

Conservation et échange de germoplasme chez les ignames (*Dioscorea* spp.)

B. MALAURIE, M.-F. TROUSLOT, J. BERTHAUD
GeneTrop, Orstom, BP 5045, 34032, Montpellier Cedex 1, France

Résumé — Les ignames cultivées sont naturellement tributaires d'une conservation à court terme. Leur mode de propagation par multiplication végétative favorise l'accumulation des virus et la dispersion de pathogènes. Les risques d'érosion génétique sont importants et nécessitent de trouver des modes de conservation efficaces. Dans le cadre de la conservation des ressources génétiques des ignames, plusieurs aspects peuvent être envisagés. La conservation aux champs est la méthode la plus courante. Elle permet une application la plus large à toutes les espèces, mais est pénalisée par son coût d'entretien élevé et les risques d'érosion génétique d'ordre climatique ou d'ordre pathologique. La conservation sous la forme de banques de graines est envisagée, les graines d'igname étant considérées comme non récalcitrantes. Les techniques de culture *in vitro*, croissance ralentie et cryoconservation, permettent d'éviter les contraintes de la conservation aux champs. L'utilisation d'un procédé simple de cryo-conservation (encapsulation-déshydratation), appliqué actuellement à un nombre réduit de génotypes d'igname, a permis d'obtenir de bons résultats. Il faut attendre son application à un nombre plus important de génotypes, plus représentatifs de la diversité, pour assurer une utilisation en routine. Les échanges de germoplasme ne pourront se faire qu'à partir de matériel végétal sain. Pour cela, il est nécessaire de détecter la présence de pathogènes, et de les éradiquer. Les problèmes majeurs proviennent de la présence de plusieurs virus dont la caractérisation a largement progressé ces dernières années. Une sanitation des plantes infectées est maintenant envisageable.

Abstract — **Conservation and distribution of yam (*Dioscorea* spp.) germplasm.** Cultivated yams have a short storage life, their vegetative propagation allows viruses to accumulate and pathogens to spread. Risks of genetic erosion are high and efficient conservation methods must be found. Several aspects must be examined in the field of genetic resource protection.

Field conservation is the most popular method. It can cover all species, but is handicapped by the strong constraints of costs and risks of erosion stemming from climatic conditions or pathologies. Seed banks are currently under study, yam seeds being orthodox. *In vitro* culture techniques, slowed growth and cryoconservation, are not submitted to the same constraints as field conservation. Interesting results have been obtained by using a simple process of cryo-conservation (encapsulation/dehydration), now applied to several genotypes. Once it becomes available for use with a large number of genotypes, it will be applied routinely. Germplasm exchanges will only be possible if the plant material is healthy, i.e. devoid of pathogens. Major problems are caused by the presence of viruses, which have been widely characterized over the past few years. Sanitation of infested plants can now be undertaken.

Introduction

Les ignames appartiennent au genre *Dioscorea* qui comprend plus de 600 espèces (COURSEY, 1967) réparties dans les régions tempérées et pour la plupart d'entre elles dans la zone intertropicale humide.

Les ignames, réparties en ignames alimentaires et ignames médicinales, revêtent un intérêt économique considérable pour l'homme.

Les tubercules des ignames alimentaires sont la nourriture par excellence de millions de personnes vivant dans la zone intertropicale, où ils représentent 12 % de leur alimentation de base (COURSEY et

MARTIN, 1972), et pourvoient à un apport protéique 2 à 3 fois supérieur à celui du manioc ou de la patate douce (BOURRET-CORTADELLAS, 1973). L'Afrique de l'Ouest procure plus de 90 % de la production mondiale en ignames, où le Nigeria détient les 3/4 de cette production (AKORODA, 1993). L'igname, en plus de ses fonctions alimentaires, possède des valeurs socio-culturelles importantes, en Afrique de l'Ouest et en Mélanésie où l'on parle de zones de « civilisation de l'igname » (MIEGE, 1954 ; HAUDRICOURT, 1964, cité par BOURRET-CORTADELLAS, 1973).

On estime que 40 à 50 espèces sont cultivées ou font l'objet de cueillette (MARTIN et DEGRAS, 1978). En Afrique occidentale et centrale, les cinq espèces et/ou complexes d'espèces cultivées sont : *D. alata* L., complexe *D. cayenensis* Lamk.-*D. rotundata* Poir., *D. esculenta* (Lour.) Burk., *D. dumetorum* (Kunth) Pax., *D. bulbifera* L. (tableau I). Les très nombreux cultivars de *D. alata* et de *D. cayenensis*-*D. rotundata* dominent la culture. Quelques *Dioscorea* sauvages sont occasionnellement consommées (MIEGE, 1952 ; ONWUEME, 1978 ; HLADIK *et al.*, 1984 ; DEGRAS, 1986).

Une cinquantaine d'espèces sauvages d'ignames ont un intérêt pharmaceutique ; elles ont été explorées et exploitées en tant que source de sapogénines naturelles et notamment de diosgénine (tableau II). Les principales espèces à forte teneur en sapogénine sont américaines avec *D. composita* Hemsl., *D. spiculiflora* Hemsl., *D. floribunda* Mart. et Gal., *D. mexicana* Guillem., *D. friedrichsthali* Knuth et *D. villosa* L., ou asiatiques avec *D. prazerei* Prain et Burk., *D. deltoidea* Wall., *D. hispida* Dennst., *D. nipponica* Makino, *D. tokoro* Makino et *D. zingiberensis*, ou encore africaines avec *D. sylvatica* (revues dans WAITT, 1963 ; COURSEY, 1967 ; DEGRAS, 1986 ; FURMANOWA et GUZEWSKA, 1989).

Prospection et collecte

Une partie de ces espèces citées plus haut a déjà été collectée (HLADIK *et al.*, 1984 ; ZOUNDJI-HEKPON et TIO-TOURE, 1992 ; PEDRALLI, 1994 ; HAMON *et al.*, 1995, MIGNOUNA *et al.*, 1997). Ces espèces sont entretenues et utilisées dans

Tableau I. Principales espèces d'ignames comestibles.

Espèces ⁽¹⁾	Zone d'origine	Zone de culture
Section <i>Enantiophyllum</i>		
<i>D. alata</i> L.	Asie du Sud-Est	intertropicale humide
complexe ⁽²⁾ <i>D. cayenensis</i> Lamk.		
<i>D. rotundata</i> Poir.	Afrique de l'Ouest	Afrique de l'Ouest et Caraïbes
<i>D. nummularia</i> Lamk.	Indonésie, Océanie	Indonésie, Océanie et Micronésie
complexe ⁽³⁾ <i>D. opposita</i> Thunb.	zones tempérées de : Chine, Corée,	zones tempérées de : Chine, Corée,
<i>D. japonica</i> Thunb.	Taïwan, Japon	Taïwan, Japon
<i>D. transversa</i> Br.	Pacifique Sud	Pacifique Sud
Section <i>Lasiophyton</i>		
<i>D. dumetorum</i> (Kunth) Pax.	Afrique de l'Ouest	Afrique de l'Ouest
<i>D. hispida</i> Dennst.	Inde, Chine du Sud, Nouvelle-Guinée	Inde, Chine du Sud, Nouvelle-Guinée
<i>D. pentaphylla</i> L.	Himalaya et Océanie	Himalaya et Océanie
Section <i>Combilium</i>		
<i>D. esculenta</i> (Lour.) Burk.	Asie du Sud-Est	zone inter-tropicale humide
Section <i>Opsophyton</i>		
<i>D. bulbifera</i> L.	Asie du Sud-Est et Afrique	intertropicale humide
Section <i>Macrogynodium</i>		
<i>D. trifida</i> L.	Guyane, bassin amazonien	Caraïbes

Sources : COURSEY, 1967 ; BOURRET-CORTADELLAS, 1973 ; ONWUEME, 1978 ; AMMIRATO, 1984 ; DEGRAS, 1986 ; MALAURIE et TROUSLOT, 1995.

(1). Les espèces ont été regroupées en section par KNUTH (1924), complété par BURKILL (1960).

(2). Le regroupement des espèces *D. cayenensis* et *D. rotundata* en un complexe a été proposé par AYENSU et COURSEY (1972) ; MARTIN et RHODES (1978), MIEGE (1982).

(3). Le regroupement des espèces *D. opposita* et *D. japonica* en un complexe a été proposé par TANAKA (1977).

Tableau II. Principales ignames médicinales présentant de la diosgénine.

