

CONTRAT C.E.E. ,
Université Nationale de Côte d'Ivoire

I. I. R. S. D. A. et O R S T O M

N° TSD 2A-0116-CI (CD)

AMELIORATION ET VALORISATION
DE L'IGNAME

RAPPORT DE SYNTHESE

par

Jean DUBERN

Programme CEE n°TSD 2A-0116-CI (CD)**RAPPORT DE SYNTHESE**

par**Jean DUBERN****INTRODUCTION**

Le programme <<Amélioration et Valorisation de l'igname >> a été l'objet d'un contrat international, n° TSD 2A-0116-CI (CD), entre la C E E, l'Université Nationale de Côte d'Ivoire (U.N.C.I., Faculté des Sciences) et l'Institut International de Recherche Scientifique pour le Développement à Adiopodoumé (I.I.R.S.D.A.), contrat signé le 06 février 1989 .

L'avenant n°2, signé le 07 décembre 1990 entre les co-contractants et l'ORSTOM, a substitué l'ORSTOM à l'I.I.R.S.D.A. pour les actions prévues dans les Laboratoires de Génétique et de Phytovirologie de l'I.I.R.S.D.A., et autorisé le développement de ces actions depuis d'autres structures: Laboratoire des Ressources Génétiques et d'Amélioration des Plantes Tropicales (L.R.G.A.P.T., Centre ORSTOM de Montpellier), Laboratoire de Phytovirologie des Régions Chaudes CIRAD-ORSTOM (L.P.R.C., Centre CIRAD de Montpellier), Laboratoire d'Immunochimie de l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire (I.B.M.C.-C.N.R.S., Strasbourg).

Conséquence de cette évolution, ces actions ont débuté avec un très important retard; les premières attributions budgétaires, au titre de ce projet, n'ont été effectuées qu'en septembre 1991. Constatant cette situation, la C.E.E. a accepté de prolonger de 18 mois le contrat initial, reportant l'échéance au 01 septembre 93.

Pris globalement les résultats des traitements par la ribavirine sont les suivants: 3 clones sur 18 sont estimés non sains après traitement soit 17 %, alors que 4 sur 13 le sont sans traitement, soit 31 %.

3 - Indexation de la collection de vitroplants d'Igname du L.R.G.A.P.T./ORSTOM

Une indexation vis à vis du virus de la Mosaïque de l'Igname (YMV), du virus Y de la Pomme de terre (PVY), du virus de la Mosaïque du Concombre (CMV), du virus X de la Pomme de Terre (PVX) a été entreprise. Cette indexation a été menée par immunologie, microscopie électronique, et par inoculation mécanique à une gamme d'hôtes sensibles.

Dans une première série de vitroplants indexés, le virus X de la Pomme de terre (PVX) a été détecté dans un vitroplant du complexe *D. cayenensis-D. rotundata*, en provenance de Côte d'Ivoire et non traité à la Ribavirine. Cette détection, négative quand effectuée directement sur le vitroplant, a été obtenue après transmission mécanique à *Nicotiana benthamiana* et confirmée par observation au microscope électronique. Dans cette même série, le virus de la Mosaïque du Concombre (CMV) a pu être détecté dans un vitroplant du complexe *D. cayenensis-D. rotundata*, également en provenance de Côte d'Ivoire, réputé malade et non traité à la Ribavirine. Le virus Y de la Pomme de terre (PVY) n'a pas été détecté.

Dans une seconde série de vitroplants de la collection du L.R.G.A.P.T., il a été détecté dans plusieurs plants un virus sérologiquement relié au PVX, et, également dans plusieurs autres vitroplants, des virus reliés sérologiquement au CMV et au PVY. Ces souches sont en cours d'identification précise.

4 - Production d'anticorps monoclonaux anti-YMV

29 anticorps monoclonaux ont été produits. 23 de ces monoclonaux se sont révélés détecter la souche de référence YMV-12, souche ivoirienne de référence ayant permis la production de ces anticorps.

L'ensemble des anticorps a été testé contre 15 isolats provenant du Burkina Faso (8), du Cameroun (2), de la Guadeloupe (3), de la Guyane (1) et du Nigéria (1). La technique ELISA, en double sandwich indirect polyclonal-monoclonal (DAS), a été utilisée.

5 - Diversité biologique du YMV

Les résultats montrent une grande diversité biologique des isolats du virus de la Mosaïque de l'Igname. Les anticorps monoclonaux permettent de différencier les isolats du Burkina Faso provenant de la région Centre et de ceux de la région Sud-Ouest : 5 anticorps monoclonaux ne détectent que les isolats de la région Centre; 8 anticorps monoclonaux ne détectent que les isolats de la région Sud Ouest; 10 anticorps monoclonaux détectent certains isolats dans les deux régions.

En outre, en combinant les anticorps monoclonaux, il est possible de reconnaître tous les isolats.; ce résultat permet d'envisager un kit de diagnostic de type ELISA mettant en jeu anticorps polyclonaux et anticorps monoclonaux.

6 - Comparaison du YMV et de 5 potyvirus africains

Le virus de la Mosaïque de l'Ignome apparaît distant des autres potyvirus africains: 5 potyvirus (Peanut Mottle Virus, Pepper Veinal Mottle Virus, Sugar Cane Mosaic Virus, Grounut Eyespot Virus, Datura Shoestring Virus) n'ont pas réagi avec un mélange de 3 monoclonaux détectant pourtant l'ensemble des isolats d'YMV disponibles.

