

**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 D'EXECUTION  
POUR LA PERIODE DU 01.07.92 AU 31.08.93**

par

**Jean DUBERN**

20 décembre 1993

avec la participation de:  
**L. GIVORD  
C. GOUDOU-URBINO  
G. KONATE  
B. MALAURIE  
J.-B. QUIOT**

---

**LABORATOIRE DE PHYTOVIROLOGIE DES RÉGIONS CHAUDES CIRAD-ORSTOM**

---

RAPPORT D'EXECUTION N°2  
PERIODE DU 01.07.92 au 31.08.93

-----

## INTRODUCTION

par

Jean DUBERN

Ce document rapporte les travaux et résultats obtenus par l'ORSTOM et ses associés dans le cadre du projet <<Amélioration et Valorisation de l'Igname>>, objet du contrat international n°TSD 2A-0116-CI (CD), entre la CEE, l'Université Nationale de Côte d'Ivoire (U.N.C.I., Faculté des Sciences) et l'Institut International de Recherches Scientifiques pour le Développement à Adiopodoumé (I.I.R.S.D.A.). Ce contrat, signé le 06.02.1989, modifié par avenants, substitue l'ORSTOM à l'I.I.R.S.D.A. et reporte la date d'échéance au 01 septembre 1993.

Les travaux rapportés dans ce document ont été menés en association par divers laboratoires.

Au Laboratoire des Ressources Génétiques et d'Amélioration des Plantes Tropicales (L.R.G.A.P.T., ORSTOM Montpellier) ont été menées, d'une part un programme de sanitation de plantes *in vitro*, comportant des études de régénération de plantes saines par culture de méristèmes, associant ou non la thermothérapie et / ou la chimio-thérapie, et des études de multiplication par microbouturage aboutissant à la constitution d'une vitrothèque, d'autre part, un programme d'amélioration de l'Igname par la voie des protoplastes (B. MALAURIE).

Le Laboratoire de Phytovirologie des Régions Chaudes (L.P.R.C./ CIRAD-ORSTOM Montpellier) a mené l'étude d'une souche standard du virus de la Mosaïque de

l'Igname permettant la production d'anticorps polyclonaux, la comparaison de cette souche avec des virus du même groupe (Potyvirus), l'étude de différents isolats de virus de la Mosaïque de l'Igname (YMV), la caractérisation d'anticorps monoclonaux produits contre la souche standard, la mise au point d'un kit de diagnostic du YMV et l'indexation de la collection de vitroplants d'Igname du L.R.G.A.P.T. (Mme C. GOUDOU-URBINO, J. DUBERN).

Au Burkina Faso et, pour partie, au Laboratoire de Virologie de la Station de Kamboinsé (I.N.E.R.A., Ouagadougou), des études d'épidémiologie et de distribution géographique du YMV ont été menées, permettant de mieux appréhender l'importance de la Mosaïque de l'Igname, de repérer les régions inféodées à cette maladie et celles où elle semble absente, permettant la collecte de nombreux isolats et ainsi l'étude de la diversité biologique du YMV (Mme C. GOUDOU-URBINO, G. KONATE),

Au Laboratoire d'Immunochimie (I.B.M.C./ C.N.R.S. Strasbourg) des anticorps monoclonaux spécifiques du virus de la Mosaïque de l'Igname ont été produits et analysés (Mme L. GIVORD).

Au Laboratoire de Virologie (I.N.R.A. Montpellier) des études en immuno-électrophorèse de la protéine de capsid d'YMV ont été débutées permettant et la caractérisation d'isolats d'YMV en provenance des Antilles et de Guyane.

Le rapport actuel présente la seconde tranche des travaux réalisés :

- Chapitre I - Régénération, Production, Multiplication et Sanitation de vitroplants d'Igname.  
(B. MALAURIE, L.R.G.A.P.T./ORSTOM Montpellier)
- Chapitre II - Indexation de la collection de vitroplants d'Igname du L.R.G.A.P.T./ORSTOM (J. DUBERN, B. MALAURIE, L.P.R.C. et L.R.G.A.P.T./ORSTOM Montpellier)
- Chapitre III - Production d'anticorps monoclonaux anti-virus de la Mosaïque de l'Igname.  
(L. GIVORD, I.B.M.C./C.N.R.S. Strasbourg)
- Chapitre IV - Caractérisation d'isolats du virus de la Mosaïque de l'Igname au Burkina Faso  
(C. GOUDOU-URBINO, L. GIVORD, G. KONATE et J. DUBERN, I.N.E.R.A., Station de Kamboinsé, Ouagadougou)
- Chapitre V - Distribution géographique du virus de la Mosaïque de l'Igname au Burkina Faso.  
(C. GOUDOU-URBINO, G. KONATE, J.-B. QUIOT et J. DUBERN, I.N.E.R.A., Station de Kamboinsé, Ouagadougou)
- Chapitre VI - Présence du virus de la Mosaïque de l'Igname sur l'Igname en Guyane et aux Caraïbes.  
(J.-B. QUIOT, I.N.R.A., Montpellier)

# I - REGENERATION, PRODUCTION, MULTIPLICATION ET SANITATION DE VITROPLANTS D'IGNAME

(B. MALAURIE)

(L.R.G.A.P.T. Centre ORSTOM , BP 5045, 34032 Montpellier France )

## Description des recherches liées au contrat CEE TS2A-0116-C1(CD)

### 1- Sanitation des plantes *in vitro*

1-1 Régénération de plantes saines par la culture de méristèmes, avec ou sans association de la thermothérapie.

1-2 Multiplication et production de plantes saines par micro-bouturage.

1-3 Constitution d'une vitrothèque (garantie de conservation, et banque de gènes).

1-4 Expérimentation par inoculation artificielle de virus sur des plantes saines multipliées par microbouturage.

### 2- Amélioration de l'Igname par la voie des protoplastes

2-1 Tentatives de régénération de plantes à partir de protoplastes.

## 1- Sanitation des plantes *in vitro*

### 1-1 Régénération de plantes saines par culture de méristèmes, avec ou sans association de la thermothérapie et de la chimiothérapie

8 clones appartenant à 5 espèces ont été utilisés pour étudier les potentialités de régénération des méristèmes isolés. Différents facteurs ont été étudiés : niveau de prélèvement entre le noeud d'origine et l'apex, la taille des méristèmes, le type de flaconnage (boite de Pétri ou tubes), le type de support (agar, agarose ou agar + agarose) et le milieu de culture avec un gradient croissant d'ANA et de BAP. Ces 8 clones issus de méristèmes se sont développés en plantes entières après des temps plus ou moins longs (60 à 400 jours).

Espèces	Clones	Numéros	Etat phytosanitaire
<i>Dioscorea alata</i>	Florida	OA21	Sain
<i>Dioscorea bulbifera</i>	Nouméa imboro	NC02	Sain
<i>Dioscorea bulbifera</i>	Forme sauvage	EA18	Sain
Complexe <i>D. cayenensis</i> - <i>D. rotundata</i>	Kouba	IBO5	Virosé*
Complexe <i>D. cayenensis</i> - <i>D. rotundata</i>	Gbangan	OA12	Virosé**
Complexe <i>D. cayenensis</i> - <i>D. rotundata</i>	Sp-douce	OA18	Virosé*
Complexe <i>D. cayenensis</i> - <i>D. rotundata</i>	Grosse caille	PB04	Virosé*
<i>Dioscorea dumetorum</i>	Forme comestible	EA20	Sain
<i>Dioscorea praehensilis</i>	Sauvage	EA08	Virosé****

Deux cultivars virosés ont été utilisés dans différents essais afin de trouver les conditions optimum pour l'obtention de plante saine dépourvue de YMV. Aux milieux précédents, testés sur les 8 clones, l'effet de l'apport de GA3 a été étudié. La culture de méristèmes, associée ou non à la thermothérapie (63 jours à 37 °C) et la chimiothérapie [agent antiviral, Ribavirin ou Virazole, nucléoside (1-β-D-Ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide)], a été menée parallèlement à des essais chimio-thermothérapeutiques sur microboutures.

L'obtention de plante indemne de virus de l'Igname a été obtenue sur deux clones du complexe *D. cayenensis-D. rotundata* (PB04 et IB05), après culture de méristèmes et sur un clone de *D. praehensilis* (EA08), après un traitement chimio-thermothérapeutique sur microboutures uninodales.

#### Références:

- Malaurie B., Tardieu F. and J.-C. Thouvenel.** 1988. Improving Yam (*Dioscorea* spp.), using biotechnology. 1) Rapid production of disease free germplasm. Symposium of the International Society for Root Crops. Bangkok, 30/10-5/11/1988. Abstracts, pp. 51.
- 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 préparation)

## 1-2 Multiplication et production de plantes saines par microbouturage

Ce volet concerne la multiplication de cultivars préalablement débarrassés du YMV en vue d'une étude de réinfestation en plein champ, et correspondant au point 2-3 du programme incombant au L.P.R.C. .

Deux cultivars dépourvus de YMV ont été sélectionnés pour une telle étude ("Florido" et "Grosse Caille"). Une multiplication de ces clones pour la production de microtubercules a été effectuée (le sevrage de vitroplants sur le terrain est hasardeux et demanderait une surveillance et un entretien journalier); le trop petit nombre de tubercules obtenus, pour ces clones, et les difficultés de mise en place et de suivi de l'essai au Burkina Faso n'a pas permis de mener à bien ce programme.

## 1-3 Constitution d'une vitrothèque (garantie de conservation, et banque de gènes)

### 1-3-1 Constitution et entretien d'une vitrothèque

Une vitrothèque, sous la forme de microboutures nodales, a été établie dès 1985. Elle comptait en Juin 1990, 300 introductions, qui, après perte de 44 numéros, rassemblait 256 numéros maintenus par microbouturages. Ces 300 introductions appartenaient à 14 espèces, dont 9 espèces sauvages et 5 espèces cultivées. Cette vitrothèque représente un "germplasm" fort diversifié regroupant du matériel de provenances très diverses (Côte d'Ivoire, Bénin, Brésil, Burkina Faso, Cameroun, Guinée, Guadeloupe, Martinique, Nigéria, Nouvelle-Calédonie, Polynésie, Porto-Rico). Les espèces représentées sont: *Dioscorea abyssinica*, *D. alata*, *D. bulbifera*, *D. burkilliana*, complexe *D. cayenensis-D. rotundata*, *D. dumetorum*, *D. esculenta*, *D. hirtiflora*, *D. mangenotiana*, *D. minutiflora*, *D. praehensilis*, *D. shimperiana*, *D. togoensis*, hybrides interspécifiques du complexe *D. cayenensis-D. rotundata*, c.v. Krengle \* *D. praehensilis* .

L'établissement d'une telle vitrothèque a été rendu indispensable pour avoir à disposition toute l'année un matériel végétal axénique, génétiquement diversifié, pour le développement des différentes opérations de recherche.

La grande diversité du matériel et le fait que l'igname appartient au groupe des plantes Monocotylédones posent un certain nombre de problèmes. Plusieurs milieux de microbouturage ont été nécessaires pour couvrir la diversité du matériel de la vitrothèque.

### 1-3-2 Duplication et transfert d'une vitrothèque

Suite à l'arrêt, par l'ORSTOM, des programmes menés au sein de l'I.I.R.S.D.A., en Côte d'Ivoire, une multiplication en trois exemplaires de la vitrothèque a été réalisée; ces exemplaires ont été distribués dans trois endroits différents afin de garantir une meilleure sauvegarde du matériel végétal : au Laboratoire de Biotechnologie de l'I.I.R.S.D.A., au Laboratoire de la F.A.S.T. (Faculté d'Abidjan des Sciences et des Techniques), et au L.R.G.A.P.T. (Laboratoire des Ressources Génétiques et d'Amélioration des Plantes Tropicales) du Centre ORSTOM de Montpellier.

Le transfert des vitroplants de la collection d'igname, de la Côte d'Ivoire au LRGAPT, a occasionné une perte de 14 % des clones dupliqués (35 / 256). La distribution des clones par espèces est la suivante : *Dioscorea abyssinica* (3), *D. alata* (88), *D. bulbifera* (8), complexe *D. cayenensis-D. rotundata* (71), *D. dumetorum* (2), *D. esculenta* (9), *D. hirtiflora* (1), *D. mangenotiana* (14), *D. praehensilis* (2), *D. shimperiana* (1), *D. togoensis* (7), hybrides interspécifiques du complexe *D. cayenensis-D. rotundata* cv. krengle \*, *D. praehensilis* (14).

L'ensemble des clones maintenus sur un milieu unique à 21°C, dans un premier temps, afin de limiter la fréquence des repiquages, a été déplacé à 27°C, tenant compte des potentialités de survie hétérogènes des clones placés à une basse température.

Le tableau 1 résume la situation de la collection des vitroplants d'igname, observée au 01.09.93; ce tableau met en évidence la perte de 5 accessions de *D. alata*, et de 11 accessions du complexe *D. cayenensis-D. rotundata*. Cependant, de nouvelles introductions ont permis, d'une part d'enrichir les espèces suivantes: *D. esculenta* (origine Nouvelle Calédonie), *D. abyssinica* (origine Bénin) et *D. praehensilis* (origine Cameroun et Bénin), respectivement, de 2, 2 et 27 accessions, d'autre part d'acquérir 2 nouvelles espèces (origine Nouvelle Calédonie), jusqu'alors inconnues dans la vitrothèque: *D. pentaphylla* et *D. transversa* (1 accession pour chacune).

#### Références:

- Malaurie, B. and F. Tardieu.** 1988. Improving yam (*Dioscorea* spp.), using biotechnology. 3) Comparative study of growth and *in vitro* tuberization from different cultivars belonging to an important *in vitro* germplasm. Symposium of the International Society for Root Crops. Bangkok, 30/10-5/11/1988. Abstract Book, pp. 51.
- 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.

**Table 1** : Collection de vitroplants d'Igname du LRGAPT

Espèces en collection	
-----	
Espèces cultivées en Afrique de l'Ouest	Nombre d'accessions
<i>D. alata</i> * (1)	83
<i>D. bulbifera</i>	8
<i>D. cayenensis-D. rotundata (complexe)</i> * (2)	60
<i>D. dumetorum</i>	2
<i>D. esculenta</i>	9
Espèces sauvages	
<i>D. abyssinica</i>	3
<i>D. hirtiflora</i>	1
<i>D. mangenotiana</i>	14
<i>D. praehensilis</i>	2
<i>D. schimperiana</i>	1
<i>D. togoensis</i>	7
Hybride interspécifique	
<i>D. cayenensis-rotundata x D. praehensilis</i>	14
<b>Total</b>	<b>204</b>
-----	
Espèces en cours d'introduction	
-----	
Espèces cultivées en Afrique de l'Ouest	Nombre d'accessions
<i>D. esculenta</i>	2
Espèces sauvages	
<i>D. abyssinica</i>	2
<i>D. pentaphylla</i>	1
<i>D. praehensilis</i>	27
<i>D. transversa</i>	1
-----	
Groupes de diversité des 2 principales espèces de la collection	
-----	
Groupes de diversité	Nombre d'accessions
* (1) <i>D. alata</i>	
Bété bété	39
Nza	37
Indéterminés	7
* (2) <i>D. cayenensis- D. rotundata</i>	
Baniakpa	1
Cocoassié	1
Frou	1
Gnan	1
Kangba	6
Kpokpokpokpo	1
Kponan	2
Krenglé	5
Lokpa	2
Sopéré	2
Yaobadou	2
Indéterminés	36

### 1-3-3 Etude phytosanitaire pour l'indexation de la vitrothèque par la technique immunosérologique ELISA

#### Indexation au 12/10/92

L'ensemble des "Introductions", présentes dans la vitrothèque, a subi un contrôle phytosanitaire systématique par ELISA ( Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay). Ce contrôle a été effectué à la mise en culture, sur des vitroplants en culture aseptique et au moment du sevrage; il a été utilisé pour diagnostiquer la présence du Yam Mosaic Virus (YMV), selon la technique décrite par Clark & Adams (1977), et modifiée par Thouvenel & Fauquet (1977). A l'aide de cette méthode, le virus de la Mosaïque de l'Igname, virus filamenteux de 750 nm du groupe des potyvirus, peut être détecté avec une valeur significative jusqu'à une dilution de  $10^{-3}$ . Des résultats reproductibles ont été obtenus à partir des vitroplants avec des échantillons de 20 à 200 mg.

Des tests en routine ont utilisé les dilutions standard de 10 et 100, dans un tampon phosphate d'extraction (PBS), à pH 7,4, contenant 0,05 % de Tween 20, 2 % de Polyvinyl-Pyrrolidone (PVP) et de 0,2 % d'ovalbumine.

Cette technique a permis de se rendre compte de l'état phytosanitaire de la vitrothèque. La présence du YMV a été constatée sur 60 % des clones testés appartenant au complexe *D. cayenensis-D. rotundata* (57/95), 5 % des clones testés de *D. alata* (4/87). Seul un clone de *D. praezensilis*, parmi les 11 autres espèces testées, a présenté une infection par le YMV. Le tableau (2) ci-dessous donne la répartition des clones testés par espèces.

**Table 2 : Répartition des clones testés par espèces.**

Nbre de clones	DA	DAb	DB	DBurk	DCR	DD	DE	DH	DMa	DMi	DP	DS	DT	Hyb	Total
Sains	83	3	8	1	38	3	9	0	7	0	0	1	7	14	174
Virosés	4	0	0	0	57	0	0	0	0	0	1	0	0	0	62
Testés	87	3	8	1	95	3	9	0	7	0	1	1	7	14	236

Légende: DA= *D. alata*; DAb= *D. abyssinica*; DB= *D. bulbifera*; DBurk.= *D. burkilliana*;  
DCR= complexe *D. cayenensis-D. rotundata*; DD= *D. dumetorum*; DE= *D. esculenta*;  
DH= *D. hirtiflora*; DMa= *D. mangelotiana*; DMi= *D. minutiflora*; DP= *D. praezensilis*;  
DS= *D. shimperiana*; DT= *D. togoensis*; Hyb.= Hybrides interspécifiques.

**Table 3 : Etat phytosanitaire des divers groupes du complexe ouest-africain *D. cayenensis*-*D. rotundata* de la collection de germplasmés d'igname**

Groupes(1)	Introductions	Clones sains	Clones infectés	Clones non testés
Afoubessou	0	0	0	0
Baniakpa	2	1	1	0
Cocoassié	2	1	1	0
Frou	3	0	0	2
Gnan	1	0	1	0
Kangba	8	3	4	1
Kpokpokpo	6	3	2	1
Kponan	2	1	1	0
Krandoufou	0	0	0	0
Krenglé	13	6	5	2
Kroukroupa	1	0	1	0
Lokpa	4	1	1	2
Nandokaha	1	0	1	0
Sammancou	0	0	0	0
Sopéré	1	1	0	0
Soussou	1	0	0	1
Vivan	1	1	0	0
Waraga	1	0	0	1
Yaobadou	2	2	0	0
Zrézrou	1	0	1	0
Non identifié	67	18	34	14
<b>Total</b>	<b>117</b>	<b>38</b>	<b>53</b>	<b>24</b>

(1) Groupes décrits dans Hamon *et al.* (1986)

**Table 4 : Etat phytosanitaire de divers groupes du complexe ouest-africain *D. cayenensis*-*D. rotundata* de la collection de germplasmés d'igname, observés en Côte d'Ivoire**

Groupes(1)	Introductions	Clones sains	Clones infectés	Clones non testés
N'za (chair pourpre)	25	22	1	2
Bété Bété (chair blanche)	28	26	1	5
Non identifié	56	49	0	7
<b>Total</b>	<b>109</b>	<b>93</b>	<b>2</b>	<b>14</b>

## **Indexation et sanitation en cours de réalisation et envisagées**

Une nouvelle indexation des clones a actuellement débuté; elle met en jeu simultanément trois méthodes de contrôle : (1) l'inoculation mécanique sur divers espèces de plantes sensibles (*Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana megalosyphon*, *Nicotiana clevelandii*, *Datura stramonium* et *Chenopodium amaranticolor*), (2) le contrôle immunologique par tests ELISA, double sandwich direct, à l'aide de divers sérums, (3) le contrôle par observation en microscopie électronique (méthodes leaf-DIP et ISEM).

Le contrôle par immunologie a été redéfini pour tenir compte des données actuelles de la littérature et des disponibilités en anticorps. Les vitroplants sont testés simultanément vis à vis du virus de la Mosaïque de l'igname (YMV) (nouveau sérum polyclonal), le virus Y de la Pomme de terre (PVY), le virus de la Mosaïque du Concombre (CMV), le virus X de la Pomme de terre (PVX). Le chapitre suivant présente les résultats des travaux réalisés dans ce domaine.

### Références:

**Malaurie, B.** et J.-C. Thouvenel -1988- Production de plants d'Igname, dépourvus de viroses, par culture de méristèmes. 2<sup>o</sup> Salon International de la Coopération et de l'Aide au Développement (SICAD). 7-11/12/1988, Montpellier.

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).

## **1-4 Expérimentation par inoculation artificielle de virus sur des plantes saines multipliées par microbouturage**

Le modèle *in vitro* peut présenter un certain intérêt, notamment, pour effectuer un meilleur contrôle de la multiplication du virus dans la plante, et pour connaître en fonction du temps sa répartition dans la plante.

Des essais préliminaires d'inoculation *in vitro*, de solution virale filtrée, à différents niveaux de vitroplants sains, n'a pas permis de mettre ultérieurement le virus en évidence par les différentes techniques d'indexation. Ces problèmes de difficultés rencontrées dans la mise en évidence de virus se rencontrent, de façon moins percutante, dans les contrôles réalisés sur certains vitroplants. La trop forte dilution du virus dans la plante en serait une des raisons.

## 2- Amélioration de l'Igname par la voie des protoplastes. Tentatives de régénération de plantes à partir de protoplastes

Des vitroplants de plusieurs cultivars appartenant à 7 espèces ont été utilisés pour l'obtention de protoplastes de mésophylle de feuilles en utilisant des enzymes de macération lysant la paroi pectocellulosique (Cellulase Onozuka R-10, 0,3 %; Driselase, 0,08 %; Macérozyme, 0,05 %; Pectolyase Y-23, 0,02 %) et 0,66 M de Mannitol.

Le rendement moyen varie de  $2.10^7$  à  $15.10^7$  protoplastes par gramme de feuilles avec une variabilité de 60 à 75 %. Une méthode de purification par centrifugation utilisant un gradient discontinu (Ficoll / Mannitol ou Sucrose / Mannitol) permet d'obtenir plus de 85 % de protoplastes viables.