Espèces	Production de diosgénine à partir de plantes <i>in vivo</i>	Production <i>in vitro</i> de diosgénine à partir		Habitat
		de culture de cals	suspension cellulaire	
<i>D. balcanica</i> Kosanin		+		ex-Yougoslavie
<i>D. belizensis</i>	tubercules			Honduras
<i>D. bulbifera</i> L.	tubercules			Asie tropicale
<i>D. burkilliana</i> J. Miège	tubercules			Afrique tropicale
<i>D. caucasica</i> Lipsky		+		Caucase
<i>D. composita</i> Hemsl.	tubercules	+	+	Mexique
<i>D. deltoidea</i> Wall.	tubercules, plante entière	+	+	Himalaya de l'Ouest, Inde
<i>D. floribunda</i> Mart. et Gal.	tubercules	+	+	Mexique
<i>D. hirtiflora</i> Benth.	tubercules			Afrique tropicale
<i>D. hispida</i> Dennst.				Philippines
<i>D. japonica</i> Thunb.		+		Japon
<i>D. lobata</i>	tubercules			Mexique
<i>D. mexicana</i> Guillem.	tubercules			Mexique
<i>D. minutiflora</i> Engl.	tubercules			Afrique tropicale
<i>D. multiflora</i>				Argentine
<i>D. nipponica</i> Makino		+		Japon
<i>D. polystachia</i> L.		+		
<i>D. praeheensis</i> Benth.	tubercules			Afrique tropicale
<i>D. prazeri</i> Prain & Burk.				Inde, Birmanie
<i>D. preussii</i> Pax.	tubercules			Afrique tropicale
<i>D. sansibarensis</i> Pax.	tubercules	+		Afrique tropicale
<i>D. spiculiflora</i> Hemsl.	tubercules	+		Mexique
<i>D. sylvatica</i>	tubercules			Afrique du Sud
<i>D. tepinapensis</i>	tubercules			Mexique
<i>D. testudinaria</i>	tubercules			Mexique
<i>D. togoensis</i> Knuth	tubercules			Afrique tropicale
<i>D. tokoro</i> Makino	tubercules	+		Japon
<i>D. villosa</i> L.		+	+	
<i>D. zingiberensis</i>	rhizomes	+		Chine

Source : FURMANOWA et GUZEWSKA, 1989.

des programmes d'amélioration des plantes. Cependant de nombreux cultivars et espèces restent à collecter. Les différents pays possédant et entretenant des collections d'ignames au champ, ou *in vitro*, sont présentés dans le tableau IIIa (IBPGR, 1986 ; FAO, 1996), le tableau IIIb présente les six pays possédant les plus importantes collections *ex situ* d'igname, en pourcentage par rapport au nombre total d'accessions d'igname dans le monde (FAO, 1996). Une représentation des espèces et du nombre d'accessions total par pays, au champ et *in vitro* quand cela se présente, est donnée par les figures 1, 2, 3, et 4 respectivement pour les zones africaine, Inde-Asie-Pacifique, Amérique, et Europe (HANSON, 1986 ; IBPGR, 1986 ; MALAURIE *et al.*, 1993 ; FRISON et SERWINSKI, 1995 ; anon., 1996).

Conservation des ressources génétiques des plantes

Conservation en collection au champ

La création de collections au champ reste toujours un bon moyen de conservation de la plante dans son milieu naturel, et permet de préserver sa diversité génétique. C'est la méthode traditionnelle, elle repose sur sa large application à toutes les espèces. Cette méthode comporte cependant des inconvénients, qui sont accrus pour les plantes à multiplication végétative, comme l'est l'igname : les plantes sont à la merci des ravageurs et des maladies, soumises à des contraintes climatiques et relèvent d'un coût élevé d'entretien (HANSON, 1986 ; MALAURIE *et al.*, 1993).

Tableau III a. Pays⁽¹⁾ et zones géographiques où ont été répertoriées des collections d'igname.

Europe	Antilles	Amérique	Pacifique	Asie	Afrique
France ⁽²⁾	Barbades *	Brésil ⁽²⁾	Iles Cook	Bengladesh	Bénin
Royaume Uni ⁽²⁾	Cuba	Colombie	Fidji	Inde	Burkina Faso
	Guadeloupe ⁽²⁾	Costa Rica	New Islands	Indonésie	Cameroun
	Jamaïque	Guatemala	Nouvelle-Calédonie ⁽²⁾	Japon ⁽²⁾	Côte d'Ivoire ⁽²⁾
	Saint-Domingue	Mexique	Papouasie Nouvelle-Guinée	Malaisie	Ghana
	Trinidad et Tobago	Panama	Iles Salomon	Nepal	Nigeria ⁽²⁾
		Etats-Unis	Tonga	Philippines	Afrique du Sud
			Vanuatu	Sri Lanka	Togo
			Western Samoa ⁽²⁾	Thaïlande	Ouganda
				Viet Nam	
2	6	7	9	10	9

(Sources : IBPGR, 1986 ; FAO, 1996)

* maintenance *in vitro* dans un but de facilité de production.

(1). Cette liste de pays n'est pas exhaustive et tient compte des sources en notre possession.

(2). Pays possédant des collections *in vitro* (selon les sources en notre possession).

Tableau III b. Les six plus grands dépositaires possédant des collections *ex situ* du genre *Dioscorea* (pays, Cgiar, collections régionales).

Pays, Cgiar, collections régionales	Pourcentage du total d'accessions
Iita	25 (20) ⁽¹⁾
Côte d'Ivoire	20
Inde	8
Philippines	6
Sri Lanka	4
Iles Salomon	4
Nombre total d'accessions au niveau mondial	11 500

⁽¹⁾ Correspond au pourcentage d'accessions dupliquées entre les différents centres du Cgiar.

Source : WIEWS database et SGRP Review of Genebank Operations, 1996 *In* FAO, 1996.

Un autre type de conservation (conservation *in situ*) pourrait être développé : 1) dans des conditions de culture paysanne ; 2) dans des zones protégées (type parc national) (ZOUNDJIHEKPON, 1997).

Stockage des graines « orthodoxes »

Pour la constitution de collections de graines, il faut distinguer, pour les ignames, les formes cultivées des formes spontanées.

Pour les formes cultivées, bien que la présence de graines ait été signalée chez les principales espèces (*D. alata*, *D. bulbifera*, complexe *D. cayenensis-D. rotundata*, *D. dumetorum*, *D. opposita*, *D. trifida*), la constitution de collections de graines est fortement

limitée chez l'igname (HANSON, 1986) par la faible production, par la nécessité d'une pollinisation artificielle si l'on veut obtenir de bons taux (AKORODA, 1993) et par un faible taux de germination, bien que les graines soient de type orthodoxe (ou non récalcitrantes), après l'entreposage au froid (8 mois de stockage au froid combiné à une dessiccation) observé sur *D. rotundata* ; ce même phénomène d'abaissement du taux de germination a été observé après dessiccation en présence de silica gel à 25 °C (SADIK, 1977). Dans un manuel sur la technologie des semences pour la conservation des ressources génétiques, ELLIS *et al.* (1985) font un état de la dormance chez certaines espèces du genre *Dioscorea* de la zone intertropicale humide ou appartenant aux zones tempérées (*D. bulbifera*, *D. japonica*, *D. cayenensis*, *D. composita*, *D. deltoidea*, *D. floribunda*,