7 - Distribution géographique du Virus de la Mosaïque de l'Ignome au Burkina Faso

Dans les trois régions prospectées, un virus sérologiquement relié au YMV a pu être détecté. La Région Centre apparaît la plus infectée par YMV : 80-90 % ; la Région Sud-Ouest supporte un taux d'infection encore important : 10-30 %; quant à la Région Sud elle reste relativement peu infectée : 0-15 %.

Le taux exceptionnel observé dans la Région Centre, éloignée des autres zones de culture de l'Ignome, peut être lié aux techniques agricoles utilisées, à l'absence d'introduction de variétés nouvelles, mais surtout, et très probablement, à la spécificité de la variété cultivée dans cette région; cette variété de *D. cayenensis*, dite Ignome de Pilimpikou, est proche, par ses caractères morphologiques, du complexe savanicole *D. abyssinica* / *D. lecardii* / *D. sagittifolia*.. L'isolement de cette zone de culture, le peu d'échanges pratiqués entre celle-ci et les autres zones de culture de l'Ignome, et le fort pourcentage de plantes contaminées en font une zone à caractéristiques écologiques très particulières.

8 - Présence du virus de la Mosaïque de l'Ignome en Guyane et aux Caraïbes

Il a été mis en évidence la présence du Virus de la Mosaïque de l'Ignome sur Ignome (*Dioscorea trifida*) en Guyane. Sa transmission par pucerons a été précisée: *Myzus persicae*, *Aphis gosypii*, *Aphis spiraecola*, *Macrosiphon euphorbiae*, *Rhopalosiphon padi*; tous les pucerons ont permis la transmission (mode non persistant), avec une efficacité variable selon les genres.

Les protéines de capsides des divers isolats ont été analysées (électro-immunoblot assay) avec deux sérums anti-YMV (souche ivoirienne et souche guadeloupéenne).; cette étude a permis de rapprocher la souche de Guyane étudiée d'une souche ivoirienne et d'une souche guadeloupéenne, mais de la différencier d'autres souches en provenance de Guadeloupe et du Cameroun.

9 - Valorisation

En combinant les anticorps monoclonaux il est possible de reconnaître tous les isolats actuellement rassemblés; ce résultat permet d'envisager un kit de diagnostic de type

ELISA mettant en jeu anticorps polyclonaux et anticorps monoclonaux. Des contacts ont donc été établis avec une société privée pour programmer cette valorisation.

Ces travaux sont concrétisés par 14 publications (acceptées, soumises, en préparation, communications) dont la liste est jointe ci-après: 5 communications, 1 publication acceptée, 3 publications soumises, 5 publications en préparation.

Boeglin M., G. Labonne, L. Degras, L. Quiot-Douine et J.-B. Quiot. Mise en évidence de la présence du Virus de la Mosaïque de l'Ignome sur Ignome (*Dioscorea trifida*) en Guyane. Caribbean Food Crop Society, Congrès juillet 1993, Martinique. (*communication*)

Goudou-Urbino C., L. Degras et J.-B. Quiot. Epidemiological study of yam mosaic virus in Guadeloupe (FWI) to formulate disease-control strategies. Caribbean Food Crop Society, Congrès juillet 1993, Martinique. (*communication*)

Goudou-Urbino C., G. Konate, J.-B. Quiot, L. Givord et J. Dubern. Etude immunologique du virus de la Mosaïque de l'Ignome. First Seminar of Yam Network in Africa, Oct. 26-28.10.1993, Cotonou Bénin. (*communication*)

Goudou-Urbino C., G. Konate, J.-B. Quiot, L. Givord et J. Dubern. Immunological Studies of Yam Mosaic Virus. Phytopathology (*en préparation*)

Goudou-Urbino C., G. Konate, J.-B. Quiot et J. Dubern. Distribution géographique du virus de la Mosaïque de l'Ignome au Burkina Faso. Société d'Ecophysiologie, séance du 14 mai 1993, Ecole Normale Supérieure, rue d'Ulm, Paris France. (*communication*).

Goudou-Urbino C., G. Konate, J.-B. Quiot et J. Dubern. Geographical distribution and biodiversity of yam mosaic virus. Tropical Science. (*en préparation.*)

Malaurie B., O. Pungu, J. Dubern and J.-C. Thouvenel. 1992. Determination of the best conditions for the regeneration of microplants and the elimination of YMV from excised meristems of yam nodal cuttings (*Dioscorea* spp.). Association of Applied Biologists. Plant Virology in the Tropics. University of York. 9-10 April 1992.

Malaurie B., O. Pungu and J.-C. Thouvenel. Search for optimal factors in production of rooted plantlets from excised meristems and shoot tips of yam nodal cuttings (*Dioscorea* spp). (*soumis à publication*)

Malaurie B., O. Pungu and M.-F. Trouslot. Meristem-tip culture from two clones of *Dioscorea cayenensis-D. rotundata* complex and *D. praehensilis*. Influence of media on morphological development. (*soumis à publication*)

Malaurie B., J.-C. Thouvenel and O. Pungu. Meristem-tip culture from two clones of *Dioscorea cayenensis-D. rotundata* complex and *D. praehensilis*. Influence of meristem-tip size and location on morphological development. (*soumis à publication*)

Malaurie B., and J.-C. Thouvenel. Influence de la température et d'un agent antiviral (Virazole), sur l'obtention de plantes indemnes de virus de la Mosaïque l'Igname (YMV) à partir de microboutures nodales virosées de *D. praehensilis*. (*en préparation*)

Malaurie B., J. Dubern and J.-C. Thouvenel. Influence de la température et de la chimiothérapie, associées ou non, sur l'obtention de plantes indemnes de virus de la Mosaïque de l'Igname (YMV), à partir de méristèmes isolés de deux clones virosés de *D. praehensilis* et du complexe *D. cayenensis-D. rotundata* cv. Kouba. (*en préparartion*)

Malaurie, B., O. Pungu, R. Dumont and M.-F. Trouslot. 1993. The creation of an *in vitro* germplasm collection of yam (*Dioscorea* spp.) for the genetic resources preservation. *Euphytica*. **65**:113-122.