Les espèces et cultivars d'Igname, et le stade physiologique et morphologique des feuilles sont les paramètres qui affectent le plus intensément les rendements.

La pression osmotique maintenue à 0,66 M par addition de mannitol, un apport de glucose comme source de carbone et de glutamine (100 mg/l) comme unique source d'azote, ont permis de constater une augmentation de la viabilité des protoplastes et une diminution de leur difficulté à régénérer la paroi pectocellulosique

40 à 55 % de cellules étaient vivantes après 10 jours de culture et 30 % de celles-ci ont produit des "bourgeoisements" ou des "pelotes de laine".

Différents macro- et oligo-éléments, vitamines et régulateurs de croissance ont été utilisés sans pour autant observer de réelles divisions.

### Référence:

Tardieu, F. and B. Malarie -1988- Improving yam (*Dioscorea* spp.), using biotechnology. 2) Isolation and culture of protoplasts from different species. Symposium of the International Society for Root Crops. Bangkok, 30/10-5/11/1988. Abstract Book, 70-71.

## II - INDEXATION DE LA COLLECTION DE VITROPLANTS D'IGNAME DU L.R.G.A.P.T./ORSTOM (J. DUBERN et B. MALAURIE)

(L.P.R.C./C.I.R.A.D.-ORSTOM, CIRAD BP 5035 34032 Montpellier France)  
(L.R.G.A.P.T., Centre ORSTOM , BP 5045, 34032 Montpellier France )

### II - 1 Matériels et Méthodes

La constitution d'une collection de clones et la multiplication de cette collection exigent l'évaluation de son état sanitaire. En ce qui concerne l'igname et la collection réunie au L.R.G.A.P.T., il a semblé indispensable de prendre en compte les données de la littérature mentionnant la prévalence probable du virus de la Mosaïque de l'igname (YMV) mais aussi la présence du virus de la Mosaïque du Concombre (CMV) (Migliori *et al.* 1978), du virus X de la Pomme de terre (PVX) (Lawson *et al.* 1971), de virus de groupe des potyvirus (PVY) (Leseman) différents de l'YMV.

Un autre virus de type rhabdovirus, responsable de la Maladie des Taches Brunes (Mohamed 1976) est encore cité dans la littérature; cependant nous ne disposons pour cette étude ni du virus ni de moyen de détection.

Tenant compte des données de la littérature et des travaux menés, par ailleurs au L.P.R.C., nous avons tenu à effectuer simultanément une détection vis à vis du virus de la Maladie Bronzée de la Tomate (Tomato Spotted Wilt Virus, tospovirus), virus à très forte biodiversité et très polyphage mais non encore répertorié dans l'igname.

Dans le but d'effectuer une détection la plus fiable possible, nous avons décidé d'appliquer simultanément trois techniques de détection: une détection en immunologie, une détection par inoculation mécanique à quelques plantes hôtes spécifiques des virus à détecter, une analyse en microscopie électronique.

Pour effectuer les détections immunologiques, nous avons donc produit au L.P.R.C. un kit de diagnostic d'anticorps polyclonaux anti-YMV: immunoglobulines purifiées et immuno-globulines purifiées conjuguées à la phosphatase, la technique choisie étant la technique ELISA double sandwich direct (isolat de virus ivoirien YMV-12, isolé de la collection du L.R.G.A.P.T., multiplié sur *Nicotiana benthamiana*, purifié et injecté à des lapins). L'utilisation des anticorps monoclonaux, produits dans le cadre de ce projet et actuellement disponibles, a été écartée ne permettant un spectre de détection plus large que nos anticorps polyclonaux.

Les autres kits de diagnostic anti-CMV, anti-PVY, anti-PVX, anti-TSWV ont été achetés (SANOFI, France).

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

N° clones	Espèces	Cultivars	Origine	Etat sanitaire à l'origine	Traitements Riba	T(°C)
KP 04 S1	Hybride krengle-praehensilis	-	Côte d'Ivoire	sain	+	27
KP 04 S2	Hybride krengle-praehensilis	-	Côte d'Ivoire	sain	+	27
KP 04 S3.1	Hybride krengle-praehensilis	-	Côte d'Ivoire	sain	+	27
KP 04 S3.2	Hybride krengle-praehensilis	-	Côte d'Ivoire	sain	+	27
IB 40	D. cayenensis-D. rotundata	XMBOT	Côte d'Ivoire	malade		
IB 43	D. cayenensis-D. rotundata	Kpambli	Côte d'Ivoire	-		
IB 60	D. cayenensis-D. rotundata	Akendolokou	Côte d'Ivoire	sain		
IB 75	D. cayenensis-D. rotundata	NFI	Cameroun	sain		
IB 05 R1	D. cayenensis-D. rotundata	Kouba	Côte d'Ivoire	malade	-	27
IB 05 R2	D. cayenensis-D. rotundata	Kouba	Côte d'Ivoire	malade	-	27
IB 05 R3	D. cayenensis-D. rotundata	Kouba	Côte d'Ivoire	malade	-	27
IB 05 R6	D. cayenensis-D. rotundata	Kouba	Côte d'Ivoire	malade	-	27
IB 05 R11	D. cayenensis-D. rotundata	Kouba	Côte d'Ivoire	malade	-	27
IB 05 R12	D. cayenensis-D. rotundata	Kouba	Côte d'Ivoire	malade	-	27
IB 05 R19	D. cayenensis-D. rotundata	Kouba	Côte d'Ivoire	malade	-	27
IB 05 S1	D. cayenensis-D. rotundata	Kouba	Côte d'Ivoire	malade	+	27
IB 05 S3	D. cayenensis-D. rotundata	Kouba	Côte d'Ivoire	malade	+	27
IB 05 S8	D. cayenensis-D. rotundata	Kouba	Côte d'Ivoire	malade	+	27
IB 05 S12	D. cayenensis-D. rotundata	Kouba	Côte d'Ivoire	malade	+	27
IB 05 S13	D. cayenensis-D. rotundata	Kouba	Côte d'Ivoire	malade	+	27
IB 05 S14	D. cayenensis-D. rotundata	Kouba	Côte d'Ivoire	malade	+	27
IB 05 S15	D. cayenensis-D. rotundata	Kouba	Côte d'Ivoire	malade	+	27
IB 05 T3	D. cayenensis-D. rotundata	Kouba	Côte d'Ivoire	malade	-	37

Indexation de la collection de vitroplants du L.R.G.A.P.T./ORSTOM, après traitement soit par la Ribavirine, soit par la chaleur (27° ou 37°).

Légendes: Riba = Ribavirine

T(°C) = température de culture en °C

S = clones IB 05	traités par la Ribavirine	et traités à 27°C
X = clones EA 08	traités par la Ribavirine	et traités à 27°C
W = clones EA 08	non traités par la Ribavirine	et traités à 27°C
R = clones IB 05	non traités par la Ribavirine	et traités à 27°C
T = clones IB 05	non traités par la Ribavirine	et traités à 37°C

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

N° clones	Espèces	Cultivars	Origine	Etat sanitaire à l'origine	Traitements Riba	T(°C)
EA 08 W2	D. praehensilis	-	Côte d'Ivoire	malade	-	27
EA 08 W3	D. praehensilis	-	Côte d'Ivoire	malade	-	27
EA 08 W4	D. praehensilis	-	Côte d'Ivoire	malade	-	27
EA 08 W5	D. praehensilis	-	Côte d'Ivoire	malade	-	27
EA 08 W8	D. praehensilis	-	Côte d'Ivoire	malade	-	27
EA 08 W9	D. praehensilis	-	Côte d'Ivoire	malade	-	27
EA 08 X1	D. praehensilis	-	Côte d'Ivoire	malade	+	27
EA 08 X5	D. praehensilis	-	Côte d'Ivoire	malade	+	27
EA 08 X8	D. praehensilis	-	Côte d'Ivoire	malade	+	27
EA 08 X9	D. praehensilis	-	Côte d'Ivoire	malade	+	27
EA 08 X10	D. praehensilis	-	Côte d'Ivoire	malade	+	27
EA 08 X11	D. praehensilis	-	Côte d'Ivoire	malade	+	27
EA 08 X12	D. praehensilis	-	Côte d'Ivoire	malade	+	27
EA 08 X13	D. praehensilis	-	Côte d'Ivoire	malade	+	27
EA 08 X14	D. praehensilis	-	Côte d'Ivoire	malade	+	27
EA 08 X18	D. praehensilis	-	Côte d'Ivoire	malade	+	27
EA 08 X19	D. praehensilis	-	Côte d'Ivoire	malade	+	27
NC 05	D. alata	DEU	Nlle Calédonie	-		
NC 10	D. alata	Fidji/Gohapin	Nlle Calédonie	-		
OA 1 (1)	D. alata	Namassou blanc	Côte d'Ivoire	sain		
OA 1 (2)	D. alata	Namassou blanc	Côte d'Ivoire	sain		
OA 17	D. cayenensis-D. rotundata	Kpan	Côte d'Ivoire	malade		
OA 55	D. cayenensis-D. rotundata	Kounougbe	Côte d'Ivoire	sain		
PR 01	D. alata	Florido	Porto Rico	-		

Indexation de la collection de vitroplants du L.R.G.A.P.T./ORSTOM, après traitement soit par la Ribavirine, soit par la chaleur (27° ou 37°).

Légendes: Riba = Ribavirine

T(°C) = température de culture en °C

S = clones IB 05	traités par la Ribavirine	et traités à 27°C
X = clones EA 08	traités par la Ribavirine	et traités à 27°C
W = clones EA 08	non traités par la Ribavirine	et traités à 27°C
R = clones IB 05	non traités par la Ribavirine	et traités à 27°C
T = clones IB 05	non traités par la Ribavirine	et traités à 37°C

Pour la détection par inoculation mécanique, des fragments de vitroplants ont été broyés dans une solution tampon habituelle d'inoculation mécanique (tampon  $K_2HPO_4$  0,1M, cystéine HCl 0,01M, charbon actif 0,5%, bentonite 0,25%, H<sub>2</sub>O, pH 7,5) et frottés sur les feuilles, préalablement saupoudrées de carborindum, de plants de *Nicotiana benthamiana*, *Datura stramonium* et *Chenopodium amaranticolor*.

Pour la détection en microscopie, la technique de "trapping" a été retenue, technique d'immuno-électromicroscopie permettant d'accrocher sur des grilles préalablement couvertes avec des immunoglobulines les protéines virales homologues (immunoglobuline 30 mn, rincer, ajouter extrait clarifié à tester 1h à 37°C, rincer, colorer avec acétate d'uranyle).

Le diagnostic a été appliqué aux vitroplants d'igname de la collection du L.R.G.A.P.T. et à la collection de clones d'igname du L.P.R.C., clones rapportés du Burkina Faso, de Guyane et de Guadeloupe.

L'interprétation des résultats doit être effectuée avec une extrême prudence, l'objectif de cette indexation étant d'identifier des clones sains, c'est-à-dire donnant des réponses négatives aux analyses effectuées. Dans les différents types d'analyse effectués, un résultat estimé positif est effectivement positif; un résultat estimé négatif n'est réellement négatif que dans la mesure où la preuve positive n'a pas été apportée: tout résultat négatif est donc une présomption d'absence de virus, jamais une certitude absolue, malgré l'utilisation comparative de témoins négatifs absolus (plantes saines) et de témoins positifs.

Par ailleurs, la biodiversité des agents pathogènes, insuffisamment estimée dans la plupart des cas, doit être prise en compte (voir études immunologiques avec les anticorps monoclonaux pour YMV).

## **II - 2 Résultats**

### **Résultats des transmissions mécaniques**

Seuls les extraits des vitroplants **OA1** (*D.alata*, cv Namassou blanc, Côte d'Ivoire), **IB 05 S8** (*D. cayenensis-D. rotundata*, cv Kouba, Côte d'Ivoire), **IB 05 S13** (*D. cayenensis-D. rotundata*, cv Kouba, Côte d'Ivoire), **EA 08 X9** et **EA 08 X10** (*D. praehensilis*, Côte d'Ivoire), **EA 08 W8** (*D. praehensilis*, Côte d'Ivoire), **IB 05 R2** (*D. cayenensis-D. rotundata*, cv Kouba, Côte d'Ivoire) et **EA 08 W3** (*D. praehensilis*, Côte d'Ivoire) provoquent l'apparition de symptômes sur *Nicotiana benthamiana* et sur *Chenopodium amaranticolor*. Les symptômes observés sont faibles; aucune mosaïque

typique et aucune mosaïque déformante ne sont observées.

Les plants de *Nicotiana benthamiana* ont été analysés en immunologie ELISA (sérums anti-YMV, anti-PVX, anti-CMV, anti-PVY et anti-TSWV).

### Résultats des contrôles en microscopie électronique

Des particules flexueuses ont été observées dans les extraits du vitroplant IB 05 R2, particules dont les dimensions (500-600 nm de longueur et 12-13 nm de diamètre) sont typiques du groupe des PVX.

### Résultats des contrôles immunologiques en ELISA

Le virus de la Mosaïque de l'igname (YMV) a été détecté (kit YMV/L.P.R.C.) dans un vitroplant, OA 17, *Dioscorea cayenensis-D. rotundata* cv. Kpan, originaire de Côte d'Ivoire, réputé malade à l'origine, et n'ayant subi aucun traitement.

Ce virus a également été détecté (présence probable, mais à confirmer) dans 5 vitroplants, EA 08 W3, EA 08 W8, EA 08 X9 (*N.b.*), KP 04 S2, IB 75. Les trois premiers, en provenance de Côte d'Ivoire, appartiennent à l'espèce *D. praehensilis* et sont réputés malades à l'origine; seul le troisième a été traité à la Ribavirine. Le quatrième est un hybride *D. praehensilis* / krengele, en provenance de Côte d'Ivoire, réputé sain à l'origine et traité à la Ribavirine. Le cinquième vitroplant, du complexe *D. cayenensis-D. rotundata*, en provenance du Cameroun, réputé sain, n'a reçu aucun traitement.

Dans 4 autres vitroplants, OA 1.1(*N.b.*), EA 08 X9, EA 08 X11, IB 05 R2, l'absence du virus demande à être confirmée. Le premier, de l'espèce *D. alata*, en provenance de Côte d'Ivoire, réputé sain, n'a reçu aucun traitement. Le second et le troisième, de l'espèce *D. praehensilis*, réputés malades, ont été traités à la Ribavirine. Le quatrième, du complexe *D. cayenensis-D. rotundata*, réputé malade, n'a reçu aucun traitement.

Le virus X de la Pomme de terre (PVX) a été détecté dans un vitroplant, IB 05 R2, 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*; elle a été confirmée par observation au microscope électronique.

Le virus de la Mosaïque du Concombre (CMV) a peut être été détecté dans un vitroplant, IB 05 R12, du complexe *D. cayenensis-D. rotundata*, en provenance de Côte d'Ivoire, réputé malade et non traité à la Ribavirine; cette détection est douteuse et demande confirmation.

Le virus de la Maladie Bronzée de la Tomate (TSWV) et le virus Y de la Pomme de terre (PVY) n'ont pas été détectés.

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

N° clones	anti-YMV	anti-PVY	anti-PVX	anti-CMV	anti-TSW
KP 04 S1	0,000	-	0,012	0,000	-
KP 04 S2	<b>0,111</b>	-	0,026	0,014	-
KP 04 S3.1	0,000	-	0,002	0,004	-
KP 04 S3.2	0,000	-	0,024	0,008	-
IB 40	0,055	-	0,012	0,019	-
IB 43	0,025	-	0,005	0,013	-
IB 60	0,040	-	0,000	0,006	-
IB 75	<b>0,097</b>	-	0,008	0,011	-
IB 05 R1	0,014	-	0,005	0,015	-
IB 05 R2	0,041	-	0,018	0,017	-
IB 05 R2 (N.b.)	<b>0,080</b>	0,000	<b>0,379</b>	0,011	0,074
IB 05 R3	0,030	-	0,005	0,008	-
IB 05 R6	0,036	-	0,009	0,009	-
IB 05 R11	0,021	-	0,016	0,007	-
IB 05 R12	0,026	-	0,016	0,045	-
IB 05 R19	0,025	-	0,017	0,005	-
IB 05 S1	0,050	-	0,012	0,010	-
IB 05 S3	0,042	-	0,026	0,012	-
IB 05 S8	0,000	-	0,023	0,009	-
IB 05 S8 (N.b.)	0,061	0,018	0,023	0,000	0,091
IB 05 S12	0,000	-	0,013	0,010	-
IB 05 S13	0,016	-	0,014	0,017	-
IB 05 S13 (N.b.)	0,057	0,006	0,025	0,015	0,059
IB 05 S14	0,029	-	0,015	0,013	-
IB 05 S15	0,056	-	0,008	0,029	-
IB 05 T3	0,020	-	0,010	0,007	-
PR 01	0,023	-	0,010	0,008	-
Témoin sain	0,058	0,015	0,021	0,015	0,130
YMV	<b>0,487</b>	-	-	-	-
PMV (PVY)	-	<b>0,129</b>	-	-	-
PVX	-	-	<b>0,507</b>	-	-
CMV	-	-	-	<b>0,094</b>	-
TSWV	-	-	-	-	<b>2,500</b>

Le seuil de discrimination positif est fixé à deux fois la valeur moyenne des témoins sains et supérieur à 0,100. Le seuil de discrimination négatif est fixé à la valeur moyenne des témoins négatifs. Entre ces deux valeurs les résultats sont estimés douteux et doivent être contrôlés (douteux négatif en dessous de la valeur médiane entre ces deux seuils et douteux positif au dessus de cette valeur médiane).

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

N° clones	anti-YMV	anti-PVY	anti-PVX	anti-CMV	anti-TSWV
EA 08 W2	0,034	-	0,014	0,015	-
EA 08 W3	0,000	-	0,006	0,008	-
EA 08 W3 (N.b.)	<b>0,111</b>	0,012	0,013	0,009	0,092
EA 08 W4	0,025	-	0,013	0,016	-
EA 08 W5	0,020	-	0,016	0,009	-
EA 08 W8	<b>0,088</b>	-	0,008	0,015	-
EA 08 W8 (N.b.)	0,055	0,005	0,016	0,017	0,093
EA 08 W9	0,015	-	0,005	0,015	-
EA 08 X1	0,019	-	0,000	0,004	-
EA 08 X5	0,025	-	0,007	0,004	-
EA 08 X8	0,031	-	0,003	0,010	-
EA 08 X9	<b>0,075</b>	-	0,022	0,014	-
EA 08 X9 (N.b.)	<b>0,100</b>	0,015	0,021	0,000	0,086
EA 08 X10	0,058	-	0,011	0,018	-
EA 08 X10 (N.b.)	0,043	0,004	0,006	0,000	0,091
EA 08 X11	<b>0,075</b>	-	0,007	0,012	-
EA 08 X12	0,017	-	0,012	0,006	-
EA 08 X13	0,036	-	0,006	0,004	-
EA 08 X14	0,030	-	0,020	0,012	-
EA 08 X18	0,030	-	0,014	0,013	-
EA 08 X19	0,018	-	0,003	0,015	-
NC 05	0,010	-	0,021	0,008	-
NC 10	0,000	-	0,001	0,000	-
OA 1.1	0,000	-	0,009	0,006	-
OA 1.1 (N.b.)	<b>0,072</b>	0,005	0,052	0,002	0,143
OA 17	<b>0,160</b>	-	0,010	0,006	-
OA 55	0,026	-	0,000	0,016	-
Témoin sain	0,058	0,015	0,021	0,015	0,130
YMV-12	<b>0,487</b>	-	-	-	-
PMV(PVY)	-	<b>0,129</b>	-	-	-
PVX	-	-	<b>0,507</b>	-	-
CMV	-	-	-	<b>0,227</b>	-
TSWV	-	-	-	-	<b>2,500</b>

Le seuil de discrimination positif est fixé à deux fois la valeur moyenne des témoins sains et supérieur à 0,100. Le seuil de discrimination négatif est fixé à la valeur moyenne des témoins négatifs. Entre ces deux valeurs les résultats sont estimés douteux et doivent être contrôlés (douteux négatif en dessous de la valeur médiane entre ces deux seuils et douteux positif au dessus de cette valeur médiane).

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

N° clones	anti-YMV	anti-PVY	anti-PVX	anti-CMV	anti-TSW
KP 04 S1	-	.	-	-	.
KP 04 S2	+?	.	-	-	.
KP 04 S3.1	-	.	-	-	.
KP 04 S3.2	-	.	-	-	.
IB 40	-	.	-	-	.
IB 43	-	.	-	-	.
IB 60	-	.	-	-	.
IB 75	+ ?	.	-	-	.
IB 05 R1	-	.	-	-	.
IB 05 R2	-	.	-	-	.
IB 05 R2 (N.b.)	- ?	-	+	-	-
IB 05 R3	-	.	-	-	.
IB 05 R6	-	.	-	-	.
IB 05 R11	-	.	-	-	.
IB 05 R12	-	.	-	- ?	.
IB 05 R19	-	.	-	-	.
IB 05 S1	-	.	-	-	.
IB 05 S3	-	.	-	-	.
IB 05 S8	-	.	-	-	.
IB 05 S8 (N.b.)	-	-	-	-	-
IB 05 S12	-	.	-	-	.
IB 05 S13	-	.	-	-	.
IB 05 S13 (N.b.)	-	-	-	-	-
IB 05 S14	-	.	-	-	.
IB 05 S15	-	.	-	-	.
IB 05 T3	-	.	-	-	.
PR 01	-	.	-	-	.
Témoin sain	-	-	-	-	-
YMV	+	-	-	-	-
PMV (PVY)	-	+	-	-	-
PVX	-	-	+	-	-
CMV	-	-	-	+	-
TSWV	-	-	-	-	+

Le seuil de discrimination positif (+) est fixé à deux fois la valeur moyenne des témoins sains et supérieur à 0,100. Le seuil de discrimination négatif (-) est fixé à la valeur moyenne des témoins négatifs. Entre ces deux valeurs les résultats sont estimés douteux et doivent être contrôlés : douteux négatif (- ?) en dessous de la valeur médiane entre ces deux seuils et douteux positif (+ ?) au dessus de cette valeur médiane.  
IB 05 S13 (N.b.) : *Nicotiana benthamiana* inoculé avec un extrait du vitroplant IB 05 S13

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

N° clones	anti-YMV	anti-PVY	anti-PVX	anti-CMV	anti-TSWV
EA 08 W2	-	.	-	-	.
EA 08 W3	-	.	-	-	.
EA 08 W3 (N.b.)	+ ?	-	-	-	-
EA 08 W4	-	.	-	-	.
EA 08 W5	-	.	-	-	.
EA 08 W8	+ ?	.	-	-	.
EA 08 W8 (N.b.)	-	-	-	-	-
EA 08 W9	-	.	-	-	.
EA 08 X1	-	.	-	-	.
EA 08 X5	-	.	-	-	.
EA 08 X8	- ?	.	-	-	.
EA 08 X9	- ?	.	-	-	.
EA 08 X9 (N.b.)	+ ?	-	-	-	-
EA 08 X10	-	.	-	-	.
EA 08 X10 (N.b.)	-	-	-	-	-
EA 08 X11	- ?	.	-	-	.
EA 08 X12	-	.	-	-	.
EA 08 X13	-	.	-	-	.
EA 08 X14	-	.	-	-	.
EA 08 X18	-	.	-	-	.
EA 08 X19	-	.	-	-	.
NC 05	-	.	-	-	.
NC 10	-	.	-	-	.
OA 1.1	-	.	-	-	.
OA 1.1 (N.b.)	- ?	-	-	-	-
OA 17	+	.	-	-	.
OA 55	-	.	-	-	.
Témoin sain	-	-	-	-	-
YMV-12	+	-	-	-	-
PMV(PVY)	-	+	-	-	-
PVX	-	-	+	-	-
CMV	-	-	-	+	-
TSWV	-	-	-	-	+

Le seuil de discrimination positif (+) est fixé à deux fois la valeur moyenne des témoins sains et supérieur à 0,100. Le seuil de discrimination négatif (-) est fixé à la valeur moyenne des témoins négatifs. Entre ces deux valeurs les résultats sont estimés douteux et doivent être contrôlés : douteux négatif (- ?) en dessous de la valeur médiane entre ces deux seuils et douteux positif (+ ?) au dessus de cette valeur médiane.