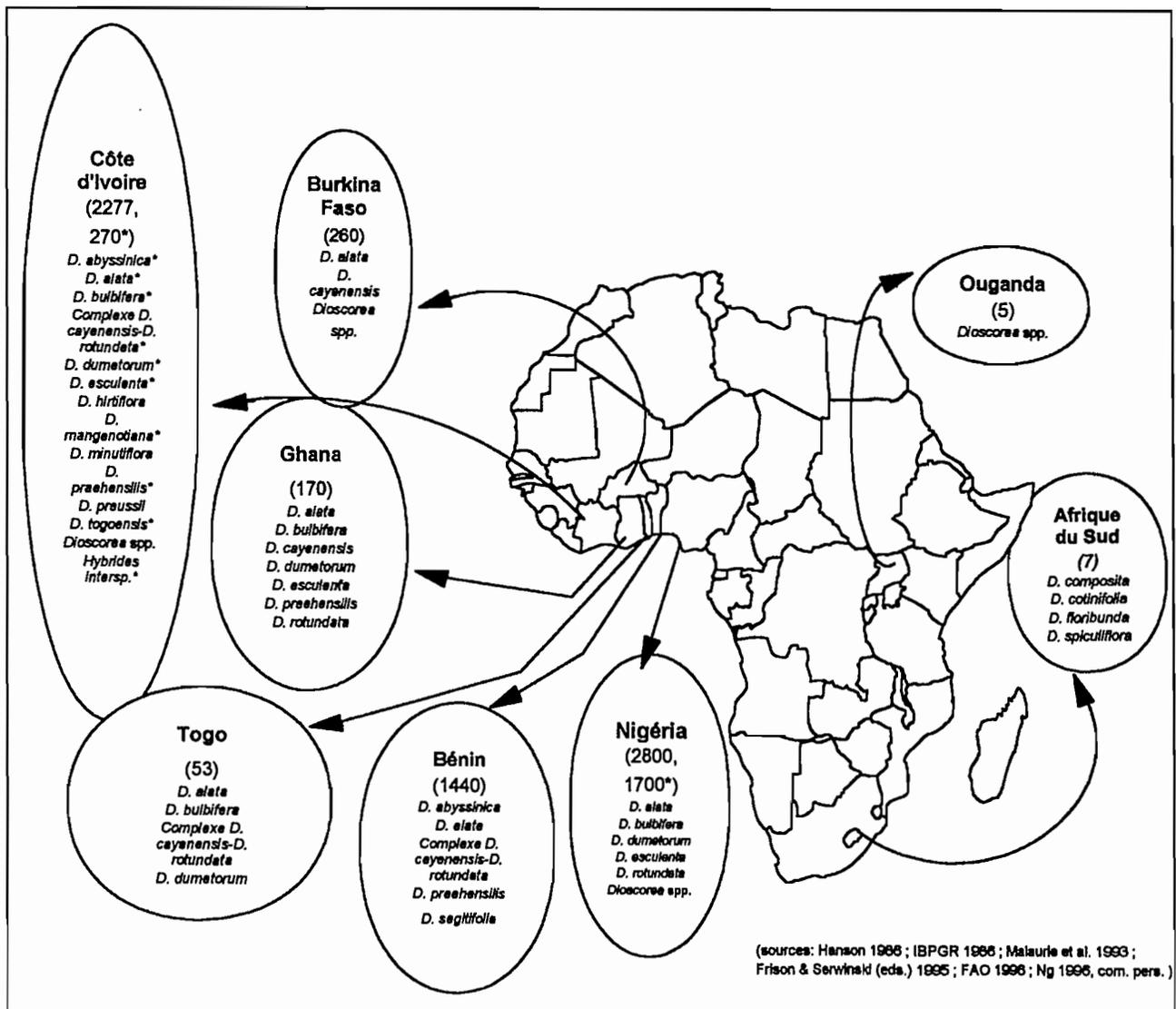


Figure 1. Pays d'Afrique concernés par les collections d'ignames (espèces représentées et nombre total d'accessions au champ et in vitro*).

D. hirtiflora, *D. japonica*, *D. nipponica*, *D. odoratissima*, *D. opposita*, *D. praeheasilis*, *D. prussii*, *D. quinqueloba*, *D. rotundata*, *D. septemloba*, *D. tenuipes*, *D. tokoro*, *D. villosa*). Ils signalent les traitements ayant été utilisés pour leur levée de dormance. La durée de la dormance varie selon l'espèce et selon la zone d'origine de l'espèce. Pour les espèces ouest-africaines, la dormance peut durer entre 3 et 5 mois après leur maturation, et au moins 6 mois pour les ignames japonaises. Les traitements agissant sur la levée de dormance des graines sont essentiellement des traitements thermiques de durée variable (0 à 5 °C, puis températures supérieures, associées ou non à des séjours à l'obscurité, pour les ignames de climat tempéré ; 25 à 45 °C, associé ou non à un éclairage, pour les ignames de climat tropical).

Pour les formes spontanées, la constitution de collections de graines peut être une bonne méthode de conservation si on en connaît la durée de conservation et si on maîtrise les problèmes de dormance. Peu

d'informations sont encore disponibles sur la conservation des graines des différentes espèces de *Dioscorea*. Cependant, le fait que les graines soient de type orthodoxe pouvant supporter la dessiccation, pourrait faire espérer qu'elles survivent dans des banques de semences à des basses températures pour de longues périodes (HANSON, 1986). STANWOOD et BASS (1981), dans leur article sur la « conservation des ressources génétiques sous la forme de semences à l'aide de l'azote liquide » montrent qu'il est déjà possible d'appliquer ces techniques avec succès sur 120 espèces et d'entrevoir des applications à l'igname. Cependant, le transfert de technologie des techniques de cryoconservation peut, pour certains partenaires du Sud, présenter certaines difficultés. Celles-ci peuvent être contournées par l'utilisation de technique de stockage des graines dans des conditions extrêmes de dessiccation (HONG et ELLIS, 1996).

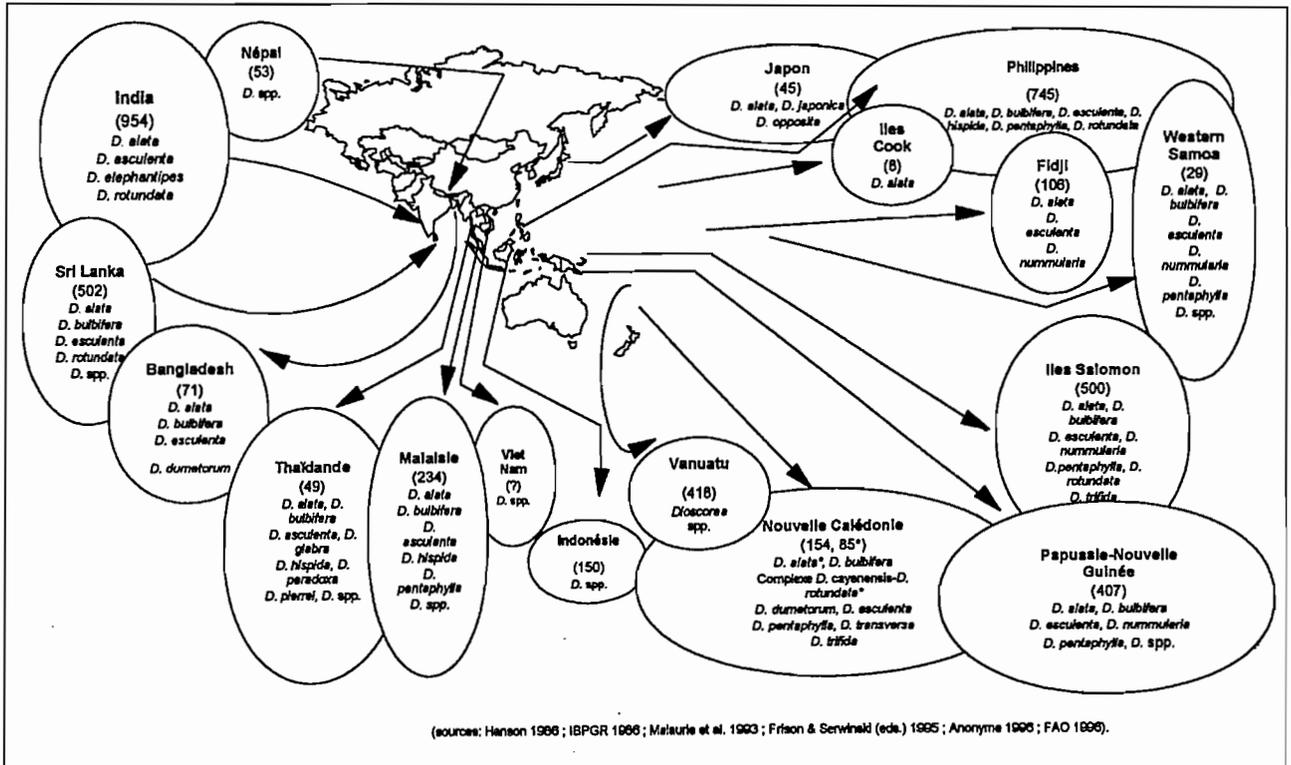


Figure 2. Pays des zones indiennes, asiatique et pacifique concernés par des collections d'ignames (espèces représentées et nombre total d'accèsions au champ et in vitro*).

Malgré l'obtention de graines de génotypes généralement hétérozygotes, avec le risque de ne pas représenter les génotypes originaux (HANSON, 1986), et la nécessité d'attendre 2 à 3 années pour passer de la graine à un tubercule capable d'exprimer tout son potentiel de croissance (ou de rendement) dans un environnement donné (TROUSLOT, 1985 ; TROUSLOT *et al.*, 1993), la « banque de graines » devrait être une méthode complémentaire à la conservation *in vitro* pour les stockages de longue durée. Si la conservation de graines doit permettre de maintenir une large variabilité pour des utilisations futures, la conservation *in vitro* à moyen terme (croissance ralentie) ou à long terme (cryo-conservation) devrait permettre de conserver des génotypes spécifiques en toute sécurité (HANSON, 1986).

Conservation *in vitro*

Le développement des techniques de culture *in vitro* et la capacité à régénérer des plantes ont fait de la conservation *in vitro* une alternative au maintien des collections au champ (NG, 1991).

La culture *in vitro* a été ces dernières années étendue à plus de 1 000 espèces, incluant plusieurs espèces tropicales. Du fait de ses multiples avantages (taux de multiplication élevés, condition aseptique —

indemne de champignons, bactéries, virus, après thermothérapie et indexation, et ravageurs — encombrement et coût d'entretien restreints, érosion génétique limitée dans les conditions optimales de culture), son utilisation est d'un grand intérêt pour la conservation des collections, leur stockage, entretien et multiplication (ENGELMANN, 1991, 1997 ; KUO, 1991 ; MALAURIE *et al.*, 1993 ; ASHMORE, 1997).

Conservation à court et moyen terme

L'application des techniques de culture *in vitro* à la conservation et à la distribution d'un germoplasme dépend de sa capacité à régénérer en plantules à partir de nœuds munis de bourgeons, cals ou suspension cellulaire.

MAINTIEN DANS DES CONDITIONS DE CROISSANCE STANDARD

Dans les conditions de culture standard (conditions ne faisant pas intervenir de facteurs propres à des conditions de croissance ralentie), les vitroplants peuvent être maintenus sans subculture pendant une durée plus courte que dans des conditions de culture ralentie. Cette conservation ne convient que pour un stockage temporaire des collections et en particulier pour des transferts et distribution de matériel (NG, 1991).