Thouvenel J.-C. et B. Malaurie. L'utilisation de la technique ELISA pour le contrôle de l'état phytosanitaire d'une collection de microboutures d'Igname (*Dioscorea* spp.) maintenues *in vitro* (*en préparation*).

Action de formation

Des actions de formation ont été réalisées:

- formation doctorale (2 ans) de Mme Cica GOUDOU-SINHA dont le sujet de thèse est <<Ecologie et épidémiologie du Virus de la Mosaïque de l'Igname dans le Sud du Burkina-Faso; application au raisonnement d'une méthode de lutte et à l'étude de la diversité d'un potyvirus.>> et dont le travail aura été effectué pour moitié au L.P.R.C./Montpellier (France) et pour moitié à l'IN.E.R.A./Kamboinsé (Burkina Faso). La soutenance de thèse de Mme Cica GOUDOU-URBINO est prévue pour octobre 1994 à l'Université de Montpellier.
- formation universitaire, stage de licence de Mlle Karine LACOTTE (2,5 mois).

- épidémiologie du YMV dans les pays du golf de Guinée: Côte d'Ivoire, Bénin , Togo, pays à forte production d'Igname (L.P.R.C.-ORSTOM , I.I.R.S.D.A. et I.D.E.S.S.A. Côte d'Ivoire, Université de Côte d'Ivoire, IN.E.R.A. Burkina Faso, Réseau Igname),
- étude de diagnostic des virus de l'Igname en Afrique de l'Ouest d'Ivoire (L.P.R.C.-ORSTOM, I.I.R.S.D.A. et I.D.E.S.S.A. Côte d'Ivoire, Université de Côte d'Ivoire, IN.E.R.A. Burkina Faso, Réseau Igname),
- étude moléculaire du YMV (I.L.T.A.B.-ORSTOM/S.C.R.I.P. USA, Université des Sciences Agronomiques de Gembloux Belgique, L.P.R.C.-ORSTOM),
- transformation génétique de *Nicotiana benthamiana* , et production de résistants au YMV (stratégie de la protéine capsidale) (I.L.T.A.B.-ORSTOM, L.P.R.C.-ORSTOM),
- transformation génétique de *Nicotiana benthamiana* , et production de résistants au YMV (stratégie de la protéine de transport P1) (Université des Sciences Agronomiques de Gembloux Belgique, L.P.R.C.-ORSTOM),
- transformation génétique de l'Igname et production de résistants au YMV; application à l'Igname des résultats des projets précédents (Wye College, Université de Londres, Grande Bretagne),
- contrôle de la résistance obtenue par transformation génétique (I.N.R.A.-Guadeloupe, I.I.R.S.D.A. et I.D.E.S.S.A. Côte d'Ivoire, IN.E.R.A. Burkina Faso).

AMELIORATION ET VALORISATION DE L'IGNAME

Contrat n° TSD 2A-0116-CI (CD)

RELEVÉ DES DÉPENSES

RECAPITULATIF

(francs français)

PERSONNEL (dont frais d'allocation 164 000*)	2 141 000 FF	324 394 ECU
DEPLACEMENTS *	37 287 FF	5 650 ECU
UTILISATION DE MATERIEL DURABLE	245 000 FF	37 121 ECU
MATERIEL NON-DURABLE *	411 007 FF	62 274 ECU
FRAIS DE LABORATOIRE DE KAMBOINSE *.....	47 400 FF	7 182 ECU
<hr/>		
TOTAL	2 881 694 FF	436 621 ECU

PARTICIPATION DE LA CEE (lignes marquées par *) ... 659 694 FF **99 954 ECU**
(quatre vingt dix neuf mille neuf cent cinquante quatre ECU, au taux moyen en 1993 de 6,60 FF/ECU)

Soit **23 %** de **436 621 ECU**

L.P.R.C. CIRAD-ORSTOM
Montpellier le 03.01.1994

Jean DUBERN

RELEVÉ DES DÉPENSES

Personnel

Nom	Institut	Localisation	Catégorie	Duré	Coût
J. DUBERN	ORSTOM	Montpellier	Chercheur	16 mois	562 000
L. GIVORD	ORSTOM	Strasbourg	Chercheur	6 mois	236 000
B. MALAURIE	ORSTOM	Montpellier	Chercheur	27 mois	896 000
J. ARIBI	ORSTOM	Montpellier	Technicien	5 mois	103 000
J.-B. QUIOT	I.N.R.A.	Montpellier	Chercheur	4 mois	180 000
C. GOUDOU-URBINO	ORSTOM	Montpellier/ Ouagadougou	Allocataire	24 mois	164 000 *
				TOTAL	2 141 000 FF

Les valeurs avancées sont des estimations en fonction des barèmes de l'Institut (note D.G. du 22.06.93)

* Seule cette allocation est effectivement comptabilisée dans les frais à la charge du Contrat CEE

