y.M.D., 1996. Mise au point de méthodes simples d'identification des potyvirus infectant les ignames (*Dioscorea alata* L. et *D. rotundata* Poir) dans un programme de production de semenceaux au Togo. Rapport d'activités 1991 –1994. Bourse de recherches FIS C/1143-2. 61p.
- Institut National des Cultures vivrières(INCV), 1993. La Recherche sur l'igname. Assemblée Générale constitutive et premier séminaire du Réseau Igname en Afrique. Ministère du Développement rural, Lomé-Togo, 16p.
- 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 3rd 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. 7th Triennial Symposium of the International Society for Tropical Root Crops.-Africa Branch (ISTRAC-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>.
- Porth, A. and Nienhaus, F., 1983. *Dioscorea alata* Ring mottle virus, a new potyvirus of yam in Togo. *Z. Pflkrankh. Pflschutz*, 90. pp 352-362
- Reckaus, P., 1979. A virus disease of white yam (*Dioscorea rotundata*) in Togo. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 86(12) pp 763-766
- Thouvenel, J.-C. et Dumont, R., 1990. Pertes de rendement de l'igname infectée par le virus de la mosaïque en Côte d'Ivoire. *Agronomie Tropicale* 45 : 125-129.
- Urbino, C., Bousalem, M., Pinel, A., Dubern, J., Frutos, R., Fargette, D., 1997. Les virus de l'igname, caractérisation immunologique et moléculaire du virus de la Mosaïque de l'igname. Séminaire International : <l'igname plante séculaire et culture d'avenir>, 3-6 juin 1997, Montpellier-France.

Remerciements

Nous ne saurions terminer ce rapport sans adresser nos remerciements sincères aux Responsables de l'APELF – UREF, sponsor du présent projet, aux organisateurs du stage et à tous ceux qui nous ont encadré, nous voulons nommer MM :

- Malaurie B. (IRD - Genetrop)
- Berthaud J. (IRD - Genetrop)
- Bousalem M. (IRD – LPRC au CIRAD).

Nous remercions également les Responsables des deux Institutions qui nous ont accueilli, notamment les Responsables des laboratoires, LPRC et Genetrop ainsi que leur personnel technique : Mlle C. Rostano et Mr. J. Arribi. au LPRC.

Nous tenons à témoigner toute notre reconnaissance au Professeur Gumedzoe, M.Y.D. un des promoteurs du projet, pour nous avoir donné l'occasion de prendre part à ce stage.

Protocole de l'identification de YMV par IC-RT-PCR

I- Immunocapture

- *Coating des tubes immunocaptures*

Les tubes d'immunocapture, tubes Robbins, ont été sensibilisé avec un anticorps monoclonal Mab 351 dilué au 1/200 dans du tampon carbonate (composition en annexe 1). 100µl de solution sont déposés dans chacun des tubes. Les tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant 4 heures.

- *Rinçage :*

les tubes sont rincés une fois au PBS-Tween 20 (0,05%) autoclavé. Ils sont utilisés immédiatement ou conservés à -20°C.

- *Préparation du matériel végétal et dépôt des extraits :*

0.25 g de tubercules est prélevé dans la partie proximale des tubercules (tête de tubercule) puis broyé dans 5ml de tampon d'extraction constitué du PBS + PVP 2% + DIECA 0,45%. Ici, le DIECA est ajouté extemporanément au tampon. Pour les échantillons de feuilles, 0.5 g est broyé dans le même tampon. Les extraits sont clarifiés à la centrifugeuse réfrigérante à 10.000tr/mn pendant 5mn. 100µl de surnageant sont déposés dans chaque tube. Les tubes sont incubés à 4°C pendant une nuit.

- *Rinçage :*

Les tubes sont rincés deux fois dans du PBS-T puis une fois dans l'eau DEPC. L'eau DEPC a une activité anti-ARNase ce qui éviterait une éventuelle dégradation de l'ARN viral. Les tubes sont utilisés immédiatement ou conservés à -20°C.

II – Transcription reverse et amplification couplée

Le milieu réactionnel est ajouté au contenu immunocapturé des tubes. La transcription reverse et l'amplification durent trois heures.

- *Préparation du milieu réactionnel pour un tube.*

	50µl	25µl
- Triton X 100 1.7%	6µl	3µl
- TAMPON 10X Hi-taq	5µl	2.5µl
- dNTP à 2.5 mM chacun	5µl	2.5µl
- Amorces YMV poly 1 à 100pmol	0.5µl	0.25µl
- Amorces YMV poly 2 à 100pmol	0.5µl	0.25µl
- AMV Rtase pharmacia (13.67 U/µl) 2U (feuille) soit	0.14µl	0.07µl
4U (tubercule) soit	0.28µl	0.14µl
- Hi-Taq bioprobe (5U/µl) 1U soit	0.2µl	0.1µl
- Eau ultrapure	32.66µl	16.33µl

- *Paramètres d'exécution de la transcription reverse et l'amplification*

	Température	durée
Rétro-transcription	42°C	45mn
Dénaturation	95°C	5mn
<hr/>		
Dénaturation	92°C	20s
Hybridation	52°C	20s
Elongation	72°C	40s
<hr/>		
Elongation	72°C	10mn

- *Analyse des amplifiats*

L'analyse des amplifiats a été faite sur gel d'agarose à 1% préparé dans le tampon Tris borate EDTA.