IB 05 S13 (N.b.) : *Nicotiana benthamiana* inoculé avec un extrait du vitroplant IB 05 S13

## Résultats des traitements effectués sur les vitroplants

### Traitement par la chaleur

Un seul vitroplant (IB 05 T3) a subi un traitement par la chaleur à 37 °C (pas de Ribavirine); la présence d'aucun virus n'a pu être détectée.

### Traitement par la Ribavirine

Deux clones issus des vitroplants IB 05 et EA 08 ont été traités pour partie à la Ribavirine: 7 clones d'IB 05 ont été traités et 7 clones sont restés non traités; 11 clones d'EA 08 ont été traités et 6 sont restés non traités.

Aucun des clones d'IB 05 traités ne semble infecté par un virus; à l'encontre, l'un des clones non traités (sur 7), IB 05 R2, est infecté par PVX (contrôle positif) et peut-être par YMV (probabilité négative) et un autre, IB 05 R12 est peut-être infecté par CMV(probabilité négative).

Cependant, 3 des clones d'EA 08 traités (sur 11) ne peuvent être certifiés sans virus (probabilité positive d'infection par YMV pour EA 08 X9), alors que 2 clones non traités (sur 6) semblent infectés par YMV (probabilité positive d'infection pour EA 08 W3 et EA 08 W8).

Pris globalement les résultats, présentés dans le tableau ci-après, 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 %.

Clones	Nb de clones traités		Nb de clones non traités	
	infectés	sains	infectés	sains
IB 05	0	7	2	5
EA 08	3	8	2	4
TOTAL	3	15	4	9
%	17	83	31	69

## Discussion

Ainsi qu'il a été précisé dans le chapitre "II-1 Matériel et Méthodes", les résultats obtenus en immunologie doivent toujours être interprétés avec une extrême prudence; cela signifie précisément que les résultats avancés ne sont pas critiquables mais que les conclusions qui sont tirées de ces résultats doivent être par contre avancées avec une grande rigueur.

Tous les résultats signalés positifs sont liés effectivement à des échantillons infectés par un virus; tous les résultats négatifs sont liés à des échantillons qui sont ou bien non-infectés <1> ou bien infectés par une souche de virus non-détectée pour diverses raisons (concentration en virus trop faible <2> , propriétés immunologiques différentes <3>), la probabilité la plus forte étant le premier cas.

Le troisième cas <2> est illustré lors de la détection du PVX dans l'échantillon IB 05 R2: pas de détection positive dans le vitroplant mais détection positive (et contrôle positif) dans *Nicotiana benthamiana* inoculé avec un extrait du vitroplant. Cela signifie que la concentration en virus était trop faible pour être détectée directement dans le vitroplant (pour des raisons toujours imaginables: liées au vitroplant : âge, température de croissance...., ou liées au virus ...). Cela signifie également que la technique immunologique choisie pourrait manquer de sensibilité. Pour cette raison, il a été décidé d'adapter cette technique, tenant compte des résultats des travaux d'immunologie exposés ci-après (chapitre IV): technique ELISA double sandwich direct, faisant appel en première couche aux anticorps polyclonaux et en seconde couche aux anticorps monoclonaux conjugués.

Les travaux de sanitation conduisent à des résultats prometteurs; il est envisagé de compléter ces travaux afin de vérifier l'effet positif de la température, agissant seule ou en association avec un traitement chimique.

### Référence

**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 préparation)

## Conclusion

**YMV détecté (+) dans OA 17,**

présence probable (+ ?) dans EA 08 W3, EA 08 W8, EA 08 X9, IB 75, KP 04 S2

présence improbable (- ?) dans OA 1.1, EA 08 X9, EA 08 X11, IB 05 R2

**PVX détecté (+) dans IB 05 R2**

CMV présence improbable (- ?) dans IB 05 R12

TSWV non détecté (-)

**Traitement à 37°C positif** mais un seul clone testé.

**Traitement par Ribavirine relativement positif**

mais nombre de clones étudiés faibles:

clones estimés non sains: 17 % après traitement contre 31 % sans traitement.

### III - PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX ANTI-YMV (L. GIVORD)

(Laboratoire d'Immunochimie, I.B.M.C., 15 rue Descartes, 67084 Strasbourg France)

Les hybridomes issus des fusions réalisées dans les conditions décrites dans le rapport précédent, contre le virus de la Mosaïque de l'IGNAME (YMV), ont été reproduits dans des souris. Nous avons pu récolter des volumes de liquides d'ascites variables selon les anticorps monoclonaux (AcMc) de 0,5 ml à plusieurs millilitres. Nous disposons, à l'heure actuelle, de 26 sous-clones appartenant à 5 familles de clones.

Leurs titres homologues maximum s'échelonnent de  $10^{-3}$  (groupe 5) à  $10^{-9}$  (groupe 11); les titres de la plupart des autres anticorps monoclonaux (dans les liquides d'ascites) sont de l'ordre de  $10^{-5}$  à  $10^{-7}$ .

Nous rappelons que ces anticorps monoclonaux ont été sous-clonés successivement 2 fois, ce qui permet d'assurer avec plus de certitude, que nous avons effectivement des anticorps monoclonaux issus d'un seul hybridome. D'après les analyses de caractérisation que nous avons faites sur tous les sous-clones, notamment à partir de leur réactivité vis-à-vis de trois antigènes purifiés (L.P.R.C. / ORSTOM), à savoir le virus YMV natif, l'YMV traité à la trypsine et la protéine fde l'YMV, les sous-clones d'une même famille réagissent de manière identique. Ceci est un résultat supplémentaire permettant d'assurer que nous avons bien sélectionné des anticorps monoclonaux.

L'étude de la réactivité de ces différents anticorps monoclonaux, vis-à-vis d'isolats de l'YMV, a été débutée avec des échantillons rapportés du Burkina Faso par C. GOUDOU-URBINO; les premiers résultats ont permis de sélectionner dès à présent des anticorps monoclonaux qui permettent de reconnaître les isolats d'après leur origine géographique. Il est évident que la recherche doit être poursuivie, en particulier, en collectant un nombre beaucoup plus important d'isolats, répartis dans des régions plus disséminées. Les résultats finaux conduiront à la mise au point d'un kit de détection.

En résumé, nous avons obtenu plusieurs anticorps monoclonaux de spécificités différentes, permettant de reconnaître tous les isolats actuellement en notre possession (ceux d'origine africaine, mais aussi d'origine antillaise). Les quantités disponibles de liquides d'ascites, utilisables sans purification, sont suffisantes pour envisager un diagnostic à grande échelle.

## IV - CARACTERISATION D'ISOLATS DE VIRUS DE LA MOSAÏQUE DE L'IGNAME DU BURKINA FASO (C.GOUDOU-URBINO, L. GIVORD, G. KONATE et J. DUBERN)

(L.P.R.C./C.I.R.A.D.-ORSTOM, CIRAD, BP 5035, 34032 Montpellier France)  
(Laboratoire d'Immunochimie, I.B.M.C., 15 rue Descartes, 67084 Strasbourg France)  
(I.N.E.R.A., Centre de recherche de Kamboinsé, 01 BP 476 Ouagadougou, Burkina Faso)

29 anticorps monoclonaux ont été produits par L. GIVORD (ORSTOM-C.N.R.S.) à l'I.B.M.C. (Strasbourg). 23 de ces monoclonaux se sont révélés détecter la souche de référence YMV-12, souche ivoirienne 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.

Les résultats sont rapportés dans les tableaux 1, 2, 3, 4 et 5.

### 1 - ETUDES DES ANTICORPS MONOCLONAUX

Les anticorps monoclonaux fournis par l'I.B.M.C. ont été testés contre le virus qui a permis de les produire et contre un témoin sain. Le Tableau 1 rapporte les données observées.

Les résultats peuvent être ainsi résumés:

1) En ELISA-ACP (simple sandwich), les monoclonaux suivants ne réagissent pas avec le virus témoin : 511, 512, 713, 714, 742, 743, 744, 911, 151, 1534, 232. Les monoclonaux suivants donnent des réponses faibles avec le virus témoin: 711, 712, 741.

En ELISA-DAS (double sandwich), les monoclonaux suivants ne donnent pas de réponses positives avec le témoin virosé: 512, 713, 911, 1534, 232.

Les monoclonaux suivants donnent des réponses très faibles avec le témoin virosé: 511, 151.

2) Les monoclonaux 711, 712, 714, 741, 742, 743, 744 ne réagissent pas en ACP mais donnent de bons résultats en DAS.

Pour la suite, seuls 23 anticorps monoclonaux sur les 29 disponibles seront utilisés après élimination des 6 monoclonaux suivant:

511, 512, 713, 911, 1534, 232.

**TABLEAU 1: Densités optiques résultant de la réaction (ELISA-DAS) des anticorps monoclonaux contre un Témoin Sain (TS) et un Témoin Virosé (TV) à différentes dilutions**

	TV 1/5	TV 1/10	TV 1/20	TS 1/10	TS 1/20
3.3.1	818	780	1115	16	17
3.3.2	715	731	1050	22	25
3.5.1		690		12	
3.5.2		800		11	
3.5.3	825	963	1016	13	13
3.6.1	820	987	960	16	17
3.7.1	765	749	1105	12	13
3.7.2	880	955	1120	16	17
5.1.1		107		47	
5.1.2	20	27	31	29	31
7.1.1		1040		28	
7.1.2		1830		38	
7.1.3		75		49	
7.1.4		1371		18	
7.4.1		780		40	
7.4.2		880		54	
7.4.3		860		5	
7.4.4		1100		4	
9.1.1	36	31	27	29	31
11.1.1	926	1230	1525	36	38
11.1.2	1115	1335	1540	45	49
1.5.1		280		11	
15.2.1		959		30	
15.2.2		1430		43	
15.3.1		1013		36	
15.3.2		1100		20	
15.3.4		80		70	
15.5.1		687		40	
2.3.2	28	19	30	21	30

TV 1/5; 1/10; 1/20 = Témoin virosé dilué au 1/5, 1/10 et 1/20  
 TS 1/10; 1/20 = Témoin sain dilué au 1/10 et au 1/20

## 2 - ETUDES DES ISOLATS DU BURKINA FASO

Les résultats de cette étude sont rapportés dans les tableaux 2 et 3.

Ces résultats montrent une grande diversité biologique des isolats de YMV. 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.

**TABLEAU 2: Réactions des anticorps monoclonaux en ELISA-DAS  
avec les isolats du Burkina Faso**

	TS	TV12	BF48	BF51	BF54	BF56	BF60	SOC	SOA1	SOA2	HTA
3.3.1	5	263	17	47	20	318	23	341	122	105	39
	31	284		57	39		47				
3.3.2	26	261	16	137	71	259	74	271	178	176	75
3.5.1	12	482	97	550	512	32	736	110	135	45	52
	2	693	196			579		385	240	145	47
3.5.2	13	560	97	560	533	27	735	125	106	22	47
	4	800	196			475		421	390	16	7
3.5.3	2	261	13	69	16	320	23	349	127	121	15
3.6.1	48	226	39	87	81	216	81	188	93	152	109
3.7.1	21	561	12	105	42	628	51	763	203	266	79
3.7.2	2	282	14	48	17	343	19	307	115	138	68
7.1.1	29	1051	120	275	258	45	335	42	46	22	68
	6	680	131			53			24		22
7.1.2	20	1345	235	109	47	219	36	42	41	35	130
	37	830	140			48		25	28	46	41
7.1.4	16	650	19	35	19	21	16	20	16	21	15
	3	615	31							23	
7.4.1	45	190	296	289	250	277	292	49	48	62	182
	5	785	119			61			21		12
7.4.2	34	932	155	272	323	58	393	30	39	107	48
	61	785	209			60		30	41	98	52
7.4.3	15	121	175	96	29	202	19	15	13	16	151
	4	903	213			68		13	17	15	19
7.4.4	10	980	190	81	29	31	23	12	11	12	25
	4	1075	128			72		10	13	2	15
11.1.1	16	546	97	102	41	537	49	643	245	240	96
	56	121		65	79	1236		974	761		736
11.1.2	22	548	71	183	88	679	82	748	307	227	62
	48	220			98		71				
15.2.1	26	720	30	41	30	30	39	401	730	240	125
	13	309	11			11		800	722	197	123
15.2.2	43	1515	43	7	10	42	27	1163	1110	636	301
	17	751	21			21		341	395	130	80
15.3.1	40	660	40					345	674	220	117
	15	870	25	58	55	31	60	845	981	1116	560
15.3.3	18	1097	21	31	38	22	48	960	1085	1230	675
	21	960						881	745		
15.5.1	5	690	9	8	11	10	17	263	275	100	43
	3	996	2			1005		300	250	205	27
1.5.1	61	280	90	91	93	91	91	90	94	90	85

(en gras et italique, test avec le virus purifié)

**TABLEAU 3: Interprétation des réactions des anticorps monoclonaux en ELISA-DAS avec les isolats du Burkina Faso**

	TV12	BF48	BF51	BF54	BF56	BF60	SOC	SOA1	SOA2	IITA
3.3.1	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-
3.3.2	+	-	+	+/-	+	+/-	+	+	+	+/-
3.5.1	+	+	+	+	-<+>	+	+	+	-	-
3.5.2	+	+	+	+	-<+>	+	+	+	-	-
3.5.3	+	-	+/-	-	+	-	+	+	+	-
3.6.1	+	-	+/-	+/-	+	+/-	+	+/-	+	+
3.7.1	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+/-
3.7.2	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+/-
7.1.1	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
7.1.2	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+
7.1.4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7.4.1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
7.4.2	+	+	+	+	-	+	-	-	+/-	-
7.4.3	+	+	+/-	-	+	-	-	-	-	+
7.4.4	+	+	+/-	-	+/-	-	-	-	-	-
11.1.1	+	+/-	+/-	-	+	-	+	+	+	+/-
11.1.2	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+	+	+	+/-
15.2.1	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
15.2.2	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
15.3.1	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
15.3.3	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
15.5.1	+	-	-	-	-<+>	-	+	+	+	-
1.5.1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ = Réponse positive : D.O. > 2 X TS et 100; - = réponse négative : < 2 X TS;

+/- = réponse positive douteuse (entre 2 X TS et 100) ; <+> = réponse positive avec le virus purifié

Les isolats 54 et 60 réagissent de la même façon vis à vis de tous les anticorps monoclonaux; il en est de même des isolats SOC et SOA1.

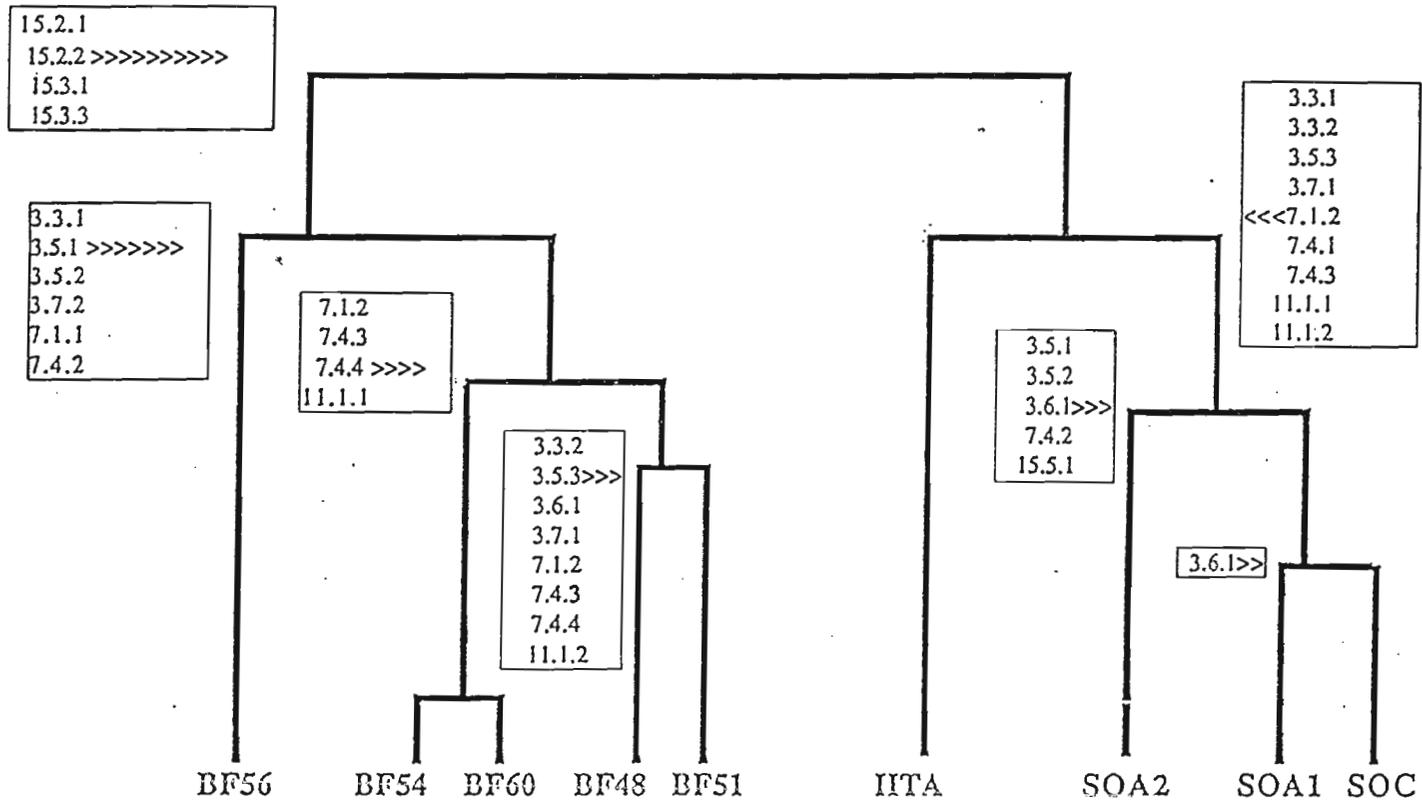
Un essai de classement peut être réalisé selon le tableau 4. Par ailleurs, en combinant les anticorps, il est possible de reconnaître tous les isolats:

7.4.1 + 3.3.1 (ou 3.3.2, ou 3.5.3, ou 3.7.1, ou 3.7.2, ou 11.1.1, ou 11.1.2, ou 15.2.1, (ou 15.2.2, ou 15.3.1, ou 15.3.3)

3.5.1 + 3.6.1

3.5.2 + 3.6.2

Classement des isolats  
d'YMV  
du Burkina Faso



TABEAU 4:21 anticorps monoclonaux permettent de classer les souches de YMV, collectées au Burkina Faso, en 2 groupes principaux et 4 sous-groupes.

3 - ETUDES DES ISOLATS DE GUADELOUPE, GUYANE ET CAMEROUN.  
Les résultats sont rapportés et analysés dans les tableaux 5 et 6.