RELEVÉ DES DÉPENSES

DEPLACEMENTS

COMMANDE	DESIGNATION	DATE	FOURNISSEUR	FACTURE	MONTANT	CHERCHEUR
1992						
8011	York 8/4/92	26/03/92	MERIDIONALE V.	30512	5 300,00	DUBERN
8011	Frais York	26/03/92		8011	5 532,90	DUBERN
8057	Strasbourg 24/5/92	20/05/92	MERIDIONALE V.	33519	1 465,00	DUBERN
8057	Frais Strasbourg	20/05/92		8057	1 942,94	DUBERN
8149	Paris 21/07/92	19/06/92	MERIDIONALE V.	37905	490,00	GOUDOU- URBINO
8149	Montpellier 21/7/92	19/06/92		8149	18 406,00	GOUDOU- URBINO
8283	Angers 13/07/92	26/03/92	MERIDIONALE V.	37022	1 077,00	B. MALAURIE
1993						
2345	Mission Burkina	03/02/93		2345	3 600,00	C. GOUDOU- URBINO
2346	Mission Burkina	03/02/93		2346	550,00	C. GOUDOU- URBINO
				TOTAL	37.286,84 FF	

RELEVÉ DES DÉPENSES

Utilisation de Matériel Durable

Dénomination	Valeur	% Amortissement	% Utilisation	Montant
Centrifugeuses	400 000	15	10	12 000
Serres / chambres climatiques	600 000	15	50	90 000
Microscope électro.	1 200 000	15	5	18 000
Appareils Labo	2 500 000	25	10	125 000
			TOTAL	245 000 FF

RELEVÉ DES DEPENSES

Matériel Non Durable

COMMANDE	DESIGNATION	DATE	FOURNISSEUR	FACTURE	MONTANT	CHERCHEUR
1991						
17662	Produits chimiques	6/10/91	SIGMA Chimie	279622	1 050,00	DUBERN
17661	Fournitures serres	7/10/91	COCIPA-AGRIFLOR	9110.0486	181,50	DUBERN
17663	Matériel Labo	8/10/91	POLY LABO-BLOCK	846289	4 069,61	DUBERN
17660	Lecteur ELISA	17/10/91	TECAN FRANCE S.A.	11.09.294	18 000,00	DUBERN
17672	Matériel informat.	4/11/91	SIVEA Informatique	A910251	17 663,00	MALAUURIE
17673	Produits chimiques	4/11/91	BAECKROOT LABO	16145	12 245,99	MALAUURIE
17674	Matériel Labo	4/11/91	OSI	110750	1 472,14	MALAUURIE
20201	Matériel Labo	7/11/91	OSI	112878	13 501,78	QUIOT
20206	Matériel informat.	18/11/91	SIVEA Informatique	A910379	29 045,00	MALAUURIE
20205	Aménagement Labo	27/11/91	DEQUEKER YVES	91304	24 479,00	MALAUURIE
20210	Matériel Labo	13/12/91	LABO MODERNE	89084	402,00	MALAUURIE
20211	Cryostat	16/12/91	BIOBLOCK Scientific	341051/38348	24 087,56	GIVORD
20209	Matériel Labo	10/12/91	BIOBLOCK Scientific	0341051/60867	811,68	MALAUURIE
1992						
20212	Carbonage de grilles	31/01/92	USTL. L. Microscopie	902/50/H805	140,00	DUBERN
20223	Cuve spectrophoto.	10/02/92	BECKMAN Instrument	286369	1 480,00	GIVORD
20224	Matériel Labo	10/02/92	POLY LABO-BLOCK	873375	1 771,58	GIVORD
20225	Carboglace	13/02/92	MIDI Sécurité	92.02.201	415,00	DUBERN
21527	Fournitures serres	16/03/92	COCIPA-AGRIFLOR	9203.0804	907,95	DUBERN
21528	Produits Chimiques	19/03/92	POLY LABO-BLOCK	885988	755,83	DUBERN
21529	Matériel Labo	19/03/92	BECHMAN Instrument	288189	1 256,00	DUBERN
21530	Produits Chimiques	26/03/92	INTERCHIM	158424	1 780,20	GIVORD
21532	Produits Chimiques	30/03/92	SIGMA Chimie	312354	1 225,00	GIVORD
21533	Matériel Labo	30/03/92	GRACE S.A.R.L.	92015579	2 770,00	GIVORD
21535	Matériel Labo	31/03/92	POLY LABO-BLOCK	892171	3 325,00	GIVORD
21536	Photocopie	31/03/92	TIROPLAN	90492	187,19	DUBERN
21538	Cryoconservateur	31/03/92	POLY LABO-BLOCK	888008	5 541,20	DUBERN
21898	Photocopies	31/03/92	OERSCI	0320	2 640,19	MALAUURIE
21539	Index phytosanitaire	1/04/92	ACTA Publications	04057	125,34	DUBERN
0207/92	Fournitures Labo.	2/04/92	BRICORAMA	2444	3 202,62	G.-URBINO
0329/92	Fournitures serres	10/04/92	CIRAD Magasin	920027	566,20	DUBERN
21950	Produits Chimiques	22/04/92	BOEHRINGER	D220408C	1 588,18	MALAUURIE
21973	Tubes à centrifuger	22/04/92	BEYNEIX . G. (S.A.)	92101289	1 425,00	MALAUURIE
21875	Produits Chimiques	23/04/92	BAECKEROOT Labo	17597	1 527,98	DUBERN
21541	Aménagement Labo	28/04/92	POLY LABO-BLOCK	898852	7 028,87	DUBERN
21543	Aménagement Labo	30/04/92	CASTORAMA	009031	637,44	DUBERN
22631	Produits Chimiques	6/05/92	GIBCO BRL	522392	2 286,50	MALAUURIE
22632	Matériel Labo	6/05/92	POLY LABO-BLOCK	898472	3 459,77	MALAUURIE
22681	Traduction	7/05/92	SESAME	220/92	1 400,00	MALAUURIE
22758	Matériel Informat.	7/05/92	GASPARD	197281	1 117,58	MALAUURIE
22760	Matériel Labo	11/05/92	MARCORELLES Plast	447	2 175,00	MALAUURIE
22851	Matériel Labo	11/05/92	OSI	163987	3 314,90	MALAUURIE
22634	Produits Chimiques	12/05/92	AMERSHAM FRANCE	854356	2 688,00	MALAUURIE
22767	Photocopies	19/05/92	OERSCI	555	1 609,55	MALAUURIE
22768	Matériel Informat.	22/05/92	SELEC.Informatique	9005210	671,20	MALAUURIE
22769	Matériel Informat.	22/05/92	SELEC.Informatique	9005481	5 359,00	MALAUURIE
21544	Matériel Labo	26/05/92	POLY LABO-BLOCK	901854	13 560,44	QUIOT
22642	Produits Chimiques	26/05/92	AMERSHAM FRANCE	856182	2 688,00	MALAUURIE
21546	Matériel Divers	3/06/92	PHYTOSCIENCE	92/06/0080	14 651,20	DUBERN
21547	Moteur Ultra Turex	5/06/92	BIOBLOCK Scientific	98254	7 195,20	G-URBINO
21548	Matériel Divers	5/06/92	POLY LABO-BLOCK	906542	792,07	DUBERN
21549	Photographie	9/06/92	PHOTO VISION	1755	177,90	DUBERN
21550	Photographie	10/06/92	TIROPLAN	21550	285,00	DUBERN