Un mélange de 14µl d'amplifiat + 6µl de bleu de bromophénol sont déposés dans les encoches faites dans le gel d'agarose et la migration a été réalisée dans du tampon tris borate EDTA (TBE) à 120V pendant 50mn.

- *Révélation des bandes*

Après l'électrophorèse, le gel d'agarose est coloré au bromure d'éthidium qui permet alors une visualisation des bandes électrophorétiques à la lampe UV. La coloration dure entre 15 à 25mn .

Protocole de l'identification des potyvirus dans les tubercules d'igname par la méthode immuno-enzymatique ACP – ELISA

L'identification des potyvirus a été réalisée suivant le protocole ci-après :

- *Coating des plaques ELISA*

Des fragments de 0.25g sont prélevés dans la partie proximale des tubercules (tête de tubercule) puis broyés dans 5ml de tampon coating + 2% de PVP (composition en annexe 1). Le broyat est centrifugé 8000tr/mn pendant 5mn. 100µl de surnageant sont déposés dans chacune des alvéoles des plaques qui sont ensuite incubées à 37°C pendant 2 heures. Les plaques sont rincées quatre fois dans du PBS-T 1X ; 1 premier rinçage rapide suivi de 3 autres rinçages de 3mn.

- *Saturation des plaques.*

200µl de PBS-T additionné de lait écrémé 3% sont déposés dans chacun des puits (tous les puits sont remplis). L'incubation des plaques à 37°C pendant 1h est suivie d'un rinçage de 3mn dans du PBS-T 1X.

- *Dépôt du premier anticorps.*

Dépôt de 100µl/puits d'anticorps monoclonal universel anti-potyvirus dilué à 1/400 dans du PBS-T 1X +PVP 2% + BSA 0,2%. L'incubation des plaques une nuit à +4°C ou à 37°C pendant 3h est suivie d'un premier rinçage rapide puis de trois rinçages de 3mn.

- *Dépôt du deuxième anticorps.*

Dépôt de 100µl/puits d'anticorps anti-souris conjugué à la phosphatase alcaline dilué au 1/200 dans du PBS-T 1X +PVP 2% + BSA 0,2%. L'incubation des plaques à 37°C pendant 3h est suivie d'un rinçage rapide puis de 3 rinçages de 3mn.



- *Dépôt du substrat*

Dépôt de 100µl/puits de PNP dissout dans le tampon diéthanolamine à raison de 1 comprimé pour 5ml de tampon. Les plaques ont été incubées à la température ambiante pendant 1h ou plus.

La D.O. des plaques est lue au spectrophotomètre à 405nm après 30mn, 1h, 13h, 20h, 23h. Les échantillons dont les D.O. sont supérieures ou égales à deux fois les D.O. des témoins négatifs, sont considérées comme positifs. Les D.O. prises en compte sont fixées à 0.1 et plus.

COMPOSITION DES SOLUTIONS UTILISEES EN IMMUNOLOGIE

Solution de rinçage : PBST 0.05% (1l, 10X)

NaCl	79,5g
KH ₂ PO ₄	1,9g
Na ₂ HPO ₄ , 12H ₂ O	28,6g
Ou Na ₂ HPO ₄ , 2H ₂ O	14,24g
Ou Na ₂ HPO ₄ , anhydre	11,36g
KCl	1,93g
Eau distillée	qsp 1l

Vérifier que le pH soit pou la solution 10X
Ajouter 5ml de Tween 20
Ajuster le pH avec HCl ou NaOH
Ajuster le tout à 1l avec de l'eau distillée
Conserver la solution 10X à la température ambiante.
Le pH de la solution 1X est de l'ordre de 7,4.

Tampon coating (500ml, 1X) pH 9,6 environ

Na ₂ CO ₃ (concentration finale = 15mM)	0.79g
NaHCO ₃ (concentration finale = 34mM)	1,425g
Eau distillée	qsp 500ml

Conserver à 4°C

Tampon substrat pH 9,8 pour PNPP (1l, 1X)

Diéthanolamine	98ml
Eau distillée	qsp 1l

Ajuster le pH à 9,8 avec HCl 10N
Conserver à °c

Tampon de révélation pour le NBT/BCIP (200ml, 1X)

Tris (concentration finale = 0,1M)	2,42g
------------------------------------	-------

Ajuster le pH à 9,5 dans 100ml d'eau distillée.
Ajouter :

NaCl (concentration finale = 0,1M)	1,17g
MgCl ₂ (concentration finale = 5mM)	0,2g
Eau distillée	qsp 200ml

Pour 10ml de tampon utiliser :

NBT à 60mg/ml	25µl
BCIP à 15mg/ml	50µl

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 génotypes, 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 génotypes

Six boutures uni-nodales par génotype 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 génotype C1 virosé du cultivar d'igname, « Igame de Pilimpikou ». Les plants traités sont des vitroplants obtenus à partir de microboutures uninodales cultivées *in vitro* sur le milieu MS50 contenant du charbon actif (Malaurie *et al*, 1995).

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 ont été encapsulés dans une solution d'alginate de sodium que l'on fait précipiter dans une solution de Chlorure de Calcium (CaCl₂) 100mM.



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. La dessiccation a été également réalisée suivant le précédent protocole.

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°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 micro-éléments du milieu 2GGC (Maurie et al, 1998), sans charbon actif, additionné de 50g/l saccharose, 1mg/l BA et de 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