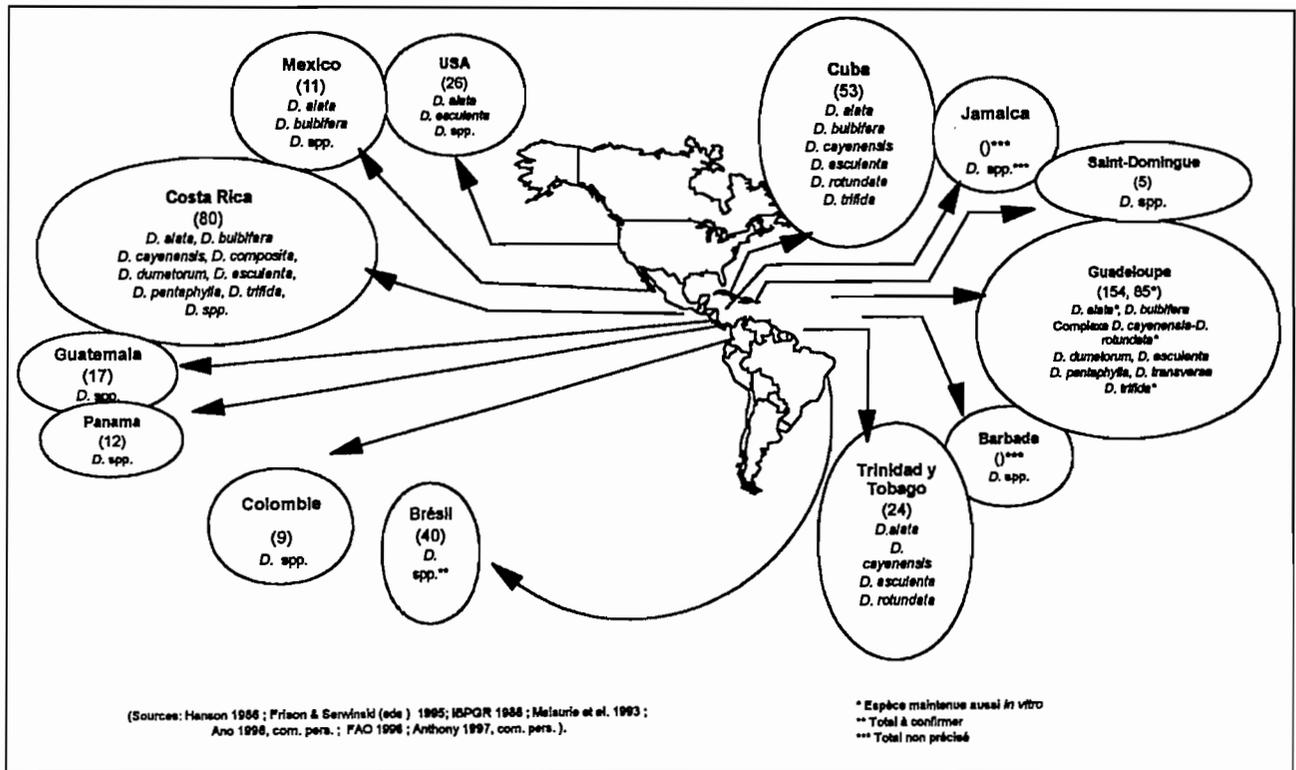


Figure 3. Pays du continent américain concernés par des collections d'ignames (espèces représentées et nombre total d'accèsions au champ et *in vitro**).

L'igname est maintenue dans des conditions de croissance standard à travers différentes méthodes :

- micropropagation (microboutures nodales, culture d'apex, culture d'embryons zygotiques, embryogénèse somatique, organogénèse) ;
- tubérisation *in vitro* ;
- culture de cals, suspensions cellulaires et protoplastes.

Le microbouturage nodal permet d'obtenir de forts taux de multiplication (OOSAWA *et al.*, 1981 ; MITCHELL *et al.*, 1995a,b) et de maintenir sur des milieux de culture dépourvus de phytohormones des génotypes conformes aux plants mères (AMMIRATO, 1984). CHANDLER et HAQUE (1984) retracent à travers une revue bibliographique tous les travaux abordant les aspects de la propagation *in vitro* de l'igname. Ce même aspect est abordé par FURMANOWA et GUZEWSKA (1989) pour les espèces productrices de diosgénine. La régénération de plantules enracinées à partir de cals issus d'embryons zygotiques matures a été décrite par VIANA et MANTELL (1989) sur *D. composita* et *D. cayenensis*. ARNOLIN *et al.* (1991), obtiennent des plantules de *D. alata* et *D. cayenensis*-*D. rotundata* par culture d'embryons *in vitro*. La culture d'apex est utilisée pour la micropropagation de *D. opposita* Thunb. (Niwata *et al.*, 1983, KOBAYASHI, 1991 ; ARAKI *et al.*, 1992). Pour *D. alata* cv. oriental, les premiers stades de l'embryogénèse somatique ont été observés dans des cultures de protoplastes et des cultures d'explants (TWYFORD et MANTELL, 1990). Plus récemment, TWYFORD et

MANTELL (1996) montrent qu'il est possible d'obtenir la formation de plantules par embryogénèse somatique à partir d'agrégats de cellules issus des régions subcorticales d'explants de racines du cv. oriental. Selon ces auteurs, la capacité de maîtrise du système de régénération, pour *D. alata*, permet trois types d'utilisation :

- la recherche des procédés d'embryogénèse somatique chez *Dioscorea* ;
- la production massive d'ignames indemnes de maladies par l'utilisation des semences artificielles ;
- la transformation génétique par introduction de gènes de résistance aux virus ou aux champignons selon les approches décrites par TOR *et al.* (1993), sur *D. alata*.

La régénération de plantules a été observée à partir de culture de cals de *D. alata* et *D. trifida* (FAUTRET *et al.*, 1988), ou à partir de suspension cellulaire de *D. opposita* (NAGASAWA et FINER, 1989). Récemment, ARAKI *et al.* (1992) décrivent une possibilité de propagation de *D. opposita* par production massive de cals, puis néoformations à partir de ces cals.

La tubérisation *in vitro* peut-être favorisée par différents facteurs en jouant sur le milieu de culture (présence de régulateurs de croissance, composition minérale, concentration en saccharose) et sur les conditions de culture (photopériode, thermopériode). Une liste non exhaustive de travaux en fonction des espèces et des sections est dressée :

- *D. abyssinica* (JEAN et CAPPADOCIA, 1991-1992 ; LAUZER *et al.*, 1992), *D. alata* (ESPIAND, 1983 ;

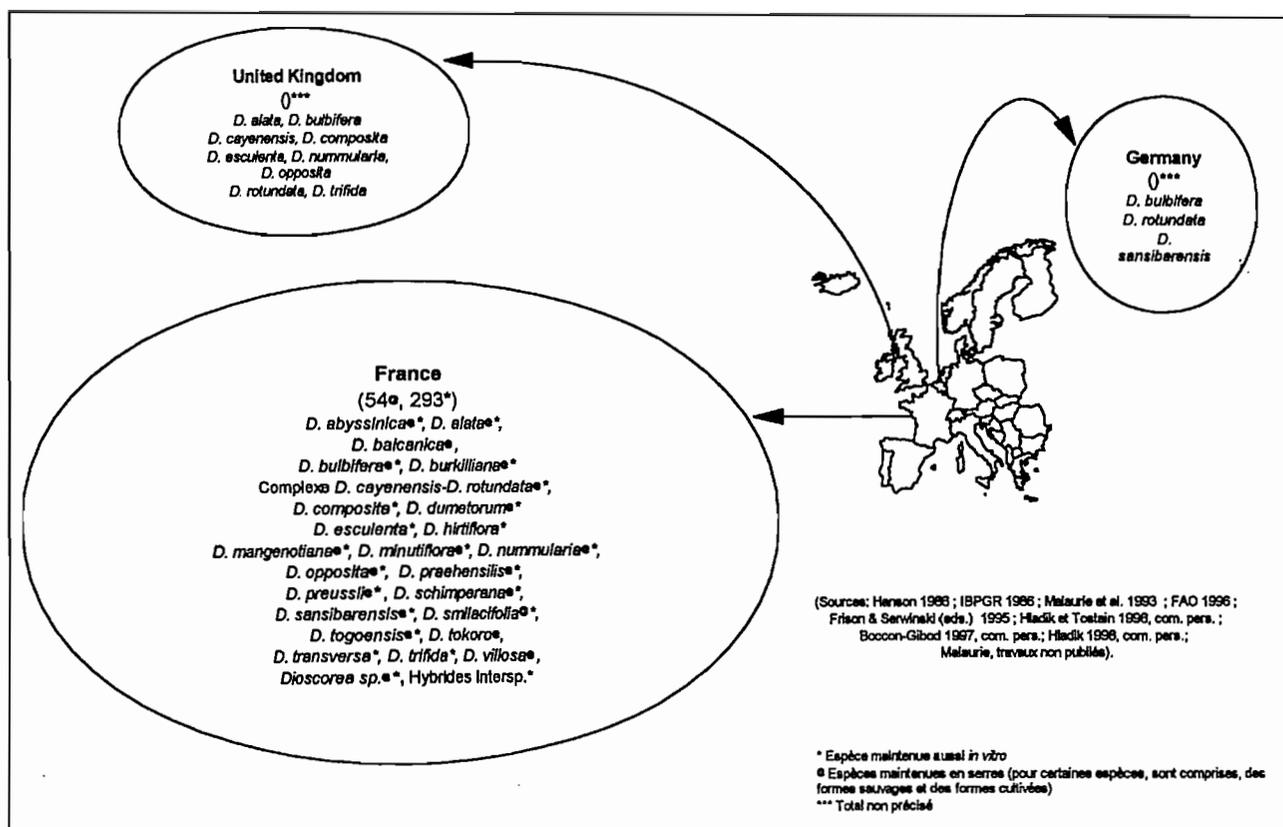


Figure 4. Pays d'Europe concernés par des collections d'igname (espèces représentées et nombre total d'accessions en serres et *in vitro**).