RELEVÉ DES DEPENSES

Matériel Non Durable (suite)

COMMANDE	DESIGNATION	DATE	FOURNISSEUR	FACTURE	MONTANT	CHERCHEUR
1992 suite						
22858	Matériel Labo	10/06/92	CLAPIERS SERVICE	6	4 608,00	MALAURIE
23426	Produits Chimiques	11/06/92	BOEHRINGER	F150590C	2 025,00	DUBERN
22693	Traduction	19/06/92	MARSH DAVID	3	500,00	MALAURIE
23431	Photocopies	21/07/92	Tiroplan	07/1942	336,42	DUBERN
23433	Photographies	30/07/92	Photovision	1871	445,19	DUBERN
22870	Produits chimiques	18/08/92	Merck Laboratoires	38134319	4 505,00	MALAURIE
24584	Abonnement	29/09/92	Europériodiques	019-431	5 697,46	MALAURIE
24585	Abonnement	29/09/92	Lavoisier Abonnem.	21112478	2 485,25	MALAURIE
24881	Photographies	29/10/92	Photovision	2035	204,46	DUBERN
24882	Matériel informatique	05/11/92	JWP Information Syst	A901027	1 700,84	MALAURIE
F101.04	Affranchissements	06/11/92	ORSTOM	17	118,21	DUBERN
24886	Photographies	10/11/92	Photovision	2023	526,30	DUBERN
24887	Animaux	16/11/92	INRA Régiss Recètes	24/13606	255,92	DUBERN
24888	Alimentation Lapins	16.11.92	UAR Usine Aliment.	211362	471,00	DUBERN
24889	Papèterie Lapins	16/11/92	IFFA CREDO	205870	410,96	DUBERN
24890	Matériel Labo	17/11/92	Bioblock Scientific	31970	1 476,24	DUBERN
24891	Matériel Labo	17/11/92	OSI	200610	1 143,00	DUBERN
24892	Produits Chimiques	23/11/92	Baeckeroot Labo	19139	1 075,40	DUBERN
24992	Matériel Informatique	23/11/92	Sélection informat.	238556	2 500,00	MALAURIE
24897	Pièces centrifugeuse	26/11/92	Beckman Instruments	312895	981,00	DUBERN
24997	Frais transport	26/11/92	Danzas S.A.	242932	2 047,35	MALAURIE
24998	Matériel Labo	26/11/92	Labover	71793	553,35	MALAURIE
24999	Produits chimiques	27/11/92	Sigma Chimie S.A.	355234	1 830,70	MALAURIE
24899	Produits chimiques	30/11/92	Midi Sécurité	1153	605,00	DUBERN
24900	Produits entretien	04/12/92	Beckman instruments	313422	2 824,00	DUBERN
25226	Matériel Labo	11/12/92	Labo Tecnia	64594	1 500,00	DUBERN
1052-93	Frais transport	31/12/92	Chronopost	82842	193,13	DUBERN
1993						
23693	Produits serres	05/02/93	NIMAGRI	931392	84,00	MALAURIE
25244	Matériel Labo	23/02/93	S.A. TECHALU	J 93065	6 280,00	GIVORD
26540	Ramettes papier	03/03/93	Laurans Henri	5510	199,50	MALAURIE
23692	Produits serres	04/03/93	NIMAGRI	931391	2 852,40	MALAURIE
25223	Matériel Labo	04/03/93	OSI	227040/237080 /244441	10 429,80	MALAURIE
26383	Matériel Labo	04/03/93	ELVETEC	53849/59332/ 62249/63788	8 349,00	MALAURIE
26386	Produits Labo	04/03/93	OSI	227038/232512	3 523,00	MALAURIE
25020	Produits chimiques	08/03/93	Sigma Chimie S.A.	376988	82,10	MALAURIE
25224	Matériel Labo	05/03/93	OSI	228392	3 689,91	MALAURIE
25225	Matériel Labo	05/03/93	ELVETEC	53394	254,00	MALAURIE
26387	Produits Labo	05/03/93	OSI	227039/233613 /257296	7 890,00	MALAURIE
26388	Produits Labo	05/03/93	OSI	226545	103,00	MALAURIE
25018	Matériel centrifugeuse	08/03/93	Poly-Labo Block	979580	5 352,90	MALAURIE
25019	Produits chimiques	08/03/93	Baeckeroot Labo	20219	1 138,86	MALAURIE
26389	Transports	09/03/93	DANZAS S.A.	1003258	166,67	MALAURIE
26391	Produits labo	11/03/93	Baeckeroot	20295	2 642,52	MALAURIE
26392	Matériel Labo	11/03/93	PRODIS	93/F13842	760,45	MALAURIE
27001	Bte Rang.Optinett	16/03/93	Poly Labo Block	982350	1862,98	MALAURIE
27002	Produits Labo 9033	16/03/93	Merck Laboratoires	38187516	112,00	MALAURIE
27003	Matériel Labo	17/03/93	Poly Labo Block	982305	1538,73	MALAURIE
27004	Matériel Labp	17/03/93	BioRad	84122	577,00	MALAURIE
27005	Produits Labo	17/03/93	Sigma Chimie S.A.	379593	986,90	MALAURIE
26393	Matériel Labo	18/03/93	Bioblock Scientific	57540	2 191,44	MALAURIE