**TABLEAU 5: Densités optiques résultant de la réaction (ELISA-DAS) des anticorps monoclonaux contre les isolats de Guyane, Guadeloupe et Cameroun.**

	TS	TV12	CAM2	AIA	CAM1	DIVIN	TRIFD	GUYNE
331	2	1534	175	700	1104	1148	1555	1622
	2	533	246	619	871	1055	1225	1582
332	4	487	100	417	966	1144	1412	1682
	24	1597	101	553	1290	1176	1642	1564
351	2	581	169	535	1284	1381	1383	1758
	20	1536	167	648	1265	1197	1622	1692
352	11	602	188	591	944	1227	1305	1680
	17	1611	222	648	1203	1136	1682	1753
353	5	636	239	542	1024	1143	1448	1627
	9	1573	281	674	1197	1243	1740	1703
361	3	584	128	512	1093	1395	1100	1556
	16	1403	185	666	1125	1181	1636	1568
371	6	664	287	627	1080	1268	1441	1725
	18	1603	297	756	1340	1241	1640	1694
372	6	584	227	672	1284	1381	1383	1758
	20	1536	255	659	1265	1197	1662	1692
711	8	834	133	725	54	63	105	44
	17	1747	147	823	86	69	85	59
712	5	764	111	728	109	39	82	51
	32	1636	110	834	86	69	74	31
714	6	760	19	490	19	38	25	48
	23	1835	10	580	41	42	25	50
741	10	932	107	814	95	72	88	25
	22	1587	106	863	100	28	52	21
742	12	848	108	726	69	92	66	29
	23	813	143	840	69	54	64	31
743	16	894	90	705	108	62	21	16
	78	1432	93	822	66	49	28	33
744	6	860	100	770	58	26	31	32
	38	1863	90	890	33	28	33	37
1111	28	155	100	56	128	173	528	248
	54	518	76	77	158	184	527	246
1112	14	328	171	350	643	731	812	878
	25	892	165	320	704	735	793	845
1521	12	631	288	664	30	1164	15	1653
	3	1598	335	698	46	1137	18	1563
1522	10	789	488	805	166	995	51	1613
	46	1531	529	822	176	1089	35	1769
1531	32	452	109	376	134	984	30	1673
	35	1671	129	432	136	1051	41	1774
1533	26	774	439	757	147	1311	44	1751
	24	1828	453	828	113	1262	33	1786
1551	2	740	406	749	169	972	17	1640
	22	1492	421	827	144	1106	5	1740
151	80	83	138	214	146	295	255	254
	191	237	147	202	148	209	289	231

**TABEAU 6: Interprétation des résultats de la réaction (ELISA-DAS) des anticorps monoclonaux contre les isolats de Guyane, Guadeloupe et Cameroun.**

	TV12	Cam2	AIA	Cam1	Divin	Trifd	Guyne
3.3.1	+	+	+	+	+	+	+
3.3.2	+	+	+	+	+	+	+
3.5.1	+	+	+	+	+	+	+
3.5.2	+	+	+	+	+	+	+
3.5.3	+	+	+	+	+	+	+
3.6.1	+	+	+	+	+	+	+
3.7.1	+	+	+	+	+	+	+
3.7.2	+	+	+	+	+	+	+
7.1.1	+	+	+	-	-	?	-
7.1.2	+	+	+	?	-	-	-
7.1.4	+	-	+	-	-	-	-
7.4.1	+	?	+	-	-	-	-
7.4.2	+	+	+	-	-	-	-
7.4.3	+	?	+	-	-	-	-
7.4.4	+	?	+	-	-	-	-
11.1.1	+	?	-	?	?	+	+
11.1.2	+	+	+	+	+	+	+
15.2.1	+	+	+	-	+	-	+
15.2.2	+	+	+	+	+	-	+
15.3.1	+	+	+	+	+	-	+
15.3.3	+	+	+	+	+	-	+
15.5.1	+	+	+	+	+	-	+
1.5.1	+	-	-	-	-	-	-

Ces isolats sont tous reconnus par les anticorps 3.3.1, 3.3.2, 3.5.1, 3.5.2, 3.5.3, 3.6.1, 3.7.1, 3.7.2 et 11.1.2

#### 4.- ETUDES DE QUELQUES POTYVIRUS AFRICAINS

5 potyvirus africains sérologiquement reliés, d'après la littérature, au Yam Mosaic Virus (Peanut Mottle Virus, Pepper Veinal Mottle Virus, Sugar Cane Mosaic Virus, Grounut Eyespot Virus, Datura Shoestring Virus) ont été testés avec un mélange de 3 monoclonaux permettant de détecter l'ensemble des isolats dont nous disposons.

Les résultats indiquent que tous les échantillons testés sont séro-négatifs vis à vis du mélange d'anticorps monoclonaux utilisé.

Ces travaux ont été présentés au <Premier Séminaire du Réseau Ignames en Afrique>, qui s'est tenu du 26 au 28 octobre 1993 à Cotonou, Bénin.

## CONCLUSION

L'utilisation des anticorps monoclonaux permet de préciser la **diversité biologique** des divers isolats testés, et de distinguer les isolats selon leur provenance géographique.

Ces anticorps ont permis de **distinguer clairement YMV d'autres potyvirus** d'origine africaine.

Le mélange des anticorps **3.5.1+ 3.6.1** (ou **3.5.2 et 3.6.2** ) permet une reconnaissance de tous les isolats étudiés et, ainsi, d'envisager la production et la divulgation d'un **kit de diagnostic anti-YMV** (double sandwich direct, associant polyclonal anti YMV-12 et l'un de ces couples d'anticorps monoclonaux).

## Références

**Goudou-Urbino C., G. Konate, J.-B. Quiot, L. Givord et J. Dubern.** Etude immunologique du virus de la Mosaïque de l'igname. 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)

## V- DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE DU VIRUS DE LA MOSAÏQUE DE L'IGNAME AU BURKINA FASO (C.GOUDOU-URBINO, G. KONATE, J.-B. QUIOT et J. DUBERN)

(I.N.E.R.A., Centre de Kamboinsé, 01 BP 476 Ouagadougou 01, Burkina Faso)  
(I.N.R.A., ENSA, Place Viala, 34060 Montpellier France)  
(L.P.R.C./CIRAD-ORSTOM, CIRAD, BP 5035, 34032 Montpellier France)

### 1 - Introduction

L'Igname, (*Dioscorea spp*, Dioscoreacées) est l'une des principales cultures vivrières des régions tropicales où elle représente 12% de l'alimentation de base. La production mondiale s'élève à 25 millions de tonnes (F.A.O. 1985) dont 95% en Afrique de l'Ouest. Cette culture est sensible à une maladie virale provoquée par le Virus de la Mosaïque de l'Igname (Yam Mosaic Virus, YMV). La maladie s'exprime par l'apparition de symptômes de type "green vein banding", ou de cloques sur les feuilles, et parfois d'un nanisme de la plante. Elle provoque des pertes de rendement de l'ordre de 15 à 25 % chez les principales espèces cultivées (*D. cayenensis-rotundata* ; *D. alata* ; *D. trifida*). Le virus est disséminé soit en culture par des pucerons vecteurs selon le mode non persistant, soit au moment de la plantation par l'utilisation de tubercules-semences virosés. Il s'agit d'un virus filamenteux appartenant au groupe des Potyvirus, et dont un isolat de Côte d'Ivoire a été caractérisé par THOUVENEL et FAUQUET (1979). La répartition géographique du YMV semble s'étendre à toutes les régions productrices d'Igname (Nigéria, Côte d'Ivoire, Togo, Cameroun, Caraïbes, Pacifique).

L'importance de cette culture justifie le fait qu'elle soit depuis quelques années l'objet de thèmes de recherches prioritaires à l'ORSTOM (amélioration génétique), à l'I.N.R.A. mais également dans divers instituts internationaux tels l'I.I.T.A. (International Institute of Tropical Agriculture) et l'I.I.R.S.D.A. (Institut International de Recherche Scientifique pour le Développement en Afrique).

Actuellement, il n'existe aucune méthode de lutte contre cette virose. Le choix raisonné d'une méthode de lutte nécessite l'acquisition de connaissances sur la prévalence de la maladie dans les régions à protéger afin de savoir si son importance justifie la mise en place d'une protection sanitaire. D'autre part, une évaluation de la diversité biologique et sérologique du virus permettrait de mieux choisir les outils de détection nécessaires au contrôle de la maladie.

La disponibilité en anticorps polyclonaux anti-YMV préparés à partir de souches ivoiriennes du virus et, plus récemment, en anticorps monoclonaux préparés également à partir d'une souche ivoirienne, a permis de débiter une étude de détection

sérologique du virus de la Mosaïque de l'Igname au Burkina Faso, ainsi qu'une étude de sa diversité biologique.

Cette étude a été réalisée au Burkina Faso, pays situé à la frontière nord de plusieurs pays producteurs d'Igname dans lesquels l'YMV a été identifié. L'extension de cette culture depuis quelques années, son intensification envisagée en relation avec l'explosion démographique dans ce continent, les échanges fréquents de matériel effectués entre pays voisins dans cette zone, justifient un travail de prospection et de détection de la maladie.

## 2 - MATERIEL ET METHODES

### 2.1 Prospections

Elles ont été effectuées en septembre 1991 et en juillet 1992 (la culture de l'Igname débute en mai et se termine en novembre) dans trois régions de culture traditionnelle d'Igname au Burkina Faso (voir carte ci-jointe). Les régions **Sud-Ouest** et **Sud** produisent à elles deux 75% de la production nationale d'Igname, soit 42 000 tonnes. La région **Centre** a été choisie parce qu'elle est excentrée par rapport aux autres zones de culture d'Igname et que la variété principalement cultivée (*D. cayenensis*, dite Igname de Pilimpikou) n'est pas représentée ailleurs dans le pays.

Le travail a consisté à rechercher la présence de symptômes de mosaïque sur les feuilles. De nombreux échantillons ont été ramenés au laboratoire pour y subir une étude de diagnostic sérologique (ELISA).

Des comptages de plantes présentant des symptômes caractéristiques de mosaïque ont été effectués dans plusieurs parcelles en 1992 ; les résultats sont donnés par parcelle pour plusieurs lots de 100 plantes ( par exemple, 29/1000 signifie que sur 10 X 100 plantes, il a été trouvé au total 29 plantes présentant des symptômes de mosaïque ou des cloques).

### 2.2 - Etude sérologique

La technique ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), utilisée en double sandwich direct, a été appliquée au matériel végétal récolté au cours des prospections 1991 et 1992 (feuilles conservées à -20°C). Ce matériel comporte des plantes (dénommées collection 1991) récoltées en 1991 dans différentes zones de production et cultivées en serre à la Station de recherche de l'IN.E.R.A., à Kamboinsé, (feuilles issues de la germination des tubercules), et des fragments de tubercules (dénommés collection 1992). Un anticorps polyclonal anti-YMV (THOUVENEL et FAUQUET, 1980) est utilisé pour ces tests de détection.

Par la suite, dans le but d'étudier la diversité des isolats, des tests ELISA ont été effectués sur 8 isolats du Burkina Faso en utilisant 23 anticorps monoclonaux (GIVORD, non publié). La technique du double sandwich indirect a été utilisée.

Le matériel végétal est broyé et dilué 1/10 (g/ml). Le seuil de discrimination choisi pour déterminer les échantillons positifs est fixé à 3 fois la valeur moyenne de la densité optique obtenue pour les témoins sains.

### 2.3 - Etude de la gamme d'hôte

L'inoculation mécanique de l'ensemble des isolats de la collection 1991 a été effectuée à partir de feuilles de *N. benthamiana* infectées (selon méthode décrite précédemment) sur différentes plantes hôtes : *N. benthamiana*, *N. glutinosa*, *N. megalosiphon*, *N. rustica*, *N. sylvestris*, *N. tabacum* cv Samsun, *N. tabacum* cv Samsun NN, *N. tabacum* cv Xanthi NN, *Petunia hybrida*, *Datura stramonium*, *Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium quinoa*, *Gomphrena globosa*. Les symptômes ont été notés dès leur apparition et une détection par test ELISA a été effectuée pour confirmer les observations.

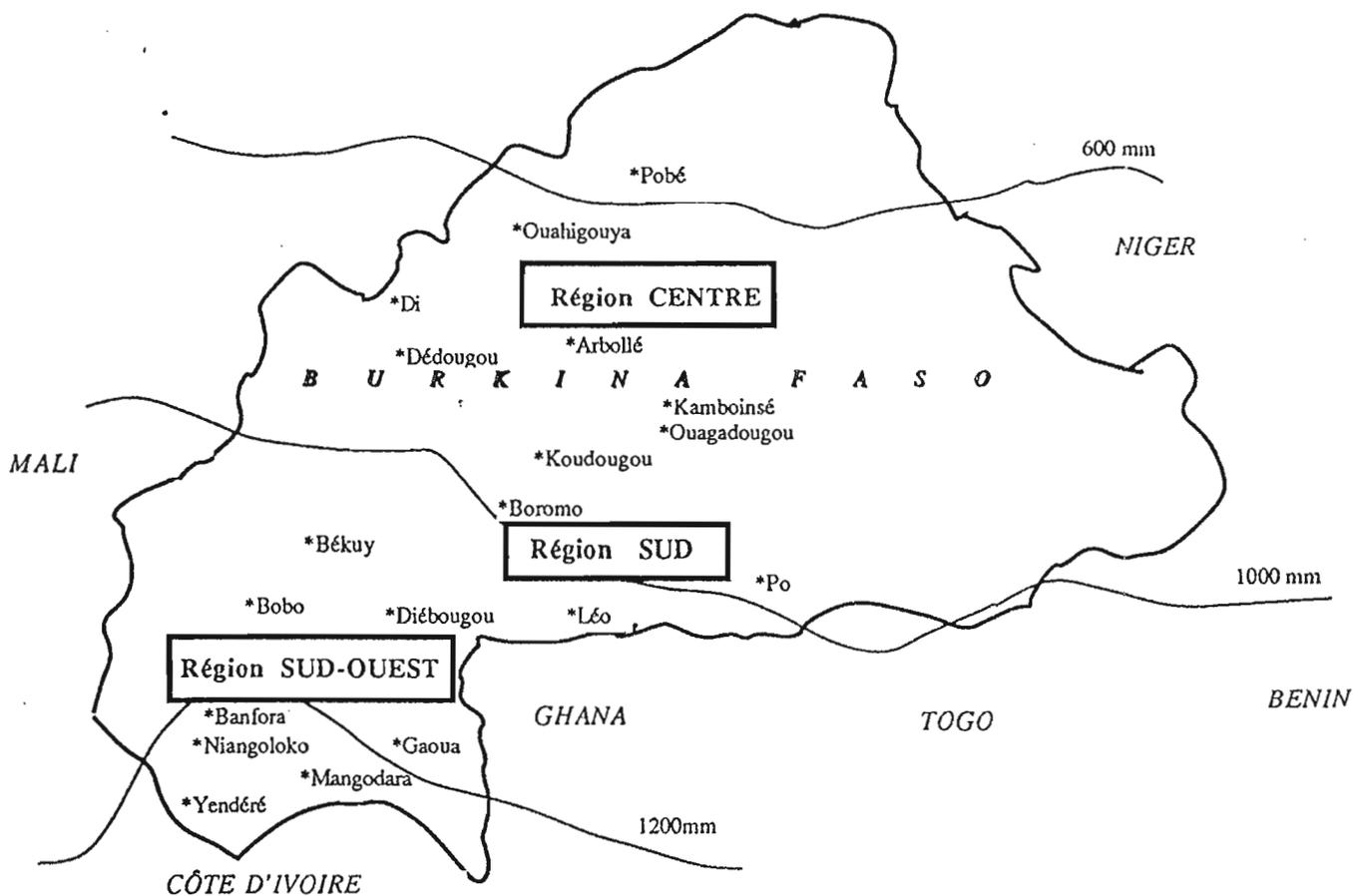
Afin de confirmer les diagnostics obtenus par le test ELISA, une inoculation mécanique des 8 isolats a été réalisée sur des plantes de *Nicotiana benthamiana*, particulièrement sensibles à ce virus (symptômes de mosaïque devant apparaître environ 7 jours après l'inoculation mécanique). La méthode utilisée est la suivante : chaque isolat est inoculé sur 6 plantes de *N. benthamiana* à partir d'un broyat de feuille d'Igname ; le broyage est effectué dans une solution de phosphate de sodium 0,03M, à pH 8,3, additionnée de 0,2% de diéthyl-dithiocarbamate de sodium. Les plantes inoculées sont placées en conditions contrôlées (30°C, 75% H.R.) et observées à partir du 6ème jour après l'inoculation.

### 2.4 - Observations au microscope électronique

La méthode "leaf dip" a été utilisée; après coloration à l'acétate d'uranyle (2%), les extraits bruts de *N. benthamiana* infectés ont été observés à l'aide d'un microscope électronique Jéol JEM-100 CX II.

## 3 - DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE DE LA MALADIE

En septembre 1991, les plantes étaient à un stade de développement très avancé (floraison); au cours des prospections effectuées, il n'a pas été observé de symptômes caractéristiques de la Mosaïque de l'Igname; des prélèvements de feuilles ont cependant été effectués afin de rechercher au laboratoire la présence du virus malgré cette absence de symptôme (Tableau 1).



ZONES DE PROSPECTION DE LA MOSAÏQUE DE L'IGNAME  
AU BURKINA FASO

**TABLEAU 1 : RÉSULTAT DES OBSERVATIONS EFFECTUÉES  
LORS DE LA PROSPECTION DE 1991**

REGIONS	CARACTERISTIQUES DE LA REGION	ESPECES CULTIVEES	SYMPTOMES OBSERVES
<b>SUD-OUEST</b>  11 champs visités	-localisation : frontière avec la Côte d'Ivoire (grand pays producteur et échanges)  - précipitations : 1000 mm/an  - production : 11 000 t d'Igname, soit 25 % de la production nationale  - les variétés des espèces de <i>D. cayenensis</i> et <i>D. alata</i> dominant	<i>D. cayenensis</i>  <i>D. alata</i>  <i>D. bulbifera</i>	cloques sur jeunes feuilles  marbrures et stries jaunes  nécroses
<b>SUD</b>  5 champs visités	- localisation : frontière avec le Ghana  - précipitations: 1100 mm/an  - production : 20 500 t d'Igname, soit 50 % de la production nationale  - <i>D. cayenensis</i> domine sur les autres espèces	<i>D. cayenensis</i>    <i>D. alata</i>	cloques sur jeunes feuilles  enroulement des feuilles  marbrures sur feuilles âgées
<b>CENTRE</b>  4 champs visités	- localisation : nord de Ouagadougou et <u>isolement</u> car à au moins 200 km de toute zone de culture d'igname  - précipitation : 700 mm/an - culture d'igname possible grâce au sol hydromorphe à pseudogley  - production : environ 30 t d'Igname  - la variété locale <i>D. cayenensis</i> (IP) représente 95 % des Ignames cultivées	<i>D. cayenensis</i> IP  <i>D. cayenensis</i> SO  <i>D. alata</i> (rare)	nécroses sur feuilles âgées cloques  pas de symptôme  pas de symptôme

Sous le terme *D. cayenensis*, sont regroupées toutes les variétés de cette espèce, cultivées dans la zone de prospection. Dans la région Centre, la variété locale dite "Igname de Pilimpikou" (IP) est distinguée des autres variétés de la même espèce habituellement cultivées dans le Sud-Ouest (SO).

Une deuxième prospection a été effectuée en juillet 1992, plus précocement au cours de la saison des pluies. Après un début tardif de la saison des pluies en 1992, les plantes étaient au premier stade de leur développement. De nombreux symptômes typiques de la Mosaïque de l'Igname ("Green Vein Banding" = GVB, mosaïque, nanisme) ont été observés dans les trois régions prospectées :

- sur la totalité des plantes de la variété IP dans la Région Centre, mais pas sur les autres variétés présentes dans cette zone (*D. cayenensis* SO, *D. alata*),

- sur de nombreuses plantes dans le Sud Ouest (*D. cayenensis* SO, *D. alata*).
- sur quelques plantes de la Région Sud.

Le **tableau 2** résume ces observations ainsi que les comptages des plantes présentant des symptômes typiques de la Mosaïque de l'Igname.

**TABLEAU 2 : RESULTAT DES OBSERVATIONS EFFECTUEES  
LORS DE LA PROSPECTION EN 1992**

REGIONS	ESPECES CULTIVEES	ESPECES OBSERVEES	PLANTES PRESENTANT DES SYMPTOMES
<b>SUD-OUEST</b>			
Banfora, Bobo-Dioulasso	<i>D. alata</i> <i>D. cayenensis</i>	chlorose chlorose	pas de comptage pas de comptage
Mangodara	<i>D. alata</i> <i>D. cayenensis</i> <i>D. bulbifera</i>	G V B, mosaïque G V B, nanisme pas de symptôme	champ I 29/1000=3% champ 1 30/800 =3,7%
Gaoua, Batié	<i>D. alata</i> <i>D. cayenensis</i>	panachure nécroses	pas de comptage
<b>SUD</b>			
LEO	<i>D. alata</i> <i>D. cayenensis</i>	marbrure G V B, mosaïque	pas de comptage champ 1 6/1000 champ 2 28/1000 champ 3 2/1000
<b>CENTRE</b>			
Arbolle	<i>D. alata</i> (rare) <i>D. cayenensis</i> IP <i>D. cayenensis</i> SO	pas de symptôme G V B pas de symptôme	pas de comptage 100% pas de comptage

## CONCLUSION 1

La première prospection tardive n'a pas permis d'observer des symptômes caractéristiques de la Mosaïque de l'Igname. Cependant, l'année suivante, des symptômes ont été observés dans les trois zones de culture visitées, notamment dans la Région Centre sur l'Igname de Pilimpikou. Les comptages effectués en 1992 dans les différentes régions semblent indiquer une infection particulièrement importante dans la Région Centre en comparaison de celle qui a été constatée dans les deux autres régions.

Afin de disposer, à l'IN.E.R.A.-Kamboinsé, de plantes virosées provenant des différentes zones de culture d'Igname du Burkina Faso, une collection a été constituée en choisissant au hasard des tubercules dans les champs, ou sur les marchés, à la fin de la saison de culture en 1991 et 1992.

## 4 - LE DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE

### 4.1 - Détection avec un anticorps polyclonal

Un témoin positif (échantillon lyophilisé de *N. benthamiana* infecté par une souche ivoirienne de YMV) est utilisé comme référence au cours de notre test. Le témoin négatif est un extrait de feuilles de *N. benthamiana* ou de feuilles d'Ignames selon la nature des extraits testés.

Les résultats des tests effectués sont présentés dans les tableaux 3, 4, 5,6.

**TABLEAU 3 : DÉTECTION (ELISA) DANS LES ECHANTILLONS PRELEVES AU COURS DE LA PROSPECTION EN 1991**

REGIONS	NOMBRE DE PLANTES TESTEES	NOMBRE DE PLANTES SEROPOSITIVES	% DE PLANTES SEROPOSITIVES
SUD-OUEST	102	36	35%
SUD	164	25	15%
CENTRE	72	63	87%

Il n'a pas été fait de distinctions selon les espèces en 1991.

**TABLEAU 4 : DÉTECTION EN ELISA DANS LES ECHANTILLONS PRELEVES AU COURS DE LA PROSPECTION EN 1992**

REGIONS	ESPECES	NOMBRE DE PLANTES TESTEES	NOMBRE DE PLANTES SEROPOSITIVES	% DE PLANTES SEROPOSITIVES
SUD-OUEST Banfora	<i>D. cayenensis</i>	176	22	12,5%
	<i>D. alata</i>	181	18	10 %
Gaoua	<i>D. cayenensis</i>	46	0	0
	<i>D. alata</i>	40	0	0
SUD Léo	<i>D. cayenensis</i>	215	0	0
	<i>D. alata</i>	68	0	0
CENTRE Arbollé	<i>D. cayenensis</i> IP	131	109	85%
	<i>D. cayenensis</i> SO	26	0	0
	<i>D. alata</i>	2	0	0

L'ensemble de ces résultats montre que, dans les trois régions prospectées, il existe sur Igname un virus sérologiquement relié au YMV. D'après les résultats des tests effectués sur les échantillons prélevés lors des prospections (tableaux 5 et 6), la Région Centre apparaît la plus infectée par YMV : 87% d'échantillons virosés en 1991, et 85% en 1992 ; la Région Sud-Ouest supporte un taux d'infection encore important : 35% en 1991 et 12% en 1992; quant à la Région Sud elle reste relativement peu infectée : 15% en 1991 et 0% en 1992.