LACOINTE et ZINSOU, 1987ab ; DALOUMAN, 1989, 1994 ; DALOUMAN *et al.*, 1992, 1993 ; JOHN *et al.*, 1993, MALAURIE *et al.*, 1993), *D. rotundata* (MANTELL *et al.*, 1978 ; NG, 1988) ;

– *D. bulbifera* (FORSYTH et Van STADEN, 1982-1984 ; MANTELL et HUGO, 1989, MALAURIE *et al.*, 1993) ;

– *D. floribunda* (SENGUPTA *et al.*, 1984), *D. opposita* (YAZAWA et ASAHIRA, 1979) ;

– *Dioscorea* sp. (MALAURIE *et al.*, 1993).

La tubérisation *in vitro* chez *D. esculenta*, non signalée par MALAURIE *et al.* (1993), a été observée par la suite au Lrgapt (Laboratoire des ressources génétiques et d'amélioration des plantes tropicales). Les réponses au photo-thermopériodisme semblent varier avec les espèces et avec la richesse du milieu en saccharose ; de plus, elles se traduisent soit par une plus ou moins grande précocité et/ou fréquence de tubérisation, soit par un nombre et une masse de microtubercules plus ou moins élevés.

La maîtrise des différents volets de la culture *in vitro* de l'igname, et surtout les phénomènes de régénération, peuvent faciliter le développement d'un programme de transformation génétique. Cette dernière orientation de la recherche a déjà permis la réalisation d'un nombre réduit de travaux sur l'igname (XINHUA *et al.*, 1986 ; SCHAFFER *et al.*, 1987 ; TOR *et al.*, 1992-1993).

En conclusion, ces différentes méthodes de conservation dans des conditions de culture standard, décrites plus haut, présentent toutes leur spécificité, selon les organes ou tissus concernés. Les microboutures nodales sont utilisées, en routine, pour la conservation à court terme, la micropropagation et l'échange, alors que les apex ne le sont que pour la multiplication de certaines espèces d'igname. La culture d'embryons zygotiques, l'embryogenèse somatique peuvent être utilisés dans des programmes liés à la compréhension des phénomènes physiologiques et biochimiques liés à l'embryogenèse. Mais, l'embryogenèse somatique pourrait aussi être intégrée à la production en masse d'igname indemnes de maladies par la production de semences artificielles. La tubérisation *in vitro* peut être exploitée aussi bien dans des programmes de physiologie de la tubérisation que pour la conservation et à l'échange de matériel. Les cultures de cal, suspensions cellulaires et protoplastes correspondent plus à des études physiologiques, ou à la création de variabilité, ou de plantes transgéniques, et/ou de nouvelles variétés ou des souches performantes pour les igname médicinales.

MAINTIEN DANS DES CONDITIONS DE CROISSANCE RALENTIE

Dans une revue bibliographique RAO et RILEY (1994) rapportent que pour la conservation des ressources génétiques des plantes, les cultures doivent être

maintenues à une croissance minimum ; ceci afin d'éviter les repiquages fréquents, qui augmentent les coûts de la conservation *in vitro*. Il y a, selon CHARRIER *et al.* (1991), WITHERS (1991), ENGELMANN (1991), plusieurs façons d'obtenir une croissance ralentie :

- choix du stade physiologique de l'explant ;
- addition d'agents osmotiques et/ou de ralentisseurs de croissance ;
- réduction de la température de stockage (4-10 °C pour les espèces tempérées et 15-25 °C pour les espèces tropicales) ;
- abaissement des concentrations des éléments minéraux et/ou du saccharose ;
- abaissement de la pression d'oxygène ;
- encapsulation dans de l'alginate.

La conservation dans des conditions de croissance ralentie peut être obtenue par une réduction de la température de culture, une mise au point du milieu de culture, ou la combinaison des deux méthodes (NG, 1991). Une croissance préalable dans des conditions standards de culture, avant leur transfert dans des conditions de croissance ralentie, s'est révélée très importante pour la conservation des plantes à tubercules (NG et HAHN, 1985).

Dans le cas de l'igname, la constitution et la conservation de vitrothèque sous la forme de microboutures nodales sont abordées une première fois par l'Italia (IITA, 1981 ; NG et HAHN, 1985). Ces derniers utilisent les températures de 18-22 °C, ceci permet de ne repiquer, la collection *in vitro* d'igname, que tous les 1,5 à 2 ans, et de maintenir, selon NG (1992), 1 000 accessions d'ignames (NG parle, en 1996, de 1 700 accessions, pour 6 à 7 espèces, com. pers.). L'addition de ralentisseurs de croissance, tel que le mannitol à 0,2 M, a été utilisée sur des apex de tige de *D. rotundata* pour en limiter la croissance (HENSHAW, 1982). HANSON (1986), dans une note se rapportant aux méthodes de stockage des collections de plantes à tubercules et en particulier, l'igname, fait le point des collections *in vivo* et *in vitro* de l'igname dans le monde. Cet auteur dresse aussi les différents types de collection et les recommandations de l'Ipagri qui lui correspondent :

- effectuer un nombre minimum de répétitions par génotype (au champ : 5 à 10 plantes pour chaque génotype, *in vitro* : 5 répétitions par clone et 100 pour une population hétérogène) ;
- dupliquer les collections (en 3 lieux différents pour les collections en champ, en plusieurs sites, de préférence dans d'autres pays pour les collections *in vitro* ;
- étudier le comportement des graines de différentes espèces pour optimiser leur conservation ;
- développer des conditions de croissance ralentie permettant de ne repiquer les collections que tous les 2 ans ;

- orienter la conservation vers une conservation à long terme dans l'azote liquide ;
- combiner les différentes méthodes de conservation pour une meilleure sécurité.

Sur le plan africain, ACHEAMPONG (1988) et OKOLI (1991) dressent les avantages des collections *in vitro* ou *in vivo* d'ignames ou de plantes à tubercules, alors que PATHIRANA (1991), au Sri Lanka, observe les modes de conservation *in vivo-in vitro*, de *D. alata*. MALAURIE *et al.* (1993) sont les premiers à faire un état des problèmes rencontrés lors de l'établissement et du maintien d'une collection *in vitro* d'igname, dans des conditions de croissance ralentie, sous la forme de microboutures nodales, utilisant un milieu minéral pauvre et une faible concentration en sucre. La collection comprenait 14 espèces d'Afrique et d'Asie, incluant les variétés comestibles de la zone intertropicale humide. A partir de 1990, d'autres espèces ont été introduites *in vitro* au laboratoire des ressources génétiques et d'amélioration des plantes tropicales (Lrgapt) du centre Orstom de Montpellier (*D. pentaphylla* L., *D. preussi* Pax., *D. sansibarensis* Pax., *D. smilacifolia* De Wild., *D. transversa* Br., *D. trifida* L.) et par un nombre d'accessions d'origines différentes pour certaines espèces (TOSTAIN, com. pers.) (tableau IV). Cet apport nouveau a été réalisé par l'envoi de tubercules (Cirad-ca) ou de fragments de tiges prélevés sur la collection de Mme Hladik, maintenue en serre (Muséum national d'histoire naturelle, Brunoy). La conservation *in vitro* des principaux cultivars des Caraïbes, de la zone Pacifique et de l'Afrique de l'Ouest, pour les espèces *D. alata*, *D. bulbifera*, *D. cayenensis*, *D. esculenta*, *D. rotundata* et *D. trifida*, a été citée par MANTELL (1993). Ce dernier rapporte qu'il a pu conserver ce matériel sur une durée de 15 ans, cependant, cette conservation a été réalisée dans des conditions de culture standard. La décontamination du matériel introduit reste pour certains cultivars de *D. rotundata* un problème important nécessitant l'utilisation de fongicides et d'antibiotiques (NGALA, 1989).

Conservation à long terme : la cryoconservation

La conservation à long terme correspond à la cryoconservation, c'est-à-dire à la conservation dans de l'azote liquide à - 196 °C. La cryobiologie végétale, qui a débuté en 1971 avec les travaux de LATTA sur des suspensions cellulaires de carotte, a bénéficié des résultats réalisés dès 1949 (POLGE *et al.*), sur les cellules animales.