RELEVÉ DES DEPENSES

Matériel Non Durable (suite)

COMMANDE	DESIGNATION	DATE	FOURNISSEUR	FACTURE	MONTANT	CHERCHEUR
1993 suite						
26390	Matériel Labo	18/03/93	Poly-Labo Block	982232	390,11	MALAURIE
27006	Produits Labo	22/03/93	Sigma Chimie S.A.	380296	1 133,20	MALAURIE
27007	Mat. et Prod. Labo	22/03/93	Delville José	93352	1 662,00	MALAURIE
27008	Flat embedoling	22/03/93	Sté René Janning	18494.RJ	341,50	MALAURIE
26540	Régulation Télécopies	23/03/93	Gaspard	245400	840,27	MALAURIE
26541	Relect. Anglais Adv.	25/03/93	Marsh David	77.93	1 015,00	MALAURIE
26405	Feutre permanent	25/03/93	METHORGA	92280	196,30	MALAURIE
26394	Produits Labo	25/03/93	Poly-Labo Block	985301	193,72	MALAURIE
25021	Produits chimiques	26/03/93	Amersham France	892999	1 122,00	MALAURIE
26544	Ramettes papier	29/03/93	Laurans Henri	5677	199,50	MALAURIE
26545	Mat. divers	30/03/93	Salery Ets	23096	1 309,88	MALAURIE
2084/93	Entretien lingerie	31/03/93	Régie Linge	303769	4449,08	MALAURIE
26395	Tampon RF 69366044	31/03/93	EESSELTE METO	275036	201,30	MALAURIE
26396	Feutre Mackie noir	31/03/93	WELL	27898	288,00	MALAURIE
26406	Travaux Photo	01/04/93	Photo Vision	2299	1947,88	DUBERN
26407	Travaux Photo	01.04.93	Photo Vision	2299/2323	2105,55	DUBERN
26546	Fournitures Labo	01/04/93	Gaspard	350378	1 568,08	MALAURIE
25023	Produits chimiques	02/04/93	Perkin Elmer	IV/0033813	3 444,00	MALAURIE
26397	Etuve série E 28 L	02/04/93	AMILABO	1260	3 673,00	MALAURIE
27010	Matériel Labo	04/04/93	Bioblock Scientific	62475	387,00	MALAURIE
27011	Produits Labo	04/04/93	Sigma Chimie S.A.	383872	700,00	MALAURIE
25024	Produits entretien	05/04/93	OSI	233078	379,44	MALAURIE
27012	Matériel Labo	07/04/93	OSI	234302/24368	1 100,40	MALAURIE
2080	Azote liquide	08/04/93	U.S.T.L.	H813	1 764,00	MALAURIE
26408	Tirages photos	15/04/93	IPP-INSTAN PROD.	en cours	540,00	MALAURIE
27015	Produits Labo	19/04/93	Castorama	766	402,82	MALAURIE
27017	Matériel Labo	20/04/93	Bioblock Scientific	68808/74954	873,52	MALAURIE
27476	Produits Labo	20/04/93	Amersham France	896372	2 066,40	MALAURIE
26399	Produits Labo	22/04/93	PRODIS	F15534	500,64	MALAURIE
26400	Fourniture Labo	22/04/93	OSI	237700/240756	2 511,25	MALAURIE
27477	Fourniture Labo	22/04/93	Poly Labo Block	993691	3 529,94	MALAURIE
27479	Produits Labo	22/04/93	Amersham France	896399	2 50,00	MALAURIE
27527	Fournitures admin.	22/04/93	Bonniol Ets.	4198	320,86	MALAURIE
27526	Papier imprimante	23/04/93	Laurans Henri	5840	199,50	MALAURIE
27528	Dépan. armoire pos.	28/04/93	Hurthemel	93005	810,00	MALAURIE
27018	Produits Labo	29/04/93	Merck Laboratoires	38202454	642,20	MALAURIE
26409	Travaux photo	06/05/93	Photo Vision	en cours	52,00	MALAURIE
2104/93	Lampes Phytorelect	12/05/93	C.N.R.S.	ML.JO.93.006	8 250,00	MALAURIE
23697	Etagère Everiplan	19/05/93	Castorama	903	475,55	MALAURIE
23698	Transport d'Everiplan	19/05/93	Castorama	907	109,61	MALAURIE
				TOTAL	411.006,70	FF