Les résultats des tests ELISA obtenus pour les collections 1991 et 1992 sont en accord avec ceux effectués sur les échantillons prélevés au cours des prospections dans les régions Sud-Ouest et Centre. Cependant, il n'a jamais été trouvé dans la région Sud d'échantillon positif parmi les échantillons prélevés en 1992 ni parmi les tubercules de nos 2 collections. Ces résultats contradictoires doivent donc être confirmés par de nouvelles prospections et l'étude d'un plus grand nombre d'échantillons.

**TABLEAU 5 : DETECTION (ELISA) DANS LES PLANTES ISSUES DES TUBERCULES COLLECTES EN 1991 EN CHAMPS OU SUR LES MARCHES**

REGION	ESPECE	NOMBRE DE PLANTES TESTEES	NOMBRE DE PLANTES SEROPOSITIVES
SUD-OUEST	<i>D. cayenensis</i>	16	1
	<i>D. alata</i>	8	2
	<i>D. bulbifera</i>	6	0
SUD	<i>D. cayenensis</i>	22	0
	<i>D. alata</i>	5	0
CENTRE	<i>D. cayenensis</i> IP	22	22

Ces premiers résultats ont permis de sélectionner 8 échantillons virosés provenant de deux zones de production (5 échantillons de la région Centre, 3 échantillons de la région Sud Ouest), échantillons qui ont été utilisés par la suite pour l'étude de la gamme d'hôtes, par transmission mécanique, et pour l'étude de la diversité biologique du virus .

**TABLEAU 6 : DETECTION (ELISA) DANS LES TUBERCULES COLLECTES EN 1992 DANS LES CHAMPS OU SUR LES MARCHES**

REGION	ESPECE	NOMBRE DE TUBERCULES TESTES	NOMBRE DE TUBERCULES SEROPOSITIFS
SUD-OUEST	<i>D. cayenensis</i>	15	0
	<i>D. alata</i>	15	0
SUD	<i>D. cayenensis</i>	46	0
	<i>D. alata</i>	30	0
CENTRE	<i>D. cayenensis</i> IP	49	49
	<i>D. cayenensis</i> SO	20	0
	<i>D. alata</i>	2	0

#### 4.2 - Détection à l'aide d'anticorps monoclonaux

23 anticorps monoclonaux ont été testés sur les 8 isolats de notre collection; les résultats partiels actuellement obtenus montrent que :

- 5 anticorps monoclonaux ne détectent que les isolats de la région Centre,
- 8 anticorps monoclonaux ne détectent que les isolats du Sud-Ouest,
- 10 anticorps monoclonaux détectent des échantillons dans les deux zones.

#### CONCLUSION 2

La technique ELISA réalisée avec un anticorps polyclonal anti-YMV (souche de Côte d'Ivoire) a permis de détecter le virus présent dans les plantes d'Igname des régions Centre et Sud-Ouest du Burkina Faso. Une situation particulière semble exister dans la région Centre, isolée de toute autre culture d'Igname, où une variété spécifiquement cultivée semble très infestée.

#### 5 - ETUDE DE LA GAMME D'HÔTES

Des inoculations sur *N. benthamiana* ont d'abord été effectuées à partir des différents isolats de virus présents sur Igname au niveau de la collection. Toutes les plantes qui ont été déterminées séro-positives présentent des symptômes de mosaïque.

L'inoculation mécanique des extraits de l'ensemble des plantes de la collection 1991 sur différentes plantes hôtes a donné les résultats suivants :

- *N. clevelandii*, *N. megalosiphon*, présentent des symptômes de mosaïque et donnent des réactions sérologiquement positives contre le YMV;

- Les autres plantes inoculées se sont révélées séro-négatives .

La présence de particules filamenteuses a été confirmée par des observations en microscopie électronique.

### CONCLUSION 3

Les différents isolats que nous avons rassemblés sont capables d'infecter *N. benthamiana*, *N. clevelandii*, et *N. megalosiphon*. Par contre il n'a pas été possible de les inoculer sur d'autres plantes hôtes.

## 6 - DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE

L'étude sérologique a permis de détecter un virus sérologiquement relié au YMV au Burkina Faso, dans les régions Sud-Ouest et Centre. La gamme d'hôtes de ce virus a été identifiée comme étant restreinte à *N. benthamiana*, *N. clevelandii*, *N. megalosiphon*, en accord avec les travaux de THOUVENEL (1979), et de THOTTAPILLY (1981).

L'étude de la répartition géographique indique que le virus est présent dans le Sud-Ouest dans 10 à 15% des plantes d'Igname cultivées. Ces observations sont comparables à celles de THOUVENEL *et al.* (1989) effectuées dans le Nord de la Côte d'Ivoire.

La présence du Virus dans la région Sud reste à confirmer et nécessite de nouvelles prospections. Le diagnostic du virus dans les tubercules doit être confirmé par des tests sérologiques sur les plantes issues de ces tubercules. Le test actuellement utilisé n'a pas été optimisé pour ce matériel. Des travaux doivent être poursuivis dans ce sens pour permettre une indexation rapide des tubercules-semences.

Le résultat le plus intéressant de cette étude est celui lié à la situation qui prévaut dans la Région Centre, éloignée des autres zones de culture d'Igname, région où le pourcentage de plants atteints avoisine 100 %. Ce taux exceptionnel peut être relié aux techniques agricoles utilisées, à l'absence d'introduction de variétés nouvelles, mais aussi très probablement à la spécificité de la variété cultivée dans cette région (Igname de Pilimpikou). Une étude de DUMONT et HAMON (1986) a montré que cette variété de *D. cayenensis* se rapproche par ses caractères morphologiques du complexe savanicole *D. abyssinica* / *D. lecardii* / *D. sagittifolia*.. L'isolement de cette zone de culture, le peu d'échanges existant entre celle-ci et les autres zones de culture de l'Igname, et le fort pourcentage de plantes contaminées en font une zone à caractéristiques écologiques particulières.

Un autre résultat non négligeable est lié à l'utilisation des anticorps monoclonaux: une grande diversité géographique semble exister parmi les isolats collectés dans les régions Sud-Ouest et Centre. Ces résultats sont d'autant plus intéressants que de nombreux potyvirus ont été trouvés sur l'Igname sans avoir été suffisamment décrits : le *Dioscorea Green Banding Mosaic Virus* (DGMV) au Togo ( RECKHAUS et NIENHAUS, 1981), le Yam Virus (YVN) au Nigéria (TERRY, 1978), un potyvirus sérologiquement proche du YMV de Côte d'Ivoire dans les Antilles françaises (GOUDOU-SINHA, 1990 ; Anonyme, 1993). PORTH *et al.* rapportent qu'il existe une relation sérologique forte entre le DGMV et le YVN mais qu'elle est plus faible avec le YMV identifié en Côte d'Ivoire.

L'ensemble de ces résultats indique qu'il pourrait exister une forte diversité géographique du Yam Mosaic Virus . Il serait donc intéressant d'effectuer une caractérisation de tous les potyvirus cités en Afrique et aux Antilles en utilisant les anticorps monoclonaux dont nous disposons. En outre, il paraît nécessaire de contrôler, sur un plus grand nombre d'isolats en provenance de différentes régions du monde productrices d'Igname (Amérique Centrale, Asie), l'importance de cette diversité géographique du YMV. Par la suite, au plan pratique, ces travaux permettront la caractérisation d'un maximum d'isolats dans le monde puis, la mise au point d'un test de détection de routine et, but ultime, le choix de la méthode de lutte la plus appropriée à la Mosaïque de l'Igname et aux conditions de culture de l'Igname.

Ces résultats, encore préliminaires, permettent en outre d'initier de nouvelles études. En effet, il y aurait lieu d'étudier, de manière soutenue, les autres sites connus (Mali, Bénin), identiques au plan pédologie à la région d'Arbollé (Région Centre) et cultivés avec des variétés identiques ou proches de l'Igname de Pilimpikou, sites susceptibles d'être des sites-réservoirs importants de la maladie.

Ces résultats ont été présentés à la Société d'Ecophysiologie, au cours de la séance tenue le 14 mai 1993 à l'Ecole Normale Supérieure, rue d'Ulm, à Paris.

#### RÉSUMÉ

#### DISTRIBUTION GÉOGRAPHIQUE

#### DU VIRUS DE LA MOSAÏQUE DE L'IGNAME AU BURKINA FASO

L'Igname, principale culture vivrière en Afrique de l'Ouest est sensible à une maladie provoquée par le virus de la Mosaïque de l'Igname (Yam Mosaic Virus, YMV, potyvirus). Afin de prévenir une extension de la maladie par des échanges de matériel végétal, une étude de la répartition géographique du YMV a été effectuée au Burkina Faso dans trois zones de culture. Les résultats des prospections et de l'étude sérologique montrent que le virus est présent dans la Région Sud-Ouest (10 à 15% de plantes infectées) et dans la Région Centre (environ 100% des plantes). La situation écologique de la Région Centre semble très intéressante car la variété principalement cultivée, Igname de Pilimpikou, n'est pas représentée ailleurs dans le pays. De plus, la détection effectuée avec des anticorps monoclonaux a mis en évidence une diversité géographique du YMV. Suite à ce résultat, des perspectives de recherches sont envisagées pour la caractérisation des différents

potyvirus précédemment trouvés sur Igname ainsi que pour la mise au point d'un test de détection de routine permettant de caractériser le maximum d'isolats de YMV dans le monde.

**MOTS CLES :** IGNAME VIRUS AFRIQUE DISTRIBUTION DIVERSITE

#### ABSTRACT

##### Geographical distribution of Yam Mosaic Virus in Burkina Faso

The yam, one of the most important crops in the West Africa, is infected by a disease caused by Yam Mosaic Virus (YMV, potyvirus). In order to prevent YMV extention by free trade, the geographic distribution of the virus was studied in three regions of Burkina Faso. The results of prospections and serological studies showed that the virus was present in the South-Western Region (10 to 15 % of infected plants) and in the Central Region (almost 100 %). The ecological status of the Central Region was specially interesting because of the cultivated variety (Pilimpikou's yam), only present in this region and nowhere else. Moreover, a geographical diversity of YMV was observed by using monoclonal antibodies. New projects were proposed for characterizing the different potyviruses observed on yam in the world and for perfecting a routine test.

#### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ANONYME, 1993 - L'Igname et ses contraintes parasitaires à la Martinique: résultats de l'enquête réalisée en 1991. **Rapport ORSTOM mars 1993**, 24 pp.
- DUMONT, R. et HAMON, P. - 1986 - Une forme originale parmi les Dioscoracées cultivées en Afrique de l'Ouest : l'Igname de Pilimpikou. **Rapport IDESSA 1986**.
- F.A.O. - 1985 - **Annuaire des productions**.
- GOUDOU-SINHA, C. - 1990 - Etude épidémiologique multilocale de la contamination virale de trois espèces d'Igname par le Yam Mosaic Virus à la Guadeloupe. **Rapport de DIAT, ESAT-CNEARC**, 49 pp.
- MIGLIORI, A. et CADHILAC, B. - 1976 - Contribution à l'étude de la maladie du virus de l'Igname *D.trifida* en Guadeloupe. **Ann. Phytopath.** 8, 73-78.
- PORTH, A., LESEMANN, D.E. et VETTEN, H.J. - 1987 - Characterization of potyviruses isolates from West african Yams (*Dioscorea* spp.). **J. Phytopath.** 120, 166-183.
- RECKHAUS, P. et NIENHAUS, F. - 1981 - Etiology of virus disease of White Yam (*Dioscorea rotundata*) in Togo. **Z. Pflkrankh. PflSchutz** 88, 492-509.
- TERRY, E.R. - 1977 - Incidence, symptomatology, and transmission of Yam virus in Nigeria. **Proc. 4th Symp. Int. Soc. Trop. Root Crops**, Cali, Colombia, 1976, 170-173.
- THOTTAPILLY, G. - 1981 - **Annual Report of IITA**, p. 70.
- THOUVENEL, J.-C., BORG-OLIVIER, O. et DUMONT, R. - 1989 - Epidemiology of Yam Mosaic Virus. Importance of aphid transmission. **4th International Plant Virus Epidemiology Workshop**, Montpellier, France, 3-8 Sept 1989.
- THOUVENEL, J.-C. et FAUQUET, C. - 1979 - Yam Mosaic, a new potyvirus infecting *Dioscorea cayenensis* in Ivory Coast. **Ann.appl.Biol.**93 (3), 279-283.
- THOUVENEL, J.-C. et FAUQUET, C. - 1980 - Utilisation de la technique ELISA dans le diagnostic de la Mosaïque de l'Igname. **2ème Conférence Internationale sur l'Impact des Maladies à Virus sur le Développement des Pays Africains et du Moyen-Orient**. Nairobi, 2-6 décembre 1981.
- THOUVENEL, J.-C. et FAUQUET, C. - 1986 - Yam Mosaic Virus. **AAB Descriptions of Plant Viruses**. N° 314.

#### Référence

Goudou-Urbino C., G. Konate, J.-B. Quiot et J. Dubern. Distribution géographique du virus de la Mosaïque de l'Igname 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.

## VI - PRESENCE DU VIRUS DE LA MOSAÏQUE DE L'IGNAME SUR L'IGNAME EN GUYANE ET AUX CARAÏBES.

( J.-B. QUIOT )

(I.N.R.A. , ENSA, place Viala 34060 Montpellier France )

Les résultats des travaux effectués par l'équipe dirigée par J.-B. QUIOT sont exposés ci-après; ils ont été l'objet de deux communications au Congrès de la Caribbean Food Crop Society, tenu en juillet 1993 à la Martinique.

### 1 - Mise en évidence de la présence du Virus de la Mosaïque de l'Ignome sur Ignome (*Dioscorea trifida*) en Guyane.

Divers isolats en provenance de Guyane ont été étudiés à Montpellier. Certains isolats, induisant des symptômes de mosaïque classique sur *Dioscorea trifida*, ont été testés en ELISA contre un antisérum spécifique du Virus de la Mosaïque du Concombre (CMV) et contre un antisérum polyclonal spécifique du Virus de la Mosaïque de l'Ignome (YMV, isolat ivoirien); un isolat inoculé avec succès à *Nicotiana benthamiana* et répondant négativement en ELISA avec le sérum anti-CMV et positivement avec le sérum anti-YMV a été l'objet d'une étude particulière.

La transmission à l'aide de divers genres de pucerons a été précisée: *Myzus persicae*, *Aphis gosypii*, *Aphis spiraecola*, *Macrosiphon euphorbiae*, *Rhopalosiphon padi*; tous ont permis la transmission (mode non persistant) mais avec une efficacité variable selon les genres.

Des essais de transmission mécanique à divers hôtes ont été tentés sans succès hormis vers *Nicotiana benthamiana* et *Dioscorea alata*.

Une étude de microscopie optique permet d'observer des inclusions cytoplasmiques caractéristiques de la présence des potyvirus.

Utilisant la technique d'"electro-immunoblot assay", les protéines de capsides des divers isolats ont été analysées 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.

Ces résultats confirment des résultats préliminaires et permettent d'affirmer la présence d'YMV en Guyane sur *Dioscorea trifida*. Ils permettent d'envisager une diversité

au sein du Yam Mosaic Virus, caractéristique qui est étudiée, par ailleurs, à l'aide d'anticorps monoclonaux et qui sera l'objet d'une étude précise à l'aide de la "polymerase chain reaction".

Cette diversité alliée à un potentiel théorique important de dissémination par vecteur conduit à envisager avec une extrême prudence les échanges internationaux.

## **2 - Etude épidémiologique du Virus de la Mosaïque de l'Ignome en Guadeloupe dans l'objectif d'établir une stratégie de contrôle de la maladie.**

Dans l'objectif d'évaluer l'extension du virus de la Mosaïque de l'Ignome (YMV), des plants garantis sans virus de *Dioscorea cayenensis*-*D. rotundata* et de *Dioscorea trifida* ont été plantés dans deux sites différents en Guadeloupe. La progression de la maladie a été suivie sur les deux espèces, durant toute la saison de culture, par des observations viruelles et par des analyses immunologiques en ELISA.

A la fin de la saison de culture, des infections ont été notées sur les deux espèces, mais le pourcentage de plants infectés s'est révélé beaucoup plus important dans le site de culture traditionnel que dans celui où la culture est rarement effectuée.

Une étude de la fréquence de la maladie sur les trois principales espèces d'Ignome cultivées en Guadeloupe indique que, dans le cas d'une forte pression de la maladie, l'espèce *D. alata* est moins infectée que les deux autres.

Sur la base de ces résultats, il semble donc possible d'envisager une sélection sanitaire dans l'objectif de limiter la prévalence du YMV en Guadeloupe.

### Références

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.

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.

Mise en évidence de la présence du Virus de la Mosaïque de l'Igname sur Igname  
(*Dioscorea trifida*) en Guyane.

M. BOEGLIN, G. LABONNE\*, L. DEGRAS\*\*, L. QUIOT-DOUINE, J.B. QUIOT

INRA Pathologie Végétale ENSA place Viala 34 060 Montpellier Cedex 1

\*INRA Zoologie ENSA PLACE Viala 34 060 Montpellier Cedex 1

\*\*INRA Amélioration des plantes, Domaine Duclos 97 170 Petit Bourg FWI

Introduction:

Les investigations déjà réalisées sur l'igname (*Dioscorea* sp.) ont montré que cette espèce pouvait être naturellement infectée par plusieurs types de phytovirus.

Le type de virus le plus souvent rencontré sur igname appartient à la famille des potyvirus et provoque des symptômes de mosaïque chromatique plus ou moins marquée sur le feuillage d'une plante infectée. L'agent pathogène se présente sous la forme de particules flexueuses de 750 nm environ transmissibles par inoculation mécanique et par pucerons sous le mode non persistant. Il ressort d'études réalisées en Côte d'Ivoire que l'infection par des virus de ce type génère chez l'igname des pertes de rendement de l'ordre de 15 à 20 % (Thouvenel 1989).

De tels virus ont été isolés à partir de plusieurs espèces d'igname dans différents pays du monde et ont été décrits parfois sous des noms différents (Virus de la Mosaïque de l'Igname, Yam Mosaic Virus, *Dioscorea* green banding virus, *Dioscorea trifida* virus...) les données étant en général insuffisantes pour connaître leur niveau de relation et établir s'il s'agit d'isolats identiques d'un même virus ou de souches ou virus différents. C'est le Yam Mosaic Virus (YMV) qui a été le plus étudié et qui constitue actuellement le potyvirus de référence (Thouvenel et Fauquet 198).

Il faut pourtant signaler le cas particulier du "*Dioscorea alata* ring mottle virus" isolé au Togo pour lequel les auteurs sont parvenus à montrer que ce potyvirus était différent du Yam Mosaic Virus et qu'il était à rapprocher du virus de la mosaïque de la Betterave (Beet Mosaic Virus).

Les progrès réalisés dans les techniques de caractérisation du génome et des protéines des potyvirus peuvent permettre d'accéder plus facilement à une connaissance rapide de la diversité géographique de ce type de virus et ont redonné de l'intérêt à la collection d'isolats provenant de différents lieux pour établir les risques d'introduction et d'acclimatation d'agents pathogènes ou de nouveaux pathotypes.

Le but de cette note est de signaler la présence en Guyane d'un virus sérologiquement relié au Virus de la Mosaïque de l'Igname en Guyane et de présenter quelques caractéristiques de cet isolat.

Résultats:

L'isolat de virus qui a été plus particulièrement étudié provient d'un lot de 6 échantillons de feuilles présentant des symptômes qui avait été collecté en Guyane française en 1991.

Ces échantillons présentaient soit des symptômes de mosaïque classique, soit des dessins en arête de poisson répartis le long des nervures principales.

La recherche de virus par test ELISA a montré qu'aucun de ces échantillons ne réagissait avec un antiserum spécifique du Virus de la Mosaïque du Concombre, tandis que trois d'entr'eux réagissaient positivement avec un antiserum préparé par J.C. Thouvenel et al. contre un isolat du YMV collecté en Côte d'Ivoire.

Deux des échantillons négatifs au test ELISA présentaient des symptômes de mosaïque très marqués. Il n'a pas été possible d'en tirer un isolat de virus par inoculation mécanique sur une gamme d'hôtes sensibles au CMV et comprenant *Nicotiana tabacum xanthi*, *Cucumis sativus*, *Cucumis melo* et *Citrullus lanatus*.

L'échantillon N° 6 a été inoculé avec succès à *Nicotiana benthamiana*. C'est cet isolat qui a été plus particulièrement étudié après avoir vérifié qu'il réagissait toujours positivement en ELISA avec un antiserum YMV et négativement avec un antiserum CMV.

#### Transmission par vecteur:

L'isolat N°6 a été transmis de *N. benthamiana* à *N. benthamiana* par plusieurs espèces de pucerons en utilisant des lots de 20 individus ayant été maintenus 6 minutes sur la plante source puis une nuit sur la plante à inoculer. Le succès des transmissions a été vérifié en testant en ELISA, après incubation, les plantes inoculées. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci dessous:

espèce:	<i>Myzus persicae</i>	<i>Aphis gossypii</i>	<i>Aphis spiraecola</i>	<i>Macrosiphon euphorbiae</i>	<i>Rhopalosiphon padi</i>
Plants infectés					
/ inoculés	3/60	29/60	7/60	2/60	1/60

Ces essais montrent que l'isolat de Guyane N°6 a la capacité d'être disséminé par plusieurs espèces de pucerons, sur le mode non persistant, et que certaines espèces, en particulier *A. gossypii*, se révèlent être des vecteurs significativement plus efficaces que d'autres.

#### Inoculation sur hôtes différentiels.

Des inoculations mécaniques de plantes ont été réalisées en utilisant comme source de virus des *Nicotiana benthamiana* infectés de façon systémique par l'isolat N°6. Des feuilles avec symptômes ont été broyées au 1/5 dans une solution saline de  $PO_4HNa_2$ , 0,03M renfermant 0,2% de di-ethyl-di-thiocarbamate de sodium et l'extrait a été frotté sur de jeunes feuilles de plantes sensibles en présence d'un abrasif (carborundum).

Le virus infecte facilement *N. benthamiana* dont les feuilles infestées présentent un symptôme de "vein banding" caractéristique (photo n°1). Ce symptôme (nervures bordées de vert foncé) paraît caractéristique de l'isolat N°6 et n'a pas été observé avec les autres isolats de YMV étudiés.