Le but de ces techniques est de pouvoir contrôler les flux d'eau et la formation des cristaux de glace, pour tendre vers un état vitreux, état permettant d'éviter la recristallisation pendant le réchauffement, et ainsi de permettre à la cellule de résister aux chocs thermiques.

Tableau IV. Espèces d'ignames introduites *in vitro* (Lrgapt, Orstom, Montpellier).

Espèces	Nombre d'accessions
<i>D. abyssinica</i> Hochst. Ex Kunth	6
<i>D. alata</i> L.	91
complexe ⁽¹⁾ <i>D. cayenensis</i> Lamk. <i>D. rotundata</i> Poir.	63
<i>D. burkilliana</i> J. Miège	11
<i>D. dumetorum</i> (Kunth) Pax.	2
<i>D. esculenta</i> (Lour.) Burk.	10
<i>D. hirtiflora</i> Benth.	1
<i>D. mangelotiana</i> J. Miège	15
<i>D. minutiflora</i> Engl.	2
complexe ⁽²⁾ <i>D. opposita</i> Thunb. <i>D. japonica</i> Thunb.	1
<i>D. praeheensis</i> Benth.	17
<i>D. preussii</i> Pax	1
<i>D. sansibarensis</i> Pax	1
<i>D. schimperana</i> Hochst. Ex Kunth	1
<i>D. smilacifolia</i> De Wild	2
<i>D. togoensis</i> Knuth	8
<i>D. transversa</i> Br.	1
<i>D. trifida</i> L.	2

(1). Le regroupement des espèces *D. cayenensis* et *D. rotundata* en un complexe a été proposé par AYENSU et COURSEY (1972) ; MARTIN et RHODES (1978) ; MIEGE (1982).

(2). Le regroupement des espèces *D. opposita* et *D. japonica* en un complexe a été proposé par TANAKA (1977).

L'apport de cryoprotecteurs vont provoquer cette sortie d'eau par osmose, sortie d'eau d'autant plus rapide que la concentration en cryoprotecteurs est forte. L'apport de sucres permet, en plus de cette osmose, la protection des membranes et des sites enzymatiques, qui lui sont liés, des lésions dues au froid.

TECHNIQUES CONVENTIONNELLES DE CRYOCONSERVATION, OU CONGÉLATION LENTE

Les techniques qui ont été développées dans les années 60 à 80 ont permis la congélation de nombreuses espèces végétales (SAKAI, 1984). Elles reposent sur la congélation progressive, en deux étapes (0 °C à -40 °C, puis -40 °C à -196 °C) et l'emploi de solutions contenant des agents cryoprotecteurs provoquant la déshydratation des cellules par cristallisation extracellulaire. Ces techniques nécessitent un ajustement empirique des conditions expérimentales en fonction de l'espèce, des types cellulaires à conserver, rendant difficile la congélation des apex ou des embryons constitués de différents tissus et sont plus adaptées aux suspensions cellulaires (tableau V).

TECHNIQUES NOUVELLES DE CRYOCONSERVATION

A la différence des techniques précédentes, qui font appel à une déshydratation par cristallisation extracellulaire, les nouvelles techniques vont permettre d'obtenir une déshydratation cellulaire préalable à la congélation. Elles sont caractérisées par un abaissement rapide à très rapide de 400 °C à 1 100 °C/min,

permettant de passer directement des conditions de température ambiante à la température de l'azote liquide, avec l'utilisation de cryoprotecteurs en concentration élevée dans le cas de la « vitrification » (URAGAMI *et al.*, 1989 ; LANGIS *et al.*, 1989 ; TANNOURY *et al.*, 1991), et, d'autre part, une dessiccation, sous flux d'air ou en présence de silica gel, d'extrémités apicales nues prétraitées en présence d'acide abscissique (URAGAMI, 1993) ou enrobées dans un gel d'alginate de calcium dans le cas « d'encapsulation/déshydratation » (DEREUDDRE *et al.*, 1990 ; FABRE et DEREUDDRE, 1990), et sur des semences artificielles (DEREUDDRE *et al.*, 1991). Elles sont plus adaptées pour la cryoconservation d'apex ou d'embryons constitués de différents tissus (tableau V).

Dans la revue bibliographique de MALAURIE et TROUSLOT (1995), la plupart des articles abordant les aspects de cryoconservation ont été réalisés sur des suspensions cellulaires d'ignames médicinales. *D. deltoïdea* reste de loin la plus utilisée (BUTENKO *et al.*, 1984 ; POPOV *et al.*, 1984 ; POPOV et FEDOROVSKII, 1992 ; POPOV et VOLKOVA, 1994). Plus récemment, CHULAFICH *et al.* (1994) font état de reprise de croissance, après immersion rapide dans l'azote liquide, des cals de *D. balcanica* Kosanin et de *D. caucasica* Lipsky. Ces auteurs présentent la cryoconservation comme un moyen de salut pour ces ignames endémiques.

Il faut attendre 1996 pour voir les premiers travaux de cryoconservation à partir d'ignames comestibles. Deux équipes différentes ont appliqué la technique d'encapsulation-déshydratation sur plusieurs espèces

Tableau V. Conservation à long terme dans l'azote liquide (-196 °C).

Etapas	Techniques conventionnelles		Nouvelles techniques	
		Dessiccation (flux d'air)	Vitrification	Encapsulation/déshydratation
Encapsulation				+
Prétraitement saccharose	+/-	+ (+ABA)		+
Cryoprotecteur	+		++++	
Dessiccation		+		+
Congélation lente	+ 0 °C à - 40 °C (0.3 à 1 °C/min)			
Congélation rapide	+ -40 °C à -196 °C (200 °C/min)	+25 °C à - 196 °C (720 °C/min)	+25 °C à - 196 °C (400 à 1 100 °C/min)	+25 °C à - 196 °C (720 °C/min)
Réchauffement	500 °C/min	120 °C/min	120 °C/min	120 °C/min

Source : URAGAMI, 1993.

d'ignames maintenues *in vitro*. MANDAL *et al.* (1996), comparent les capacités de survie d'apex de quatre espèces d'igname, dont deux cultivées (*D. alata*, *D. bulbifera*), une sauvage mais comestible (*D. wallichii* Hook. f.) et une médicinale (*D. floribunda*), soumises au stress de cette technique. Les quatre espèces présentent un taux de survie allant de 26 à 71 %, selon les espèces. Seules, *D. wallichii* et *D. alata* ont permis d'obtenir un développement en pousses feuillées, avec respectivement 37 et 21 %. D'autres auteurs MALAURIE et TROUSLOT, 1997 ; MALAURIE *et al.*, 1998a,b) obtiennent quant à eux des taux de survie supérieurs à 50 % pour les clones des deux espèces utilisées (*D. alata*, *D. bulbifera*). Le développement en pousses feuillées est observé dans les deux cas, avec des taux de reprise d'au moins 50 % pour *D. bulbifera* et 20 % pour *D. alata*.

En conclusion, en reprenant les recommandations de l'Ipgr, la conservation de germoplasme chez les ignames doit combiner les différentes méthodes de conservation pour une meilleure sécurité, sachant que :

- un autre type de conservation (conservation *in situ*) pourrait être développé ;
- les recherches sur le stockage des graines restent à approfondir ;
- les résultats obtenus sur la cryoconservation de deux génotypes restent à appliquer à un nombre de génotypes plus représentatif de la diversité pour permettre une application en routine au stockage de collections (tableau VI) ;
- la conservation *in vitro* sous la forme de banques actives devrait pouvoir être utilisée pour la distribution de matériel aux utilisateurs et/ou pour établir des collections aux champs (ENGELS, 1993).

Caractérisation et évaluation

La caractérisation et l'évaluation de collections se découpent en deux volets : une étude de la diversité et une stratégie de la conservation des échantillons. La caractérisation et l'évaluation reposaient par le passé, uniquement sur des caractères morphologiques, puis sur des caractères biochimiques, comme l'utilisation d'isozymes. Cependant, cette dernière présente le désavantage de ne pas convenir à des criblages à grande échelle.

DODDS et WATANABE (1990) reconnaissent 4 domaines où la biologie moléculaire peut permettre la caractérisation :

- identification des génotypes, duplicat d'accessions compris ;
- caractérisation des génotypes par *fingerprinting* ;
- analyse de la diversité génétique au sein d'une collection ;
- création d'une *core collection*.

Ces dernières années, de nombreuses méthodes ont été utilisées pour l'étude des variations de la séquence des nucléotides :

- *restriction fragment length polymorphism* (Rflp) ;
- *Random amplified polymorphic Dna* (Rapd) ;
- *Variable number of tandem repeats* (Vntrs) ;
- *Polymerase Chain Reaction* (Pcr / sequencing) ;
- *Allele-specific polymerase chain reaction* (Aspcr) ;
- *Denaturing/temperature gradient electrophoresis* (Dgge /Tgge).