Proposition de programme conjoint IIRSDA/ORSTOM
dans le cadre du projet régional de recherche sur les ignames

Mise au point de techniques de conservation *in vitro*
des ressources génétiques de l'igname

ORSTOM/Montpellier, France
janvier 1993

Les collections d'ignames maintenues au champ sont généralement virosées, ce qui empêche la diffusion et les échanges de matériel végétal. Un premier contrat CEE (TS2A-0116-C1 (CD)), en cours depuis mars 1989, a conduit à la mise en place, après sanitation, de collections *in vitro*, ou vitrothèques, de microboutures. Cependant, l'entretien de collections de grande taille pose différents types de problèmes : si certaines espèces d'igname (*D. alata*) sont facilement multipliées, la culture *in vitro* d'autres espèces (notamment des groupes appartenant au complexe d'espèces *D. cayenensis-D. rotundata*) reste difficile. De plus, de telles collections sont complexes à gérer. Enfin, les risques de variation somaclonale augmentent avec la durée de culture *in vitro* du matériel végétal.

La cryoconservation (azote liquide, -196°C) représente à l'heure actuelle la seule méthode susceptible d'assurer la conservation à long terme des ressources génétiques de nombreuses espèces végétales. En effet, à cette température, tous les processus métaboliques sont arrêtés et les divisions cellulaires sont stoppées. Le matériel végétal peut donc être stocké sans altération pendant des durées théoriquement illimitées. La cryoconservation a aujourd'hui été expérimentée sur environ soixante-dix espèces végétales, dont une quarantaine d'origine tropicale (Engelmann, 1991).

Les ignames cultivées sont multipliées par voie végétative ; certains cultivars produisent peu ou pas de graines. D'autre part, les ignames sont hétérozygotes et elles sont virosées dans leur grande majorité. Les apex représentent donc un matériel de choix pour la conservation des ressources génétiques de cette espèce car ils permettent d'introduire *in vitro* des plants assainis par thermothérapie. D'autre part, les caractéristiques génétiques de chaque espèce sont conservées, car les plantes sont multipliées *in vitro* par microbouturage. Enfin, la reprise de croissance directe des apex, après leur cryoconservation, est un gage de conformité des plantes régénérées.

1 Projet de recherche

1.1. Optimisation des conditions de culture *in vitro* des apex

Une étape préalable consistera à optimiser les conditions de culture des apex, particulièrement nécessaire pour les espèces récalcitrantes. En effet, si les étapes ultérieures de culture (multiplication des pousses feuillées issues d'apex) sont assez bien maîtrisées (Grewall *et al.*, 1977 ; Mantell *et al.*, 1980 ; Malaurie *et al.*, 1988 ; Saleil *et al.*, 1990), il n'en n'est pas de même pour le redémarrage des apex isolés juste après leur dissection sur la plante-mère. Les taux de survie sont souvent faibles, la reprise de croissance lente et la callogenèse importante.

Les essais porteront sur

- la composition des milieux de culture (plus particulièrement les équilibres hormonaux).
- l'origine des apex : plantes cultivées *in vitro*, *in vivo*, microtubercules.
- l'effet de la variabilité génétique et spécifique

1.2. Cryoconservation des apex

La technique utilisée sera l'encapsulation-déshydratation (Dereuddre *et al.*, 1990), qui apparaît comme la seule méthode performante et reproductible pour les apex. Cette technique est basée sur la technologie des semences artificielles : les apex sont encapsulés dans une bille d'alginate, prétraités avec une concentration élevée en saccharose puis déshydratés avant leur congélation. Les essais porteront sur la détermination des conditions optimales pour chacune des étapes successives de ce procédé.

Dans une première étape, un nombre limité de génotypes, non virosés et présentant une bonne croissance en culture *in vitro* seront utilisés. Les techniques mises au point seront ensuite expérimentées sur un plus grand nombre de génotypes. Les techniques de sanitation (Maurie *et al.*, 1988, 1992) seront appliquées au matériel végétal avant utilisation.

2. Déroulement du projet

Les essais seront conduits en parallèle à l'ORSTOM/Montpellier et à l'IIRSDA en Côte d'Ivoire.

A Montpellier, les expérimentations concerneront à la fois l'amélioration des techniques de culture *in vitro* et la mise au point d'un procédé de cryoconservation des apex qui sera ensuite transféré à l'IIRSDA. Les essais seront réalisés sur un nombre limité d'espèces, représentatives de la diversité génétique.

Le LRGAPT (ORSTOM/Montpellier) maîtrise ces deux techniques, puisque des procédés d'encapsulation-déshydratation ont été développés récemment sur le manioc (Benson *et al.*, 1992) et la canne à sucre (Paulet *et al.*, soumis). Il maintient également une vitrothèque de microboutures d'igname, comportant environ 200 accessions. Le laboratoire est parfaitement équipé pour réaliser des essais de cryoconservation et culture *in vitro*. Trois chercheurs seront impliqués dans ce programme : M.F. Trouslot et B. Malaurie, spécialistes de l'igname, F. Engelmann, spécialiste de la cryoconservation (responsable du LRGAPT : S. Hamon).