L'isolat a été aussi transmis par inoculation mécanique de *N. benthamiana* à *Dioscorea alata* par contre aucune infection n'a été obtenue sur *Petunia hybrida*, *Datura stramonium*, *Amaranthus caudatus* ou *Brassica napus*.

## Observations en microscopie optique:

Des observations réalisées sur des lambeaux d'épidermes de *N. benthamiana* infectés qui ont été colorés selon la technique de Christie et Edwardson montrent la présence dans les cellules infectées d'inclusions cytoplasmiques caractéristiques de la présence d'un potyvirus.

## Comparaison de protéines capsides en EIBA:

La technique d'EIBA (electro-immunoblot assay) a été utilisée pour comparer les distances de migrations de protéines capsides de différents isolats de YMV.

La technique est appliquée à des extraits bruts de plantes infectées: son principe utilise l'électrophorèse en gel SDS polyacrylamide pour séparer par leur vitesse de migration les protéines virales des protéines de la plante. Une seconde électrophorèse perpendiculaire à la première permet de transférer ces protéines sur une membrane de nitrocellulose. La révélation de la protéine virale recherchée se fait par le moyen d'une réaction immuno-enzymatique à l'aide d'un antiserum spécifique conjugué à un enzyme catalysant une réaction colorée insoluble.

Plusieurs essais d'EIBA ont été réalisés en mettant en présence des isolats de YMV de diverses origines ainsi que deux antisera polyclonaux préparés contre un isolat ivoirien et un isolat guadeloupéen de YMV. Des résultats analogues ont été obtenus avec les deux antisera, ce qui montre que ces deux antisera contiennent des anticorps qui réagissent avec des épitopes présents sur toutes les protéines capsides des isolats étudiés. Par contre, on constate que les isolats de YMV peuvent se différencier par leurs mobilités électrophorétiques. L'isolat N°6 présente une mobilité électrophorétique identique à celle de l'isolat Côte d'Ivoire et probablement pas différente de celle de certains isolats guadeloupéens. Par contre, il se différencie nettement des mobilités électrophorétiques présentées par d'autres isolats guadeloupéens (photo 2) ou par des isolats provenant du Cameroun(photo 3).

## Conclusion:

On peut tirer de ce travail les conclusions suivantes:

1°) L'isolat N°6 contient un virus transmissible par pucerons sur le mode non persistant et par inoculation mécanique qui induit, dans les cellules infectées, des inclusions cytoplasmiques caractéristiques de la présence d'un potyvirus. Cet isolat réagit positivement en ELISA et en EIBA avec des antisera préparés contre des souches de YMV provenant de Guadeloupe et de Côte d'Ivoire.

Ces résultats permettent d'affirmer qu'il existe en Guyane sur *D. trifida* un potyvirus relié sérologiquement au Yam Mosaic Virus. On complète ainsi les observations réalisées en 1980 par Marchoux et al. qui avaient observé en microscopie électronique des particules virales flexueuses dans un extrait de *D. trifida* provenant de Guyane.

2°) L'isolat étudié présente des caractéristiques particulières (symptomatologie sur *N. benthamiana*, mobilité électrophorétique) qui permettent de le différencier des autres isolats de YMV en cours d'étude au laboratoire. Des études complémentaires sont encore nécessaires pour connaître le niveau de diversité présent au sein du Yam Mosaic Virus en particulier en faisant appel à des techniques complémentaires tel que

l'utilisation d'anticorps monoclonaux ou de la "polymerase chain reaction" (PCR).

3°) Les essais de transmissibilité de l'isolat N°6 par certaines espèces de pucerons montrent que cet isolat a conservé une capacité de dissémination par vecteur bien qu'il infecte une espèce à multiplication végétative qui lui fournit un second mode de dissémination. Des expériences complémentaires restent à réaliser pour vérifier si la transmissibilité par pucerons de *Dioscorea* à *Dioscorea* se révèle aussi efficace que celle observée de *N. benthamiana* à *N. benthamiana*.

4°) La diversité géographique observée entre les isolats de YMV et leur potentiel théorique de dissémination par vecteur doivent conduire à une extrême prudence dans les échanges internationaux de matériel sensible.

EPIDEMIOLOGICAL STUDY OF YAM MOSAIC VIRUS IN  
GUADELOUPE (FWI) TO FORMULATE DISEASE-CONTROL  
STRATEGIES

C.GOUDOU-URBINO (1), L.DEGRAS (2), et J.B.QUIOT (3)

Abstract

In order to evaluate the spreading of Yam Mosaic Virus (YMV, potyvirus), virus-free plants of *Dioscorea cayenensis-rotundata* and *D. trifida* were used for establishing experimental plots in two different locations in Guadeloupe.

The progress of virus disease in the two species was followed during the crop season by repeated visual observations which were later confirmed by ELISA tests.

At the end of the crop season infections were observed in the two species, but, the percentage of infected plants was higher in the location where yam is traditionally grown than in the location where yam is rarely grown.

A study of disease frequency in the three principal species of yam grown in Guadeloupe has shown that in a location where inoculum pressure is high, *D. alata* was less infected compared to the two other species.

On the basis of the results, it seems possible to undertake a sanitary selection in order to limitate the prevalence of YMV in Guadeloupe.

- (1) LPRC/ORSTOM BP 5045 34032 Montpellier cedex
- (2) INRA Antilles-Guyanne. Laboratoire de cultures vivrières  
BP 1232; 97184 Pointe à Pitre Cedex Guadeloupe
- (3) INRA Place Viala Biologie et Pathologie végétale  
34060 Montpellier cedex 1

## CONCLUSION

Le programme <<Amélioration et Valorisation de l'Igname>> financé par la CEE a permis de développer trois groupes d'actions: des actions de recherche, des actions de formation et des actions de coopération scientifique

Les actions de recherche ont été centrées sur:

- la connaissance de la culture *in vitro* de l'Igname dans l'objectif d'obtenir une multiplication aisée de l'Igname par production de vitroplants,
  - la sanitation de ces vitroplants, par culture de méristème et thermothérapie associée ou non à la chimiothérapie,
  - la mise au point d'un kit de diagnostic permettant de déceler aisément le virus de la Mosaïque de l'Igname (technique ELISA double sandwich direct, faisant intervenir anticorps polyclonaux et anticorps monoclonaux,
  - la connaissance propre du virus (biodiversité) nécessaire à cette mise au point,
  - la connaissance propre de cette maladie au Burkina Faso, pays dans lequel une étude distribution géographique a été menée, une étude de diversité biologique du virus, et dans lequel a débuté une étude épidémiologique,
  - la connaissance propre de cette maladie en Guadeloupe et Guyane.
- Ces différentes actions ont été menées à terme pour la plupart ou sont en cours (épidémiologie, biodiversité),
- la connaissance des autres maladies virales de l'Igname: un virus sérologiquement relié au PVX a ainsi pu être identifié dans les vitroplants d'Igname en provenance de Côte d'Ivoire.

Certaines actions sont arrivées à terme : mise au point du kit de diagnostic anti-YMV, étude de la biodiversité, distribution géographique au Burkina Faso, culture des vitroplants et sanitation; elles peuvent (et parfois doivent l'être) être poursuivies pour préciser les résultats et améliorer les technologies proposées (sanitation ou diagnostic).

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.

En outre un contrat (avec SANOFI) devrait permettre de valoriser la mise au point du kit de diagnostic anti-YMV et permettre sa divulgation.

Les actions de formation ont été programmées dès le début de réalisation de ce projet:

- formation doctorale (2 ans) de Mme Cica GOUDOU-SINHA dont le sujet de thèse est <<Écologie 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).
- formation universitaire, stage de licence de Mlle Karine LACOTTE (2,5 mois).

Ce programme a également permis de développer une action de coopération scientifique avec Dr Gnissa KONATE de l'IN.E.R.A. au Burkina Faso. Cette action était prioritaire dans l'éventualité de produire un kit de diagnostic anti-YMV; cette étude nécessitait en effet de disposer d'isolats variés d'YMV. Les résultats obtenus sont importants puisque nous disposons actuellement d'une collection de souches de virus du Burkina Faso; en outre la distribution géographique de la Mosaïque au Burkina Faso a été précisée.

Ce programme a, de plus, permis de poser les bases de nouveaux projets, en cours d'étude dont les objectifs sont la sélection et la création, puis la multiplication de matériel indemne de virus. Les actions envisagées sont les suivantes:

- connaissance du YMV, et des autres virus infectant l'Igname, en Amérique Centrale et en Amérique du Sud, en Asie du Sud-Est (Chine et Indonésie), et en Océanie.
- épidémiologie du YMV au Burkina Faso et Côte d'Ivoire,
- étude de diagnostic des virus de l'Igname en Côte d'Ivoire et en Guadeloupe
- étude moléculaire du YMV, en collaboration avec C. FAUQUET (I.L.T.A.B./S.C.R.I.P., La Jolla, USA) et Pr. LEPOIVRE (Université des Sciences Agronomiques, Gembloux, Belgique),
- transformation génétique de *Nicotiana benthamiana*, en vue de résistance au YMV (stratégie de la coat protein) (C. FAUQUET/ I.L.T.A.B.) et contrôle des résistants au L.P.R.C.,
- transformation génétique de l'Igname en vue de résistance au YMV (Pr. S. MANTELL, Wye College, Unive Londres, G.B.),
- contrôle de la résistance (sélection, sanitation, transformation génétique) en Guadeloupe et en Côte d'Ivoire (ou Burkina Faso) dans des sites pré-étudiés.

Jean DUBERN

## TRAVAUX

Travaux réalisés dans le cadre du programme CEE n°TSD 2A-0116-CI (CD), publiés, soumis à publication, en préparation et communications

- 1 - 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'Igname sur Igname (*Dioscorea trifida*) en Guyane. Caribbean Food Crop Society, Congrès juillet 1993, Martinique. (*communication*)
- 2 - 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*)
- 3 - Goudou-Urbino C., G. Konate, J.-B. Quiot, L. Givord et J. Dubern. Etude immunologique du virus de la Mosaïque de l'Igname. First Seminar of Yam Network in Africa, Oct. 26-28.10.1993, Cotonou Bénin. (*communication*)
- 4 - Goudou-Urbino C., G. Konate, J.-B. Quiot, L. Givord et J. Dubern. Immunological Studies of Yam Mosaic Virus. Phytopathology (*en préparation*)
- 5 - Goudou-Urbino C., G. Konate, J.-B. Quiot et J. Dubern. Distribution géographique du virus de la Mosaïque de l'Igname au Burkina Faso. Société d'Ecophysiologie, séance du 14 août 1993, Ecole Normale Supérieure, rue d'Ulm, Paris France. (*communication*)
- 6 - Goudou-Urbino C., G. Konate, J.-B. Quiot et J. Dubern. Geographical distribution and biodiversity of yam mosaic virus. Tropical Science, (*en préparation*.)
- 7 - 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.
- 8 - 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*)
- 9 - 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*)
- 10 - 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*)
- 11 - 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*)
- 12 - 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 préparation*)
- 13 - 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.
- 14 - 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*).

# ANNEXES

CEE TSD 2A- 0116-CI (CD)

1 - Rapport financier

2 - Publications et communications

# AMELIORATION ET VALORISATION DE L'IGNAME

\*\*\*\*\*

Contrat n° TSD 2A-0116-CI (CD)

\*\*\*\*\*

RELEVÉ DES DÉPENSES POUR LA PÉRIODE  
DU 01.07.92 AU 31.08.93

## RECAPITULATIF

(francs français)

PERSONNEL (dont frais d'allocation 94 000*) .....	1 328 000
DEPLACEMENTS * .....	4 150
UTILISATION DE MATÉRIEL DURABLE .....	122 500
MATÉRIEL NON-DURABLE * .....	146 898
FRAIS DE LABORATOIRE DE KAMBOINSE * .....	23 700
<hr/>	
TOTAL .....	1 625 248 FF

PARTICIPATION DE LA CEE (lignes marquées par \*) ..... **268 748 FF**

(Deux cent soixante huit mille sept cent quarante huit francs français)

Soit 33 % de 1 625 248 FF

L.P.R.C. CIRAD-ORSTOM  
Montpellier le 20.12.1993

Jean DUBERN

**RELEVÉ DES DÉPENSES POUR LA PÉRIODE DU 01/07/1992 AU 31/08/93**

Personnel

Nom	Institut	Localisation	Catégorie	Duré	Coût (estimation)
J. DUBERN	ORSTOM	Montpellier	Chercheur	12 mois	434 000
L. GIVORD	ORSTOM	Strasbourg	Chercheur	2 mois	108 000
B. MALAURIE	ORSTOM	Montpellier	Chercheur	14 mois	506 000
J. ARIBI	ORSTOM	Montpellier	Technicien	3 mois	78 000
J.-B. QUIOT	I.N.R.A.	Montpellier	Chercheur	2 mois	108 000
C. GOUDOU-URBINO	ORSTOM	Montpellier/ Ouagadougou	Allocataire	14 mois	94 000 *
				<b>TOTAL</b>	<b>1 328 000 FF</b>

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 POUR LA PÉRIODE DU 01/07/92 AU 31/08/93**

DEPLACEMENTS

COMMANDE	DESIGNATION	DATE	FOURNISSEUR	FACTURE	MONTANT	CHERCHEUR
<b>1992</b> 8283	Angers 13/07/92	26/03/92	MERIDIONALE V.	37022	1 077,00	B. MALAURIE
<b>1993</b> 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
				<b>TOTAL</b>	<b>4 150,00 F F</b>	

RELEVÉ DES DÉPENSES POUR LA PÉRIODE DU 01/07/92 AU 31/08/93

Utilisation de Matériel Durable

Dénomination	Valeur	% Amortissement	% Utilisation	Montant
Centrifugeuses	400 000	15	10	6 000
Serres / chambres climatiques	600 000	15	50	45 000
Microscope électro.	1 200 000	15	5	9 000
Appareils Labo	2 500 000	25	10	62 500
			<b>TOTAL</b>	<b>122 500</b>

**RELEVÉ DES DEPENSES POUR LA PERIODE DU 01/07/1992 AU 31/08/93**

Matériel Non Durable

COMMANDE	DESIGNATION	DATE	FOURNISSEUR	FACTURE	MONTANT	CHERCHEUR
<b>1992</b>						
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	MALAUURIE
24584	Abonnement	29/09/92	Europériodiques	019-431	5 697,46	MALAUURIE
24585	Abonnement	29/09/92	Lavoisier Abonnem.	21112478	2 485,25	MALAUURIE
24881	Photographies	29/10/92	Photovision	2035	204,46	DUBERN
24882	Matériel informatique	05/11/92	JWP Information Syst	A901027	1 700,84	MALAUURIE
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	MALAUURIE
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	MALAUURIE
24998	Matériel Labo	26/11/92	Labover	71793	553,35	MALAUURIE
24999	Produits chimiques	27/11/92	Sigma Chimie S.A.	355234	1 830,70	MALAUURIE
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
<b>1993</b>						
23693	Produits serres	05/02/93	NIMAGRI	931392	84,00	MALAUURIE
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	MALAUURIE
23692	Produits serres	04/03/93	NIMAGRI	931391	2 852,40	MALAUURIE
25223	Matériel Labo	04/03/93	OSI	227040/237080 /244441	10 429,80	MALAUURIE
26383	Matériel Labo	04/03/93	ELVETEC	53849/59332/ 62249/63788	8 349,00	MALAUURIE
26386	Produits Labo	04/03/93	OSI	227038/232512	3 523,00	MALAUURIE
25020	Produits chimiques	08/03/93	Sigma Chimie S.A.	376988	82,10	MALAUURIE
25224	Matériel Labo	05/03/93	OSI	228392	3 689,91	MALAUURIE
25225	Matériel Labo	05/03/93	ELVETEC	53394	254,00	MALAUURIE
26387	Produits Labo	05/03/93	OSI	227039/233613 /257296	7 890,00	MALAUURIE
26388	Produits Labo	05/03/93	OSI	226545	103,00	MALAUURIE
25018	Matériel centrifugeuse	08/03/93	Poly-Labo Block	979580	5 352,90	MALAUURIE
25019	Produits chimiques	08/03/93	Baeckeroot Labo	20219	1 138,86	MALAUURIE
26389	Transports	09/03/93	DANZAS S.A.	1003258	166,67	MALAUURIE
26391	Produits labo	11/03/93	Baeckeroot	20295	2 642,52	MALAUURIE
26392	Matériel Labo	11/03/93	PRODIS	93/F13842	760,45	MALAUURIE
27001	Bte Rang.Optinett	16/03/93	Poly Labo Block	982350	1862,98	MALAUURIE
				<b>Report</b>	<b>89 547,27</b>	

**RELEVÉ DES DEPENSES POUR LA PERIODE DU 01/07/1992 AU 31/08/93**

Matériel Non Durable (suite)

COMMANDE	DESIGNATION	DATE	FOURNISSEUR	FACTURE	MONTANT	CHERCHEUR
				report	89 547,27	
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
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	4449,68	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	1V/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
				<b>TOTAL</b>	<b>146 898,64</b>	<b>FF</b>

## TRAVAUX

Travaux réalisés dans le cadre du programme CEE n°TSD 2A-0116-CI (CD), publiés, soumis à publication, en préparation et communications

- Bœglin 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'Igname sur Igname (*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'Igname. 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'Igname 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 préparation*)
- 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*).

## The creation of an *in vitro* germplasm collection of yam (*Dioscorea* spp.) for genetic resources preservation

B. Malaurie<sup>1</sup>, O. Pungu<sup>2</sup>, R. Dumont<sup>3</sup> & M-F. Trouslot<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire des Ressources Génétiques et d'Amélioration des Plantes Tropicales – Centre ORSTOM – BP.5045–F. 34032 – Montpellier Cedex 1, France; <sup>2</sup>Laboratoire de Biotechnologie IIRSDA, BP V 51, Abidjan 01, Côte-d'Ivoire; <sup>3</sup>Centre Vivrier, Réseau 'plantes à tubercules' IDESSA/IRAT, BP 635, Bouaké 01, Côte-d'Ivoire; <sup>4</sup>Laboratoire de Biotechnologie – Centre ORSTOM – BP.5045 – F. 34032 – Montpellier Cedex 1, France

Received 15 May 1992; accepted 20 November 1992

**Key words:** active *in vitro* genebanks, *Dioscorea* spp., genetic resources preservation, *in vitro* germplasm collection, *in vitro* tuberization, yam

### Summary

A genetic resources preservation program led to an *in vitro* germplasm collection of yam (*Dioscorea* spp.), obtained by nodal cutting and maintained under slow growth conditions with ((Knop, 1865) in George & Sherrington, 1984) modified medium. The collection comprises accessions of 14 species from Africa and Asia, including edible varieties from the humid intertropical areas, viz 10 wild species (*D. abyssinica*, *D. bulbifera*, *D. burkilliana*, *D. dumetorum*, *D. hirtiflora*, *D. mangelotiana*, *D. minutiflora*, *D. praehensilis*, *D. schimperana*, *D. togoensis*), 5 edible 'species' (*D. alata*, *D. bulbifera*, *D. cayenensis*-*D. rotundata* complex, *D. dumetorum* and *D. esculenta*) and 1 interspecific hybrid (*D. cayenensis*-*D. rotundata* complex, cv. Krengle × *D. praehensilis*). Three factors that may influence the success in transfer from the *in vivo* to the *in vitro* conditions have been studied. These are: the type of introduced material (nodal cutting fragments, seeds and exchanged microplants), the introduction date and the genotype. Some significant differences in success were due to the type of introduced material, whereas the introduction date had no effect. On the other hand, some species showed a greater success in the transfer from the *in vivo* to the *in vitro* conditions than others. The three tuberization types (basal tuberization, aerial tuberization and 'boulage' (tuberization without vegetative development phenomena)), according to species, are discussed.

### Introduction

The genus *Dioscorea* comprises nearly 600 species (Knuth, 1924; Coursey, 1967) distributed all over the humid intertropical zone (Bailey, 1960). Yam domestication would have occurred independently in Asia, in Africa and in America (Burkill, 1939; Chevalier, 1946; Alexander & Coursey, 1969). Today, 40 to 50 species are cultivated, or are collected from the wild (Martin & Degras, 1978). In West Africa,

there are 5 cultivated species, *D. alata* L., *D. cayenensis* Lamk.-*D. rotundata* Poir. complex, *D. esculenta* (Lour.) Burkill, *D. dumetorum* (Knuth) Pax, *D. bulbifera* L. Nevertheless, wild yams (*D. praehensilis* Benth., *D. mangelotiana* J. Miège, *D. abyssinica* Hochst. ex Kunth, *D. hirtiflora* Benth., *D. minutiflora* Engl.) can still form an important component of the human diet (Miège, 1952; Hamon, 1987). Part of the bio-diversity has been collected for the breeding programs and is currently preserved in

field genebanks (Miège, 1952; Hamon, 1987). Significant risks of genetic erosion are linked to this kind of preservation. These risks are mainly due to diseases such as anthracnose and yam mosaic (Haque & Mantell, 1980; Toribio et al., 1980; Thouvenel & Fauquet, 1982; Notteghem, 1985), nematodes (Kermarrec et al., 1980; Bridge, 1982), insects (Sauphanor & Ratnadass, 1985) and rodents. To these risks, are added high maintenance costs, due to a high labour requirement, 370 up to 423 mandays per ha (Onwueme, 1982; Rankine & Ferguson, 1974 stated in Degras, 1986), necessary for mound-making, weeding and stacking. The stacking, which is the most expensive process, is an essential operation due to the very high vegetative growth of the lianas, that may reach 30m in length with more than 1000 leaves (Trousnot, 1985).

As recommended by IITA (IITA annual report, 1981; Ng & Hahn, 1985; Ng & Ng, 1990) and by IBPGR (Hanson, 1986), *in vitro* preservation of these collections avoids these problems. However, this process requires maximum survival rates, slow growth to limit sub-culturing, and should be applicable to all genotypes. In her bibliographic review on yam collection preservation, Hanson (1986) pointed out that currently too few species are maintained under aseptic conditions and that the long term maintenance of these cultures, without a loss of their genetic stability, is uncertain. Therefore, she suggested to sub-culture the clones every two years and to use growth retardants as additives to the culture medium. For example, 0.2M of mannitol has been used for the *in vitro* shoot tips of *D. rotundata* (Henshaw, 1982).