Sur l'igname, les premiers travaux de caractérisation se sont tout d'abord intéressés aux collections et matériel maintenu *in vivo* (HAMON et TOURE, 1990 ; TERAUCHI *et al.*, 1993 ; RAMSER *et al.*, 1996 ; ASEMOTA *et al.*, 1996).

Tableau VI. Avantages, désavantages et disponibilité de germoplasme d'igname.

		Conservation au champ	Conservation de graines	Conservation <i>in vitro</i>		
				court terme	moyen terme	long terme
Avantages	simplicité	+++				
	large application	+++				
	diversité génétique		+++			
	sans virus		+++			
	faible coût			+++	+++	+++
	distribution			+++	+++	
Désavantages	érosion génétique	—				
	coût élevé	—				
	gestion difficile	—				
	non identique aux parents		—			
	forme des tubercules		—			
	dormance		—			
Utilisation expérimentale			+			++
Utilisation en routine		+++		+++	+++	

Des marqueurs isozymiques (peroxidase, phosphatase) ont été utilisés afin de caractériser des clones maintenus *in vitro* : à partir de pousses feuillées de *D. alata*, *D. cayenensis-D. rotundata*, *D. esculenta* et *D. bulbifera* (TWYFORD *et al.*, 1990). MANTELL (1993) précise que l'application de ces méthodes à d'autres espèces (*D. composita*, *D. japonica*, *D. olfersiana*, *D. spiculiflora*, *D. trifida*) est confirmée. D'autres travaux (MALAURIE, travaux non publiés ; anon., 1996), utilisent d'autres marqueurs isozymiques (Icd, Mdh, Pgd, Pgi, Pgm, Sdh) à partir de feuilles prélevées sur des vitroplants de *Dioscorea* sp. Ultérieurement, MUZAC-TUCKER et AHMAD (1995) vont procéder à l'identification et à l'étude du polymorphisme de 12 cultivars d'igname, à l'aide de rDna et de Pcr, à partir de vitroplants.

En conclusion, le matériel conservé au champ permet d'être caractérisé par l'utilisation de descripteurs morphologiques et de marqueurs moléculaires. Les autres modes de conservation (sous la forme de graines, *in vitro* à court et moyen terme), doivent compléter leur caractérisation à partir de descripteurs morphologiques par une caractérisation à partir de marqueurs moléculaires. Le matériel conservé *in vitro* à long terme n'est pas utilisable immédiatement et nécessite sa sortie préalable des conditions aseptiques pour sa caractérisation et son évaluation (tableau VII). La caractérisation du matériel concerné est nécessaire pour définir des collections de taille limitée, ou *core-collection*, pour la constitution desquelles le laboratoire a développé des réflexions approfondies (HAMON *et al.*, 1995 ; DUSSERT *et al.*, 1997).

Indexation et traitement des maladies

Identification des pathogènes

Les conditions d'asepsie du matériel végétal maintenu *in vitro* réduisent considérablement les risques d'introduction de ravageurs ainsi que les risques de contamination par une bactérie ou un champignon. L'identification des pathogènes en culture *in vitro* se cantonne donc à l'identification des virus ou autres « viroïdes ».

Selon la note technique sur les consignes relatives au transfert de matériel sain de germoplasme d'igname (FAO-IBPGR, 1989), plusieurs types de virus ont été observés sur l'igname et les méthodes d'identifications qui leur correspondent soulignées :

- le *Chinese yam necrotic mosaic virus* (CYNMV), est observé uniquement au Japon sur le complexe *D. opposita-D. japonica* Thunb. (SHIRAKO et EHARA, 1986) ; c'est un virus filamenteux de 12-13 x 660 nm transmis par des pucerons, qui est facilement détecté et identifié par *electro-blot immunoassay* ;
- le virus de la mosaïque du concombre (CMV), particule isométrique de 30 nm, observé sur un grand nombre d'espèces à travers le monde et sur *D. alata* en Afrique de l'Ouest (FAUQUET et THOUVENEL, 1987) et en Guadeloupe (BALAGNE, 1985) ; il est identifiable par transmission mécanique sur plante hôtes ou par *Enzyme-linked immuno-sorbent assay* (ELISA) ou *Immunosorbent electron microscopy* (ISEM) ;
- *Dioscorea alata virus* (= *Yam virus*), appartenance possible au groupe des Potyvirus avec des particules constituées de filaments flexueux d'environ 12 x 750 nm ; il coïncide avec la culture de *D. alata* (HUGHES, 1986) ;

Tableau VII. Caractérisation et évaluation.

	Descripteurs morphologiques	Marqueurs moléculaires
Conservation au champ	+	+
Conservation de graines	0	+
Conservation <i>in vitro</i>	court terme	(+/-) ⁽¹⁾
	moyen terme	(+/-) ⁽¹⁾
	long terme	0

(1). Une partie des descripteurs morphologiques pourront être utilisés au stade *in vitro*, les autres ne pourront être validés qu'après leur sevrage en serre.

(2). La caractérisation par marqueurs moléculaires du matériel cryoconservé ne pourra être effective qu'après leur régénération en vitroplant.

– le *Dioscorea bacilliform virus*, provoque des chloroses interveinaires de la feuille chez *D. bulbifera* et est associé aux *Internal Brown Spotting* des tubercules de *D. alata* cv White Lisbon et du complexe *D. cayenensis-D. rotundata* (HARRISON et ROBERTS, 1973 ; MANTELL et HAQUE, 1979) ; c'est un virus de type bacilliforme de 28 x 130 nm. Le virus est transmis par la sève aux plantules de *D. bulbifera* ; il est identifié par Elisa et Isem ;

– le *Dioscorea latent virus* se distingue par l'absence de symptôme en réinfection mécanique sur les ignames de l'espèce dont il a été extrait ; c'est un potexvirus filamenteux de 11 x 485 nm, présent chez *D. floribunda* et *D. composita* (PHILLIPS et BRUNT, 1988) ; il provoque de faibles jaunissements sur les feuilles et peut-être transmis par la sève à *Nicotiana* ; son identification peut être réalisée par Elisa et Isem (HEARON, *et al.*, 1978) ;

– le *Yam Mosaic Virus* (YMV) — différent du *Yam Mild Mosaic Virus* (YMMV), travaux de détection et de caractérisation de MUMFORD et SEAL (1997) et LPRC (travaux non publiés) — provoque les plus gros dégâts sur le complexe *D. cayenensis-D. rotundata* et *D. esculenta* (THOUVENEL et FAUQUET, 1986), *D. alata* (THOUVENEL et DUMONT, 1990) en Afrique de l'Ouest, sporadiquement sur *D. alata* dans le Pacifique Sud (THOUVENEL et FAUQUET, 1986 ; PORTH *et al.*, 1987) et dans les Caraïbes sur *D. trifida* (MIGLIORI et CADILHAC, 1976) et occasionnellement sur *D. alata* et le complexe *D. cayenensis-D. rotundata* (MARCHOUX, 1980) ; le virus, filament flexueux de 12 x 750 nm est du groupe des potyvirus, son identification se fait par transmission mécanique sur des plantes indicatrices (*N. benthamiana*) ou par tests sérologiques Elisa ou Isem.

Une indexation systématique des clones introduits a été réalisée par Elisa, pour le YMV (MALAURIE et THOUVENEL, 1988 ; MALAURIE *et al.*, 1988a,b ; CHARRIER et HAMON, 1991), lors de l'établissement de la collection *in vitro* d'igname au laboratoire de biotechnologie de l'Orstom, ultérieurement lirsda, à Adiopodoumé, en Côte d'Ivoire.

Depuis la note technique sur les consignes relatives au transfert de matériel sain de germoplasme d'igname (FAO-IBPGR, 1989), l'indexation de la collection de vitroplants d'igname du Lrgapt-Orstom a permis de mettre en évidence d'autres virus. Cette indexation a été entreprise dès le dernier trimestre 1991 (convention Cee Std 2). Elle a été réalisée par l'utilisation de tests sérologiques de type Elisa, utilisant des anticorps polyclonaux pour la recherche de plusieurs virus, ainsi que par microscopie électronique et par inoculation mécanique, à une gamme d'hôtes sensibles, pour certains cas. On a détecté chez certains vitroplants un virus sérologiquement relié au Pvx, chez d'autres vitroplants des virus reliés sérologiquement au Cmv et au pvy (DUBERN *et al.*, 1993a,b ; DUBERN, 1994 ; LRGAPT, 1993) ; les tableaux VIII a,b,c, en donne la répartition par espèce et par groupe d'affinité au sein de certaines espèces, pour le Ymv, et montre la quasi absence de ce virus chez les *D. alata* testées (tableaux VIII b,c). Les résultats de l'indexation présentent plusieurs cas douteux, quand les réactions sérologiques étaient à la limite du seuil de sensibilité ou de spécificité, ou lorsque les tests se sont révélés positifs une fois et négatifs la fois suivante (ou inversement). Ces résultats pourraient-ils être expliqués par une perte du virus lors de certains repiquages, le virus n'étant pas complètement systémique dans la plante ? En fait il n'en serait rien, tout au moins pour le Ymv, si l'on se rapporte à l'indexation de la collection d'igname menée en 1993 (LRGAPT, 1993), où les résultats obtenus pour le YMV ont été identiques à ceux de l'indexation 1988-89 (MALAURIE et THOUVENEL, 1988 ; MALAURIE *et al.*, 1988a,b). Cependant les difficultés d'appréciation rencontrées dans certains cas doivent être levées. L'utilisation de techniques plus sensibles peut résoudre en partie ces problèmes.