Les essais réalisés à l'IIRSDA en Côte d'Ivoire porteront aussi sur la culture *in vitro* des apex mais ils concerneront un nombre d'espèces et de cultivars plus important, afin de pouvoir mieux apprécier la diversité de réponse des ignames en culture *in vitro*. Ils permettront également de préparer la phase suivante, c'est à dire le transfert de la technique de cryoconservation mise au point à Montpellier.

La Côte d'Ivoire dispose de chercheurs compétents, spécialistes de l'igname et/ou de la culture *in vitro* de cette plante : M. Ahoussou N'Goran et M. Pongu Okito à l'IIRSDA, Mme Jeanne Zoundjihekpon et M. S. Doukouré à l'Université d'Abidjan. Les infrastructures existantes (laboratoire de culture *in vitro* de l'IIRSDA) permettent d'effectuer des essais de culture *in vitro* dans de bonnes conditions. Enfin, une vitrothèque d'igname entretenue à l'IIRSDA et à la FAST permettra de disposer d'un matériel très diversifié, enrichi par des collectes programmées dans la sous-région ouest africaine.

Ce projet pourrait bénéficier de l'appui scientifique et technique de l'IPGRI (ex IBPGR), car la mise au point et le développement de techniques de conservation *in vitro* pour les espèces végétales sont des objectifs prioritaires.

THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE

DIVISION OF PLANT BIOLOGY - MRC7
10666 NORTH TORREY PINES ROAD
LA JOLLA, CA 92037

Claude Fauquet, Ph.D.

Co-Director ILTAB

Telephone (619) 554-2906

FAX (619) 554-6330

La philosophie du sujet concerne une meilleure connaissance moléculaire du YMV de telle sorte que des méthodes appropriées de diagnostic et de lutte soient développées sur l'igname. Les questions qui sont posées sont les suivantes:

- Ya-t-il un ou plusieurs potyvirus qui infectent les espèces d'igname?
- Quelle est la variabilité de ces virus?
- Comment peut-on les détecter et les identifier?
- Quelles méthodes peut-on développer pour juguler leur impact sur la production d'igname?

En conséquence les actions que nous avons réalisées ou prévues sont les suivantes:

- ① Clonage full-length du YMV de Côte d'Ivoire (RCI) considéré par nos études en Afrique de l'Ouest comme le plus fréquent sur igname. Clonage partiel (1.8 kb en 3') réalisé et clonage full-length (10 kb) en cours.
- ② Séquence complète du YMV Côte D'Ivoire. Séquence partielle de 1.8 kb en 3' réalisée.
- ③ Obtention et caractérisation d'un clone infectieux de YMV-RCI, selon les résultats de ①.
- ④ Mise au point d'un kit RT-PCR sur l'igname pour détecter et caractériser les potyvirus de l'igname. Kit utilisant les primers, spécifiques et génériques du YMV-CP, réalisé sur *N. benthamiana* et en cours sur l'igname.
- ⑤ Etude de la variabilité des potyvirus de l'igname en Afrique de l'Ouest et en Amérique du Sud en utilisant le kit ci-dessus avec séquençages partiels si nécessaire. Non encore réalisé (travail en complémentarité avec Dubern et Quiot de Montpellier).
- ⑥ Développement de la stratégie de la protéine capsidaire sur *N. benthamiana*. Différentes constructions utilisant la PC du YMV-RCI sont en cours de réalisation et devraient être dans *N. benthamiana*. Les mêmes seront utilisées sur igname (*D. alata*), tout d'abord, afin d'étudier l'expression de la PC du YMV de façon transitoire et ensuite afin d'obtenir des plantes transgéniques (en collaboration avec Sinclair Mantell).

FACULTE DES SCIENCES AGRONOMIQUES
DE GEMBLOUX

LABORATOIRE DE PATHOLOGIE VEGETALE

P. LEPOIVRE

Bâtiment 47 — 13, avenue Maréchal Juin
B-5030 GEMBLOUX (Belgique)

Tél : 081/62.24.31
Fax : 081/61.01.26

Télex : 59482 FSAGX
EARN :: FSAGX @ BGXPSA51

Afin que nos travaux respectifs aient les mêmes objectifs généraux tout en restant complémentaires, je propose que nous nous inscrivions également dans l'optique de l'obtention de plantes résistantes par transgénèse mais en se focalisant sur les protéines de transport (P1).

Vous trouverez ci-joint les principales étapes du programme proposé.

METHODOLOGIE

1. Passage du virus de la mosaïque de l'igname sur une plante hôte expérimentale "multiplicatrice" (ex: *Nicotiana benthamiana*)
2. Extraction et purification du virus
3. - Synthèse d'un cDNA double brins correspondant au génome complet du virus: retrotranscription du RNA viral et synthèse *in vitro* du second brin
 - Clonage du cDNA dans un vecteur de type "phagique" (EMBL 3)
4. Transcription *in vitro* du cDNA et contrôle *in vivo* du pouvoir infectieux des transcrits obtenus
5. - Séquençage de la région 5' terminale codant pour la protéine P1
 - Comparaison de la séquence avec les séquences des protéines de transport connu afin de déterminer les régions potentiellement impliquées dans la translocation du virus
6. - Construction d'une série de cDNA par mutagenèse dirigée et /ou délétion des régions intéressantes de la protéine P1
 - Etude *in vivo* de l'influence de ces modifications sur l'infection virale
7. - Transformation de plante (*N. benthamiana*) par:
 - cDNA codant pour protéine P1 "sauvage"
 - cDNA codant pour une protéine P1 "mutée"
 - cDNA codant pour un RNA anti-sens
 - Etude du comportement du virus et des plantes transformées