On the Côte d'Ivoire, the use of *in vitro* preservation was considered as early on as 1985. In this paper, the diversity of material introduced into the *in vitro* germplasm collection, and the problems encountered are discussed (the latter include the degree of inoculation success, callus induction difficulties, 'boulage' and tuberization).

## *In vitro* preservation conditions

### *Basic conditions*

The different organs and/or group of organs used to initiate the *in vitro* cultures belong to 3 types: un-nodal cuttings from stem fragments (82,3%), seeds from collecting missions (13%) and *in vitro* plantlets from inter-institute exchanges of plant material<sup>1</sup> (4.7%).

The stem fragments and seeds are both sterilized by soaking in 1% mercuric chloride solution (HgCl<sub>2</sub>) for 1 to 3 minutes. Sterilization is achieved in presence of an absorptive agent (Tween 20). After 4 to 5 washes with sterile water, the nodal cuttings are inoculated into test tubes, filled with 10 to 15ml agar medium, in a laminar air flow cabinet. Test tubes (24mm diameter; 15cm high) are closed by a polycarbonate cap and sealed with an extensible transparent film.

*In vitro* cultures are maintained at a temperature of 28°C ± 2°C under a 16h or 12h per 24 hours photoperiod. Light flux of about 120µE m<sup>-2</sup>.sec<sup>-1</sup> is provided by equal numbers of Grolux and Coolwhite fluorescent tubes. Each clone, represented by 14 replicates, is sub-cultured every 6 to 12 months depending the clone in question. Subculturing is carried out so as to maintain, for each clone, a number of physiological development stages.

The basal culture medium contains Knop's modified mineral nutrients, Murashige's and Skoog's (1962) modified vitamins, 3% sucrose and 0.8% agar, 0.2% activated charcoal and 200mg.l<sup>-1</sup> glutamin (Table 1). This medium is used for *in vitro* maintenance under minimal growth conditions. This medium is adequate for the introduction of most of the clones (86%). For the difficult cases, a so-called 'introduction' medium was necessary. Here, the activated charcoal and glutamin are replaced by a balance of plant growth regulators NAA/BAP (1mg.l<sup>-1</sup>

<sup>1</sup> In addition to the plant material taken from the Côte d'Ivoire field collections since 1985, some plant material 'importations', for *in vitro* introductions, have occurred between 1986 and 1990 with the usual phytosanitary recommendations for foreign material received in the form of tubers: [Brazil (1987-89), Cameroun (1986-89-90), Guadeloupe (1986), New Caledonia (1986-89), Martinique and Polynesia (1988), Puerto Rico (1986)].

and 0.2 mg.l<sup>-1</sup>, respectively). After induction, the difficult clones are sub-cultured onto the basal culture medium. A certain number of studies refer to the *in vitro* micropropagation of yam nodal cuttings and/or to tuberization phenomenon observations, with or without growth regulators (Uduebo, 1971; Mantell et al., 1978; Arnolin, 1980; Cortes Monllor et al., 1982; Forsyth & Van Staden, 1982; Espiand, 1983; Ammirato, 1984; Forsyth & Van Staden, 1984; Fautret et al., 1985; Lacoïnte & Zinsou, 1987; Ng, 1988; Dalouman, 1989; Mantell & Hugo, 1989; Jean & Cappadocia, 1991).

Table 1. Low growth medium composition

	Low growth	
	2 GGC	medium
Macronutrients	mg.l <sup>-1</sup>	mM
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	1000	4.2
(NH <sub>4</sub> ) SO <sub>4</sub>	250	1.9
Mg SO <sub>4</sub>	250	1.0
7 H <sub>2</sub> O KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	250	1.8
KCl	250	3.4
Micronutrients	mg.l <sup>-1</sup>	µM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1	16
Mn SO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	0.755	4.5
Zn SO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	1	3.5
Cu SO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	0.03	0.1
Al Cl <sub>3</sub>	0.03	0.2
Ni Cl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	0.03	0.1
Fe SO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	27.8	100
Na <sub>2</sub> EDTA. 2 H <sub>2</sub> O	37.25	100
Organic compounds	mg.l <sup>-1</sup>	mM
Glycin	2	44.4
Myoinositol	100	550
Nicotinic acid	5	40.6
Pyridoxin HCL	0.5	2.5
Thiamin HCL	0.5	1.5
Biotin	0.05	0.2
Folic acid	0.5	1.1
Glutamin	200	1370
Sucrose (g.l <sup>-1</sup> )	30	
Activated charcoal (g.l <sup>-1</sup> )	2	

### Factors influencing success

Three factors may influence the success of the passage from the *in vivo* to the aseptic culture condition: the type of explant material (uninodal cutting of stem fragment, seeds and exchanged microplants), introduction date and the genotype.

In the first case, differences in success rates was found due to the type of introduced material; seeds show the highest rate of success (92%) which is significantly different from uninodal cutting stem fragments (78%). Introduction in the form of *in vitro* plantlets gave 61% success, but populations were too small to allow a statistical comparison (Table 2).

Next, the period over which plant material can be introduced *in vitro* through nodal cuttings is dependent upon the yam cultivation cycle for the tuber crop harvest, at the end of December to the beginning of January. The dormancy period, which is very variable from one clone to another, forced inoculations to be staggered in time, between February and July. Nevertheless, it was found that introduction date has no effect on *in vitro* inoculation success.

Lastly, the percentage of inoculation success varies from one species to another. *D. alata* showed the highest success level (84%) which differed significantly from the *D. cayenensis*-*D. rotundata* complex (59%). *D. esculenta* displayed 80% success, but insufficient population sizes did not allow a statistical comparison. With *D. togoensis* Knuth and *D. du-*

Table 2. Influence of the type of material introduced on inoculation success

	Observed values		
	<i>In vitro</i> plantlets <sup>1</sup>	Nodal cuttings	Seeds
Introduction number	13	246	40
% success	61	78	92

<sup>1</sup>Insufficient theoretical sample size (<3).

Comparison Nodal cuttings/Seeds		
X <sup>2</sup> =6.439	df = 1	S for the level 0.01 < p < 0.02

*metorum*, with a smaller population size, the rate of success was respectively 7 of the 10 and 2 of the 3 introduced clones (Table 3). To sum up, only one attempt at inoculation was required for 244 clones of the 299 introduced. However, some of the clones required 2 to 3 attempts at inoculation over several years, before they could be maintained *in vitro* by sub-culture. In addition, after 5 years of *in vitro* micropropagation, the clones of *D. alata* displayed a significant difference in their *in vitro* survival (84%) compared to clones of the *D. cayenensis*-*D. rotundata* complex (71%) (Table 3). These latter were also more slow to adapt to *in vitro* culture conditions: nodal cutting bud(s) were often choked by the proliferation and bursting of tissues. Their initiation required callus induction, followed by sub-culturing onto the maintenance medium.

## Tuberization

### Types of tuberization

*In vitro* tuberization was observed for 9 species out of a total of 14 introduced into the *in vitro* germplasm collection and also for the interspecific hybrids (Malauric & Tardieu, 1988). This occurs, depending on the clones, between 2 and 12 months, after a sub-culture. Three types of tuberization were observed:

- basal tuberization or formation, at the level of the original nodal bud, of a tuber or a microtuber in the agar medium. This phenomenon was observed in 9 species and the 12 interspecific hybrid clones (Fig. 1);
- acrial tuberization or acrial microtuber(s) formation on the vegetative part, at the level of the axillary buds (next to the leaf axil). This second type of tuberization was observed for all but three (*D. hirtiflora*, *D. mangenotiana* and *D. schimperana* Hochst. ex Kunth) of the species

Table 3. Number of clones, by species, capable or not to be introduced and maintained *in vitro*

Species	Total number of clones introduced	Introduction	Maintenance
		Clone introduction success <sup>4</sup>	Number of clones maintained <i>in vitro</i> <sup>3</sup>
<i>D. alata</i>	109	92 <sup>2,2</sup>	74 <sup>4,2</sup>
<i>D. bulbifera</i>	8	8 <sup>1</sup>	8 <sup>2,5</sup>
<i>D. cayenensis</i> - <i>D. rotundata</i> complex	117	69 <sup>2,2</sup>	68 <sup>2,2</sup>
<i>D. esculenta</i>	10	8 <sup>2,5</sup>	3 <sup>2,5</sup>
<i>D. mangenotiana</i>	14	14 <sup>1</sup>	14 <sup>2,5</sup>
<i>D. togoensis</i>	10	7 <sup>1</sup>	7 <sup>2,5</sup>
Interspecific hybrids	16	16 <sup>1</sup>	12 <sup>2,5</sup>
<i>D. dumetorum</i>	3	2 <sup>1</sup>	2 <sup>1</sup>
<i>D. hirtiflora</i>	1	1 <sup>1</sup>	1 <sup>1</sup>
<i>D. prachensis</i>	3	3 <sup>1</sup>	3 <sup>1</sup>
<i>D. schimperana</i>	1	1 <sup>1</sup>	1 <sup>1</sup>
	X <sup>2</sup> global	17.77	4.114
	df	1	1

<sup>1</sup>Species not analyzed by a statistical comparison for *in vitro* introduction and maintenance.

<sup>2</sup>Species examined by statistical comparison.

<sup>3</sup>Values followed by different letters are significantly different for 0.02 < p < 0.05, after comparison with the X<sup>2</sup> Pearson test.

<sup>4</sup>Values followed by different letters are significantly different for p < 0.001, after comparison with the X<sup>2</sup> Pearson test.

<sup>5</sup>Insufficient theoretical sample size (<3).

which developed *in vitro* basal microtuber (Fig. 1);

- tuberization resembling 'boulage' (Madedc in Courduroux, 1967) which results in the formation of a microtuber without development of a leafy stem. This third type of tuberization was observed on a number of clones belonging to 3 species: *D. alata* (10 clones over 71<sup>2</sup>; *D. bulbifera* (1 clone over 8); *D. cayenensis-D. rotundata* complex (19 clones out of 105<sup>2</sup>).

### Tuberization ability

The five species most represented in the collection (*D. alata*, *D. bulbifera*, *D. cayenensis-D. rotundata* complex, *D. mangenotiana*, *D. togoensis* and the interspecific hybrids) were compared for their ability to produce tubers under the described tissue culture conditions (Fig. 1).

<sup>2</sup> The clones introduced into the *in vitro* germplasm collection, in 1990, were not taken into account.

Table 4. Number of clones per species with aerial and basal microtubers

Species	Tuberization		
	Total observed clones	Clones with aerial microtubers <sup>3</sup>	Clones with basal microtubers <sup>4</sup>
<i>D. alata</i>	71	40 <sup>c2</sup>	66 <sup>32</sup>
<i>D. bulbifera</i>	8	8 <sup>2</sup>	8 <sup>2,5</sup>
<i>D. cayenensis-D. rotundata</i> complex	105	19 <sup>6h2</sup>	55 <sup>32</sup>
<i>D. esculenta</i>	3	0	0
<i>D. mangenotiana</i>	14	0	14 <sup>2,5</sup>
<i>D. togoensis</i>	7	3 <sup>2,5</sup>	7 <sup>2,5</sup>
Interspecific hybrids	14	7 <sup>6h2</sup>	14 <sup>2,5</sup>
<i>D. dumetorum</i>	2	2 <sup>1</sup>	2 <sup>1</sup>
<i>D. hirtiflora</i>	1	0	1 <sup>1</sup>
<i>D. praehensilis</i>	1	1 <sup>1</sup>	1 <sup>1</sup>
<i>D. schimperana</i>	1	0	1 <sup>1</sup>
	X <sup>2</sup> global	28.78	32.401
	df	2	1

<sup>1</sup>Species not considered by a statistical comparison for *in vitro* tuberization.

<sup>2</sup>Species analyzed by statistical comparison.

<sup>3</sup>Values followed by different letters are significantly different for  $p = 0.01$ , after comparison 2 by 2 with the Ryan test.

<sup>4</sup>Values followed by different letters are significantly different for  $p < 0.001$ , after comparison with the X<sup>2</sup> Pearson test.

<sup>5</sup>Insufficient theoretical sample size (<3).

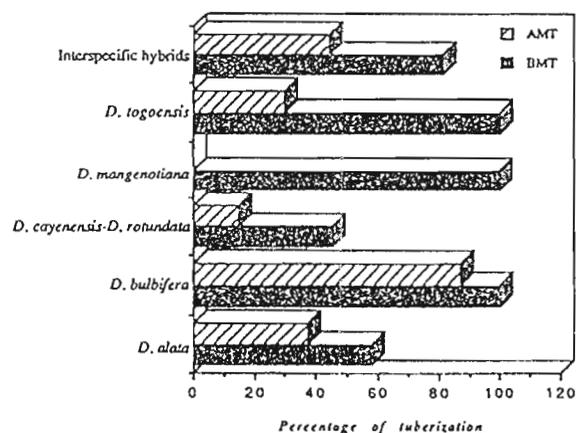


Fig. 1. Percentage of tuberization (basal microtuber-BMT and aerial microtuber-AMT) of 'species' with at least 8 introductions. The other species (*D. dumetorum*; *D. hirtiflora*; *D. praehensilis* and *D. schimperana*) with less than 8 introductions have not been considered on this histogram.

For aerial microtuber formation, a significant difference at the 1% level was observed between *D. alata* (56% of clones with aerial microtuber formation) and the *D. cayenensis-D. rotundata* complex,

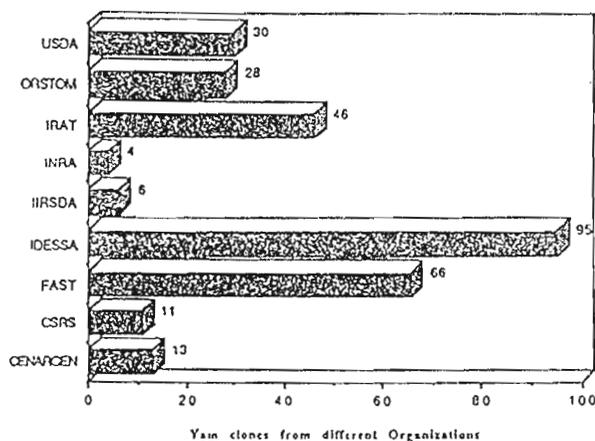


Fig. 2. Organization and importance of their contributions to the creation of a yam (*Dioscorea* spp.) *in vitro* germplasm collection by nodal cutting. Cenargen/Embrapa, Brazil; CSRS, Orstom and IIRSDA (Institut International de Recherche Scientifique pour le Développement en Afrique), Research Centre of Adiopodoumé, Côte d'Ivoire; Fast, Abidjan, Côte d'Ivoire; Inra-Guadeloupe; USDA, Mayaguez Institute of Tropical Agriculture, Puerto Rico.

*D. togoensis* and the interspecific hybrids (18 to 50% of clones with aerial microtuber formation) (Table 4).

For basal tuber formation, only *D. alata* and the *D. cayenensis-D. rotundata* complex, with sufficient population sizes, were compared. A very high significant difference was found with a high basal tuberization percentage for clones *D. alata* (93%) compared to the *D. cayenensis-D. rotundata* complex (52%) (Table 4). These two types of tuberization, basal and aerial, can develop on the same microplant.

Basal and aerial microtubers allow potential by higher success rates upon transfer to the field (Ng, 1988).

### Genetic diversity of the *in vitro* collection

#### Origins of the introduced material

The plant material came from different live collections maintained in the field located in Côte-

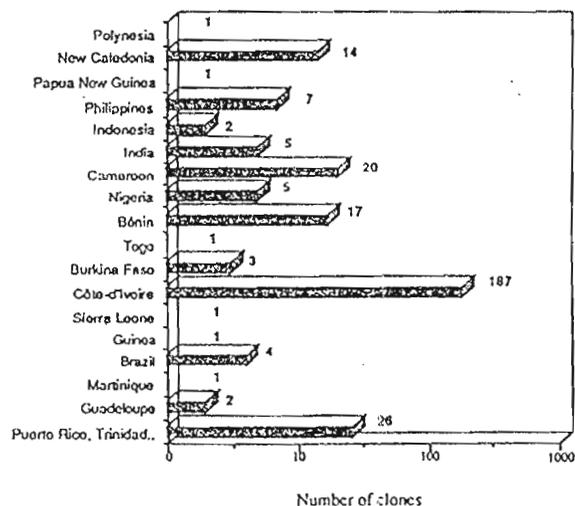


Fig. 3. Countries of origin of the plant material and importance of their contribution to the constitution of a yam (*Dioscorea* spp.) *in vitro*, genetically diversified, germplasm collection maintained in the form of nodal cuttings.

d'Ivoire<sup>3</sup>, Guadeloupe<sup>4</sup>, Martinique<sup>5</sup>, New Caledonia<sup>5</sup>, French Polynesia<sup>5</sup>, or from collecting missions or from an *in vitro* collection based in Brazil<sup>6</sup> (Fig. 2). Some of the in-field collections, had been enriched in the past, by the transfer of traditional clones from diverse geographical areas (Degras, 1986)<sup>7</sup>. Therefore, the clones introduced *in vitro* into our collection, came from a range of 18 different geographical regions (Fig. 3). However, the countries from which the traditional clones came were not necessarily those from which the particular species originated or in which it was cultivated (Table 5, (1)). For example, for the Asian species *D. alata*, only 17% of clones came from the diversity centres of South-east Asia, as opposed to 78% originating from South America and the Caribbean.

<sup>3</sup> Fast/Ensa, Fast/Bouaké, Idessa/Cirad-Irat/Bouaké, Orstom/IIRSDA/Adiopodoumé.

<sup>4</sup> Inra/Petit-Bourg.

<sup>5</sup> Cirad/Irat.

<sup>6</sup> Cenargen/Embrapa.

<sup>7</sup> The transfer of certain clones of 3 'species' (*D. alata*, *D. esculenta* and the *D. cayenensis-D. rotundata* complex) present in the 'M.I.T.A.' collection [Mayaguez Institute of Tropical Agriculture (Puerto Rico)] in the Orstom collection had been performed by Martin in 1974.

### Interspecific diversity of the introduced material

The interspecific diversity of the *in vitro* germplasm collection is important. Among the 20 species of *Dioscorea* in Tropical West Africa (Miège, 1968), 13 were introduced *in vitro* germplasm collection, 3 of which were edible and widely cultivated (*D. alata*, *D. cayenensis-D. rotundata* complex, *D. esculenta*), 2 included edible forms as well as toxic wild varieties (*D. bulbifera*, *D. dumetorum*), 8 were wild (*D. abyssinica*, *D. burkilliana* J. Miège, *D. hirtiflora*, *D. mangelotiana*, *D. minutiflora*, *D. praehensilis*, *D. schimperana*, *D. togoensis*). Moreover, 1 interspecific hybrid (*D. cayenensis-D. rotundata* complex, cv. Krengle × *D. praehensilis*) was also introduced (Fig. 4). These 14 'species' are all annuals except for *D. burkilliana* and *D. minutiflora* which are perennials and *D. mangelotiana* which is half-perennial. Only 7 wild West-African species<sup>8</sup> are not yet included in the *in vitro* germplasm collection.

<sup>8</sup> *D. lecardii* De Wild, *D. liebrechtsiana* De Wild, *D. preussii* Pax, *D. quartiniana* A. Rich, *D. sagittifolia* Pax, *D. sansibarensis* Pax and *D. smilacifolia* De Wild.

### Intraspecific diversity of the introduced material

To this interspecific diversity may be added a great intraspecific variation. Two 'species' (*D. alata* and *D. cayenensis-D. rotundata* complex) are represented by over 100 different accessions. Four other species (*D. esculenta*, *D. bulbifera*, *D. mangelotiana*, *D. togoensis*) and the interspecific hybrid have between 8 and 16 accessions each. The other species which are represented by between 1 and 4 should be enlarged by new introductions so as to enhance intraspecific variability.

An important percentage of the field collections of Côte d'Ivoire have been introduced into the *in vitro* collection. In addition, 53% (95 introduced clones), 52% (66) and 81% (57), respectively, of the in-field collections of Idessa and Fast, based in Bouaké, together with those from Orstom/Iirsda, based in Adiopodoumé, are represented.

Moreover the groups established within *D. alata* (N'za group, purple flesh (25 accessions); Bété Bété group, white flesh (28 accessions); not presently identified (56 accessions)) have *in vitro* representatives. Those introduced from the *D. cayenensis-D.*

Table 5. Distribution of the introduced clones according to region of origin

		DA <sup>6</sup>		DE <sup>6</sup>		DB <sup>6</sup>	DCR <sup>6</sup>
		(1)	(2)	(1)	(2)	(2)	(2)
Zone I <sup>3</sup>	New Caledonia	10	10			2	2
	Pacific			1	1		
Zone II <sup>4</sup>	Cameroon	1	1			2	18
	Nigeria	2	2				
Zone III <sup>5</sup>	Brazil	13	13				4
	Caribbean	34	12	9			4
Total		60	38	10	1	4	28

(1) Total clones present in the *in vitro* germplasm collection of which the importation origin depends on foreign collecting missions and importation field collection transfer.

(2) Recently introduced clones in the *in vitro* germplasm collection which didn't appear previously in field collection of the Côte d'Ivoire and whose initial origin didn't belong to Côte d'Ivoire.

<sup>3</sup>South-East Asia.

<sup>4</sup>West and Central Africa.

<sup>5</sup>South America and the Caribbean islands.

<sup>6</sup>DA, *D. alata*; DB, *D. bulbifera*; DE, *D. esculenta*; DCR, *D. cayenensis-D. rotundata* complex.

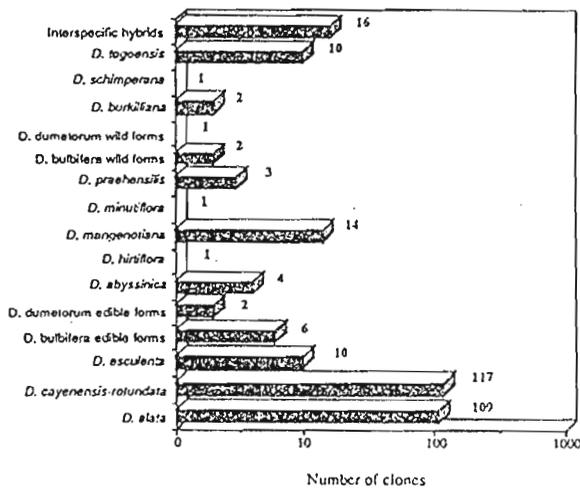


Fig. 4. Different edible and wild cultivated species, and wild toxic species introduced into the yam (*Dioscorea* spp.) *in vitro* germplasm collection maintained by nodal cutting.

*rotundata* complex (Hamon et al., 1986) represent the majority (17 groups or 85%) (Table 6).

On the other hand, a significant proportion of the *in vitro* germplasm collection comes from the introduction by *in vitro* methods of new varieties to Côte d'Ivoire (Table 5, (2)); their membership of the established groups within the two most represented 'species' will be possible by enzymatic characterization using starch gel electrophoresis with the *in vitro* germplasm (unpublished results) and morphological and enzymatic characterization after the *in vitro-in vivo* transfer.

#### *In vitro* preservation security

In order to provide better protection for the plant material, Hanson (1986) recommended that a number of replicates, at least 5, be kept for each clone. In our case, we have limited the *in vitro* collection to a minimum of 12 test tubes per clone. A replicate of the *in vitro* collection, with 2 replicates per clone is stored in another tissue culture room, which increase the safety of the collection.

This author also suggested at least 2 replicates for an *in vitro* collection be kept in different geographical areas (IBPGR, 1985). Currently, the yam *in vitro* nodal cutting germplasm collection exists in trip-

licate, of which two are in the same geographical site (Iirsda and Fast, in Côte d'Ivoire). The third replicate has been transferred to France to the Genetic Resources and Tropical Plant Breeding Laboratory (LRGAPT) of the Orstom centre in Montpellier. These transfers of *in vitro* material are usually not particularly sensitive, with a loss below 5%. The latter resulted in a loss of 14% of the duplicate clones.

#### Conclusions and perspectives

We have shown that an 'active *in vitro* genebank' (IBPGR, 1985) was feasible in a genetic resources preservation program with a yam nodal microcuttings under minimal growth conditions. We succeeded in the introduction and maintenance by micropropagation of other species by nodal cutting (*D. burkilliana*, *D. mangelotiana*, *D. minutiflora*, *D. praehensilis*, *D. schimperana* and *D. togoensis*), which, to our knowledge, are not mentioned in the literature. The range of *in vitro* recovery and maintenance problems observed could be due to the monocotyledonous material, as described by Hunault (1979). The establishment of the collection in a humid tropical area did not create any major technical problems and its transfer to distant geographical zones lead to the loss of 14% of the total accessions. This loss is explained by a transfer of some nodal cuttings recently inoculated *in vitro* without any shoot development of the axillary buds, most of them belong to the *D. cayenensis-D. rotundata* complex and did not develop any leafy shoot. However, some of the species showed a higher aptitude to *in vivo-in vitro* transfer.

*In vitro* germplasm collections have the advantage of providing a collection of preserved material taking up little space, under phytosanitary conditions, after virus indexing, and free from fungi and bacteria. This enables the transfer of plant material without quarantine problems (Hanson, 1986). The preservation of genetic resources requires the establishment of a minimal collection or 'core collection' (Frankel & Brown, 1984) to be created in order to maintain a high level of genetic diversity within a restricted number of individuals. In Côte

d'Ivoire, the last yams added to the field collections were selected according to these recommendations (Hamon et al., 1986).

The reduced number of sub-culturing operations due by the use of dilute medium, and the lack of plant growth regulators in the medium allows somaclonal variation to be reduced and so preserve material conformity (Ammirato, 1984; Ducreux et al., 1986). *In vitro* methods, such as *in vitro* micro-propagation by nodal cutting, basal microtuber, aerial microtuber, somatic embryos permit an easy transfer of material from one point of the globe to another (Ng, 1988). Moreover, after virus indexation, the use of meristem tip cultures should assist in the production of virus-free and other pathogen-free microplants (Saleil et al., 1990).

In the future the use of cryopreservation, from meristems, zygotic or somatic embryos, should enable the constitution and maintenance of 'base *in vitro* genebanks' (IBPGR, 1985). This type of preservation should protect specific clonal stocks and allow the long term maintenance of a large genetic diversity.

### Acknowledgements

This work was carried out in the Laboratory of Biotechnology in the ORSTOM, afterwards IIRSDA, Adiopodoumé research station, near to Abidjan, in Côte d'Ivoire, and, was assisted by a EEC support [STD2, TS2A-0116-CI. (CD)]. The authors would like to thank Professor Bakary Tio-Touré, rector of the university of Abidjan, as the manager of the yam research program, in Côte d'Ivoire; Dr. J.-C. Thouvenel for the phytosanitary controls of the introduced material; Dr. M. Noirot and Dr. S. Hamon for their advice and comments; Dr. J. Beeching for correcting the English.

### References

- Alexander, J. & D.G. Coursey, 1969. The origin of yam cultivation. In: P.J. Ucko & G.W. Dimbleby (Eds.), *The domestication and the exploitation of plants and animals*. Duckworth, London, pp.405-425.
- Ammirato, P.V., 1984. Yams. In: P.V. Ammirato et al. (Eds.), *Handbook of Plant Cell Culture*, Vol. 3. Crop Species. Macmillan, New York, pp.327-354.
- Arnolin, R., 1980. Culture *in vitro* et amélioration de l'igname (*Dioscorea* L.). L'igname. Séminaire International, Pointe-à-Pitre, INRA, pp.255-268.
- Bailey, L.H., 1960. *Manual of cultivated plants*. Revised edn. Macmillan, New York.
- Bridge, J., 1982. Nématodes of Yams. In: J. Miège & S. Lyonga (Eds.), *Yams-Igname*. Clarendon Press, Oxford, pp.253-264.
- Burkill, I.H., 1939. Notes on the genus *Dioscorea* in the Belgian Congo. *Bull. Jard. Bot. Etat, Bruxelles* 15: 345-392.
- Chevalier, A., 1946. Nouvelles recherches sur les ignames cultivées. *Rev. Int. Bot. Appl. Agric. Trop.* 26 (279-80): 26-31.
- Cortes Monllor, A., L.J. Liu & E. Arroyo, 1982. An improved medium for tissue culture of yam *Dioscorea* sp. *in vitro* in Puerto Rico. *Phytopathology* 72 (1): 171.
- Courduroux, J.C., 1967. Etude du mécanisme physiologique de la tubérisation chez le topinambour (*Helianthus tuberosus* L.). *Ann. Sc. Nat. Bot.* 8: 215-356.
- Coursey, D.G., 1967. *Yams*. Longmans, London, 230pp.
- Dalouman, R., 1989. Evolution des sucres solubles majeurs et des activités invertase acide dans les différents organes au cours de la croissance des vitroplants d'igname (*Dioscorea alata* L.). Recherche d'un modèle de tubérisation *in vitro*. DEA. Faculté des Sciences et Techniques, Abidjan, 75pp.
- Dégras, L., 1986. L'igname. *Techniques Agricoles et Productions Tropicales*, Ed. G.P. Maisonneuve et Larose & Agence de Coopération Culturelle et Technique, 409pp.
- Ducreux, G., L. Rossignol & M. Rossignol, 1986. La pomme de terre. *La Recherche* 17 174: 192-203.
- Espiand, H., 1983. Conséquences de la culture *in vitro* sur la morphogénèse de boutures nodales de l'igname (*Dioscorea alata* L. cv 'Tahiti'). Thèse 3<sup>ème</sup> cycle, Paris XI, Orsay, N° 3460, 80pp.
- Fautret, A., P. Dublin & P. Chagvardieff, 1985. Callogenèse et néoformation chez deux espèces d'ignames comestibles, *Dioscorea alata* et *D. trifida*. Communication VII Symp. ISTRC, Guadeloupe.
- Forsyth, C. & J. Van Staden, 1982. An improved method of *in vitro* propagation of *Dioscorea bulbifera*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 1 (4): 275-281.
- Forsyth, C. & J. Van Staden, 1984. Tuberization of *Dioscorea bulbifera* stem nodes in culture. *J. Plant Physiol.* 115: 79-83.
- Frankel, O.H. & A.H.D. Brown, 1984. Current Plant Genetic Resources. A critical appraisal. In: Chopra, Joshi, Sharma & Bansal (Eds.) *Genetics News Frontiers*, vol. IV, 3-13.
- George, E.F. & P.D. Sherrington, 1984. Tissue Culture Media. In: *Plant Propagation by Tissue Culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories*. Exegetics Limited, Chap. 6: 252-283.
- Hamon, P., S. Hamon & B. Touré, 1986. Les ignames cultivées du complexe *Dioscorea cayenensis-rotundata* de Côte d'Ivoire. Inventaire et description des 'cultivars' traditionnels. Faculté des Sciences et Techniques, Abidjan, R.C.I.-International Board for Plant Genetic Resources, Rome, Italy. AGPG: IBPGR/86/153.

- Hamon, P., 1987. Structure, origine génétique des ignames cultivées du complexe *Dioscorea cayenensis-rotundata* et domestication des ignames en Afrique de l'Ouest. Thèse Univ. Paris XI. Centre d'Orsay, 247 pp.
- Hanson, J., 1986. Methods of storing tropical root crop germplasm with special reference to yam. FAO/IBPGR Plant Genet. Resources News 64: 24-32.
- Haque, S.Q. & S.H. Mantell, 1980. Status of the virus diseases of yam (*Dioscorea* sp.) in the Common Wealth Caribbean. In: L'igname, séminaire international, Pointe-à-Pitre. L'INRA, Paris, pp. 101-105.
- Henshaw, G.G., 1982. Tissue culture methods and germplasm storage. In: A. Fujiwara (Ed.). Plant Tissue Culture. Maruzen, Tokyo, pp. 789-792.
- Hunault, G., 1979. Recherche sur le comportement des fragments d'organes et des tissus de Monocotylédones cultivées *in vitro*. III. Etude de cas de plusieurs Liliacées. Rev. Cytol. Biol. Veg. Bot. 2: 103-154.
- IBPGR, 1985. *In vitro* advisory committee. Report of subcommittee on design, planting and operation of *in vitro* Genebanks. International Board for Plant Genetic Resources, Rome.
- IITA, 1981. Annual report for 1980. IITA, Ibadan, Nigeria.
- Jean, M. & M. Cappadocia, 1991. *In vitro* tuberization in *Dioscorea alata* L. 'Brazo fuerte' and 'Florido' and *D. abyssinica* Hoch. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 26: 147-152.
- Kermarrec, A., L. Degras & A. Anais, 1980. Le nématode de l'igname *Scutellonema bradys* dans la caraïbe: distribution et quarantaine internationale. In: L'igname, séminaire international, Pointe-à-Pitre, les colloques de l'Inra, Paris, pp. 75-84.
- Knuth, R., 1924. *Dioscoreaceae*. A. Engler. Das Pflanzenreich, IV-43, 87. Heft, 1-397.
- Lacointe, A. & U. Zinsou, 1987. Croissance et développement au champ de l'igname (*Dioscorea alata* L.) à partir de plants produits par culture *in vitro*. Agronomie 7: 331-338.
- Malauric, B. & F. Tardieu, 1988. Improving yam (*Dioscorea* spp.), using Biotechnology. 3) Comparative study of growth and *in vitro* tuberization from different cultivars belonging to an important *in vitro* germplasm. VIII<sup>e</sup> Intern. Soc. Trop. Root Crops Symp., Bangkok, Thailand, Abstracts book, pp. 51.
- Mantell, S.H. & S.A. Hugo, 1989. Effect of photoperiod, mineral medium strength, inorganic ammonium, sucrose and cytokinin on root, shoot and microtuber development in shoot cultures of *Dioscorea alata* L. and *D. bulbifera* L. yams. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 16: 23-37.
- Mantell, S.H., S.Q. Haque & A.P. Whitehall, 1978. Clonal multiplication of *Dioscorea alata* L. and *Dioscorea rotundata* Poir. yams by tissue culture. J. Hort. Sci. 53 (2): 95-98.
- Martin, F.W. & L. Degras, 1978. Tropical yams and their potential. Part 6. Minor cultivated *Dioscorea* species. USDA agricultural handbook n° 538. 23 pp.
- Miège, J., 1952. Contribution à l'étude systématique des *Dioscorea* Ouest africains. Thèse, Paris, 266 pp.
- Miège, J., 1968. *Dioscoreaceae*. In: Flora of West Tropical Africa, Hutchinson, Dalziel, Hepper. Crown Agent London, 3, Part I, 191, pp. 144-154.
- Murashige, T. & F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Ng, S.Y. & S.K. Hahn, 1985. Application of tissue culture to tuber crops at IITA. In: Biotechnology in international research, IRR-I, Manila, pp. 29-38.
- Ng, S.Y.C. & N.Q. Ng, 1990. Reduced growth storage of germplasm. In: J.H. Dodds, Tissue culture for conservation of plant genetic resources. Croom Helm Ltd., Kent, UK.
- Ng, S.Y.C., 1988. *In vitro* conservation and distribution of root and tuber crop germplasm. In: N.Q. Ng, P. Perrino, F. Atter & H. Zedan (Eds.), Crop Genetic Resources of Africa, Vol. II, (2.3), pp. 95-106.
- Notteghem, J.L., 1985. Résultats d'essais de lutte contre le flétrissement de l'igname 1982-1984. Rapport analytique de synthèse. Centre Vivrier, Institut des Savanes, Bouaké, Côte d'Ivoire, 40 pp.
- Onwueme, I.C., 1982. A strategy package for reducing the high labour requirements in yam production. In: J. Miège & S.N. Longa (Eds.), Yams, ignames. Clarendon Press, Oxford, pp. 335-344.
- Rankine, L.B. & T.U. Ferguson, 1974. Yam production in Jamaica. In: L. Degras (1986), L'igname, Technique Agricoles et Productions Tropicales, Edit. G.P. Maisonneuve et Larose & Agence de Coopération Culturelle et Technique.
- Ryan, T.A., 1960. Significance tests for multiple comparison of proportions, variances and other statistics. Psychological bulletin, 57: 318-328.
- Salcil, V., L. Degras & R. Jonard, 1990. Obtention de plantes indemnes du virus de la mosaïque de l'igname (YMV) par culture *in vitro* des apex chez l'igname américaine *Dioscorea trifida* L. Agronomie 10: 605-615.
- Sauphanor, B. & A. Ratnadass, 1985. Aspects entomologiques liés à la conservation des ignames. L'Agronomie tropicale 40 (3): 261-270.
- Thouvenel, J.C. & C. Fauquet, 1982. Les viroses de l'igname en Côte d'Ivoire. In: J. Miège & S. Lyonga (Eds.), Yams-Ignames. Clarendon Press, Oxford, pp. 245-252.
- Toribio, A., S. Edwige & G. Jacqua, 1980. Pathologie des ignames en Guadeloupe. In: L'igname aujourd'hui et demain, CRAAG, INRA, pp. 40-45.
- Trousnot, M.F., 1985. Analyse de la croissance et morphogénèse de l'igname *Dioscorea* complexe *D. cayenensis-D. rotundata*. Editions de l'Orstom, Collection Travaux et Documents n° 185, 370 pp.
- Uduebo, E.E., 1971. Effect of external supply of growth substances on axillary proliferation and development in *Dioscorea bulbifera*. Ann. Bot. 35: 159-163.

## Corrigendum

# The creation of an *in vitro* germplasm collection of yam (*Dioscorea* spp.) for genetic resources preservation

B. Malaurie<sup>1</sup>, O. Pungu<sup>2</sup>, R. Dumont<sup>3</sup> and M-F. Trouslot<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire des Ressources Génétiques et d'Amélioration des Plantes Tropicales – Centre ORSTOM – BP.5045–F.34032 – Montpellier Cedex 1, France; <sup>2</sup>Laboratoire de Biotechnologie IIRSDA, BP V 51, Abidjan 01, Côte-d'Ivoire; <sup>3</sup>Centre Vivrier, Réseau 'plantes à tubercules' IDESSA/IRAT, BP 635, Bouaké 01, Côte-d'Ivoire; <sup>4</sup>Laboratoire de Biotechnologie – Centre ORSTOM – BP.5045–F.34032 – Montpellier Cedex 1, France

Euphytica 65: 113–122, 1993.

©1993 Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.

Owing to an error in the proof-reading process Table 6 of this article has been omitted. The Table is presented below.

TABLE 6  
Listing of the different groups inside the west-African *D. cayenensis*-*D. rotundata* complex observed in the yam *in vitro* germplasm collection.

Groups <sup>1</sup>	Introductions
Afoubessou	0
Baniakpa	2
Cocoassié	2
Frou	3
Gnan	1
Kangba	8
Kpokpokpo	6
Kponan	2
Krandoufou	0
Krenglé	13
Kroukroupa	1
Lokpa	4
Nandokaha	1
Sammancou	0
Sopéré	1
Soussou	1
Vivan	1
Waraga	1
Yaobadou	2
Zrézrou	1
Not presently identified	67
Total	117

<sup>1</sup> the present different groups have been described in Hamon *et al.*, (1986).

## Articles soumis à publication

**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 (*Disocorea* spp).

**Summary :** Eight clones belonging to 5 species of *Dioscorea* spp., coming from an *in vitro* germplasm collection, in the form of cuttings (Maurie et al., 1993), were used for meristem and shoot tips assays. Five of these clones, after an usual phytosanitary control by ELISA technique, before the meristem and shoot tips excision, were considered infected by the Yam Mosaic Virus (YMV). In order to determine the optimal growth media, several culture media were studied : rands phytohormonal balances and combinations of growth regulators NAA (0.5 to 1.5 mg.l<sup>-1</sup>) and BA (0.1 to 0.3 mg.l<sup>-1</sup>). The basal medium was a Knop modified medium (Maurie et al., 1993), with, as culture support, 0.8 % agar and/or 0.4 % agarose. Four excised meristem and shoot tips size were used : from 0.3 mm to 5 mm. For the excision meristem localisation, 4 levels were considered : from the apex to the base of the microplants. The meristems were cultured into two vessel conditions : Petri dishes and test tubes. Medium effect, vessel conditioning system, meristem localisation and clones effects were observed under the meristem viability and their good development into microplants. Regeneration into microplants from excised meristems and shoot tips have been realised on the eight studied clones.

**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.

**Summary :** Two clones, from the *D. cayenensis-D. rotundata* complex and *D. praehensilis* species, coming from an *in vitro* germplasm collection (Maurie et al., 1993a), were used for meristem-tips assays. These two clones, after phytosanitary control by ELISA technique , before meristem-tips excision (Thouvenel & Maurie, unpublished results), were considered infected by the Yam Mosaic Virus (YMV). Rands phytohormonal balances and combinations of growth regulators NAA (0.5 to 1.5 mg.l<sup>-1</sup>), BAP (0.1 to 0.3 mg.l<sup>-1</sup>) and GA3 (0 to 0.1 µM.l<sup>-1</sup>) were used. The basal medium was a Knop's modified medium (Maurie et al., 1993a), with, as culture support, 0.8 % agar and/or 0.4 % agarose. Meristem-tips of 0.5 to 1 mm were used. Test tubes (24 mm diameter; 15 cm high), filled with 25 ml of a double agar/agarose bed, were used for the meristem-tips culture. The impact of growth regulators on the meristem-tips viability and on their morphological development were studied up to 3, 8 and 11 months. Differences were observed between clones on their responses to NAA/BAP and GA3 treatments. Regeneration into microplants from excised meristems tips have been realised on the two studied clones.

## Articles 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.

Summary : Two clones, from the *D. cayenensis-D. rotundata* complex and *D. praehensilis* species, coming from an *in vitro* germplasm collection, under nodal cuttings (Maurie et al., 1993a), were used for meristem-tips assays. These two clones, after phytosanitary control by ELISA technique, before meristem-tips excision (Thouvenel & Malaurie, unpublished results), were considered infected by the Yam Mosaic Virus (YMV). The basal medium was a Knop modified medium (Maurie et al., 1993a) with the addition of the two growth regulators NAA (1 mg.l<sup>-1</sup>), BAP (0.2 mg.l<sup>-1</sup>), and with, as culture support, 0.8 % agar and/or 0.4 % agarose. Two excised meristem-tips size (0.3 mm < t ≤ 0.5 mm; 0.5 mm < t < 1 mm) and two excised meristem-tips (0.3 mm < t ≤ 0.5 mm) excision level, from apical or lateral buds, were used. Test tubes (24 mm diameter; 15 cm high), filled with 25 ml of a double agar/agarose bed, were used for the meristem-tips culture. The impact of level and size excision on the meristems viability and on their morphological development were studied up to 3, 8 and 11 months. Regeneration into microplants from excised meristems tips have been realised on the two studied clones.

## Articles en préparation

**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*.

**Résumé :** Des microboutures nodales de *D. praehensilis* (EA08), virosées par la présence du virus de la mosaïque de l'igname, ont été utilisées dans un essai de sanitation par chimio et/ou thermothérapie. Deux lots de microboutures ont été considérées : 1) des microboutures virosées, mais issues de culture de méristèmes; 2) des microboutures virosées maintenues normalement par subcultures. Les microboutures issus de ces deux lots, cultivées sur le milieu de culture modifié de Knop (Maurie et al., 1993), avec 0.8 % d'agar, ont été confrontées à une combinaison de deux traitements thermiques (27 ° C et 37 ° C) et chimiothérapique à l'aide d'un agent antiviral, Ribavirin ou Virazole, nucléoside (1-β-D-Ribofuranosyl-1,2,4,-triazole-3-carboxamide), pendant 63 jours. Trois concentrations en Ribavirin ont été utilisées (10, 20 et 50 mg. l<sup>-1</sup>). La lecture des résultats a été réalisée 120 jours après le début de l'essai.

**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.

**Résumé :** Deux clones appartenant au complexe *D. cayenensis-D. rotundata* et à l'espèce *D. praehensilis* ont été utilisés dans un essai de sanitation par culture de méristèmes. Les méristèmes ont été maintenus pendant 25 jours à 27 °C, afin de leur assurer une meilleure reprise avant de leur faire subir le traitement de thermothérapie. Les méristèmes excisés ont été confrontés à une combinaison de deux traitements thermiques (27 ° C et 37 ° C) et chimiothérapique à l'aide d'un agent antiviral, Ribavirin ou Virazole (1-β-D-Ribofuranosyl-1,2,4,-triazole-3-carboxamide). Les méristèmes isolés, de 0.3 à 0.4 mm, ont été déposés sur le milieu de culture modifié de Knop (Maurie et al., 1993) additionné de régulateur de croissance NAA (1 mg.l<sup>-1</sup>) et BAP (0.2 mg.l<sup>-1</sup>), contenant ou non 20 mg/l de Ribavirin, avec 0.4 % d'Agarose. Le traitement thermothérapie s'est maintenu pendant une période de 63 jours. A la fin de ce traitement les cultures ont été replacées à 27 °C. La lecture des résultats a été réalisée 90 jours et le contrôle de la présence du YMV, 120 jours après le début de l'essai.