Dans une revue bibliographique, MATHEWS (1993) fait le point sur toutes les techniques de diagnostic. Pour certains virus, spécialement ceux difficilement caractérisables, il peut être utile d'appliquer d'autres techniques de diagnostic. C'est pourquoi, suite aux limites d'utilisation des anticorps polyclonaux dirigés

Tableau VIIIa. Etat phytosanitaire, vis-à-vis du Ymv, des différents groupes appartenant au complexe *D. cayenensis*- *D. rotundata* observés dans la collection *in vitro* d'igname (Lrgapt, Orstom, Montpellier⁽¹⁾).

Groupes ⁽²⁾	Clones indexés	Clones sains (-)	Clones virosés (+)	Clones douteux (-) ou (+)	Clones une fois (-) et une fois (+)
Baniakpa	1	1			
Cocoassié	1			1	
Frou	1				1
Gnan	1	1			
Kangba	8	2	4	1	1
Krenglé	3	1	1	1	
Lokpa	1				1
Sopéré	1	1			
Soussou	1	1			
Yaobadou	2		1	1	
Non encore identifiés					
Bénin	4	1		1	2
Brésil	3	1		1	1
Cameroun	8	1	2	2	3
Guadeloupe	2				2
Nouvelle-Calédonie	2		1		1
Indéterminés	12	5	2	2	3
Total	51	15	11	1	15

(1). (PINEL, DUSSERT, CHABRILLANGE, DUBERN, MALAURIE, travaux non publiés).

(2). Les différents groupes ont été décrits par HAMON *et al.*, (1986).

Tableau VIIIb. Etat phytosanitaire, vis-à-vis du YMV, des différents groupes appartenant à *D. alata* observés dans la collection *in vitro* d'igname (Lrgapt, Orstom, Montpellier⁽¹⁾).

Groupes ⁽²⁾	Clones indexés	Clones sains (-)	Clones une fois (-) et une fois (+)
N'za (chair violette)	20	20	
Bété Bété (chair blanche)	19	19	
Non encore identifiés			
Cameroun	1	1	
Côte d'Ivoire	15	15	
Brésil	7	7	
Gabon	2	2	
Nigeria	2	2	
Nouvelle-Calédonie	6	6	
Philippine	1	1	
Porto Rico	2	1	1
Togo	1	1	
Total	76	75	1

(1). (PINEL, DUSSERT, CHABRILLANGE, DUBERN, MALAURIE, travaux non publiés)

(2). Les groupes Nza et Bété Bété sont spécifiques de la Côte d'Ivoire.

contre un isolat du Ymv (GOUDOU-URBINO, 1995, GOUDOU-URBINO *et al.*, 1996a), BOUSALEM (1995) a utilisé différents tests de diagnostic : Mab-Mab (coating-conjugué), *transcription reverse* (Rt-Pcr) / *Polymerase Chain Reaction*. Cette dernière technique a été réalisée à partir d'Arn viral purifié. Si cette étude moléculaire aboutit à la mise en évidence de souches distinctes du Ymv, la production d'anticorps monoclonaux et la mise au point d'amorces spécifiques utilisables en Immunocapture (Ic)/Rt-Pcr constitueront les

principaux outils de détection et de caractérisation (BOUSALEM, 1995). Le test à partir d'anticorps monoclonaux, est en effet plus sensible, en raison d'un « bruit de fond » réduit. En revanche, il est peut-être plus spécifique, un isolat au moins n'étant pas reconnu avec l'anticorps monoclonal utilisé, alors qu'il l'est avec le polyclonal. Par ailleurs, des travaux sur la caractérisation moléculaire et la diversité moléculaire chez le potyvirus de la mosaïque de l'igname ont été développés dans les laboratoires de

l'Iltab/Orstom-Tsri (ALEMAN 1996 ; ALEMAN *et al.*, 1996 a,b) et du Lprc (BOUSALEM, 1995 ; GOUDOU-URBINO *et al.*, 1997).

Élimination des pathogènes

Un certain nombre de techniques pour l'élimination des virus a été utilisé chez l'igname : culture de méristème et thermothérapie et/ou chimiothérapie.

CULTURE DE MÉRISTÈMES

Depuis GREWAL *et al.*, (1977) et MANTELL *et al.*, (1980), d'autres travaux ont été effectués sur *D. alata* et *D. rotundata* (CORTES-MONLLOR et LI I-JANG, 1983 ; NG et HAHN, 1985 ; NG, 1992), puis sur *D. trifida* (SALEIL, 1986 ; SALEIL *et al.*, 1990), *Dioscorea* sp. (CORTES MONLLOR *et al.*, 1982 ; MALAURIE et THOUVENEL, 1988 ; MALAURIE *et al.*, 1988a,b ; MALAURIE *et al.*, 1992), *D. japonica* (MIKAMI, 1984) et *D. opposita* (MATSUBARA et ISHIHARA, 1988 ; KOBAYASHI, 1991). En 1995, MALAURIE *et al.*, étudient d'une part, les effets de la concentration de régulateurs de croissance (1995 a), d'autre part, les effets de la taille et de la position (1995 b), sur le développement morphologique de méristèmes excisés d'un génotype de *D. praehensilis* et d'un clone du complexe *D. cayenensis-D. rotundata*.

Les travaux faisant état d'une élimination de virus par culture de méristèmes, après utilisation de techniques de diagnostic, sont ceux de SALEIL *et al.*, (1990) sur

D. trifida et MANTELL *et al.*, (1980) sur *D. alata*. SALEIL *et al.*, confirment l'obtention de plantes indemnes de Ymv, après contrôle Elisa, avec un taux de 27 %, déterminé à partir du total des plantes indexées. MANTELL *et al.*, confirment l'obtention de plantes indemnes de *flexuous rod viruses*, après contrôle par microscopie électronique, mais ne précisent pas le taux de plantes assainies. Faisant suite aux cultures de méristèmes réalisées par MALAURIE *et al.*, (1995 a,b) les effets de la taille et du niveau de prélèvement des méristèmes sur le taux de réussite dans l'obtention de plantules saines ont été étudiés. La production de microboutures indemnes de Ymv pour un clone du complexe *D. cayenensis-D. rotundata* et un clone de *D. praehensilis* a été respectivement de 76 et 17 %, déterminé à partir du total des plantes indexées (MALAURIE, travaux non publiés).

THERMOTHÉRAPIE ET/OU CHIMIOTHÉRAPIE

L'éradication de viroses a été tentée par thermothérapie sur des microboutures (BALAGNE, 1985) ou des cultures d'apex (SALAZAR et FERNANDEZ, 1988) de l'igname américaine *D. trifida*. L'influence de la température (37 °C) et d'un agent antiviral (virazole), sur l'obtention de plantes indemnes de virus de l'igname (Ymv), a été étudiée sur des microboutures nodales virosées de *D. praehensilis* (MALAURIE, travaux non publiés). Une même influence a été étudiée sur des méristèmes isolés de deux clones virosés de

Tableau VIIIc. Etat phytosanitaire des différentes espèces présentes dans la collection *in vitro* d'igname, et indexées vis-à-vis du Ymv (Lrgapt, Orstom, Montpellier)⁽¹⁾.

Espèces	Clones indexés	Clones sains (-)	Clones virosés (+)	Clones douteux (-) ou (+)	Clones une fois (-) et une fois (+)
<i>D. abyssinica</i>	5	4	1		
<i>D. alata</i>	76	75			1
<i>D. bulbifera</i>	8	7		1	
<i>D. burkilliana</i>	7	7			
Complexe					
<i>D. cayenensis-D. rotundata</i>	51	15	11	10	15
<i>D. dumetorum</i>	2	1		1	
<i>D. esculenta</i>	9	8	1		
<i>D. hirtiflora</i>	1	1			
<i>D. mangelotiana</i>	13	12			1
<i>D. praehensilis</i>	3	3			
<i>D. schimperana</i>	1	1			
<i>D. togoensis</i>	7	7			
<i>D. trifida</i>	2		2		
<i>D. transversa</i>	1	1			
Hybride Interspécifique :					
<i>D. praehensilis</i> x complexe					
<i>D. cayenensis-D. rotundata</i> , cv. Krenglé	14	13	1		
Total	200	155	16	12	17

(1). (PINEL, DUSSERT, CHABRILLANGE, DUBERN, MALAURIE, travaux non publiés).

D. praehensilis et du complexe *D. cayenensis-D. rotundata* cv *Kouba* (MALAURIE, travaux non publiés). Pour MANTELL *et al.*, (1980), l'utilisation de la thermothérapie (14 jours de flux d'air chaud à 36 °C) a été réalisée sur plantes mères, *in vivo*, avant l'excision des méristèmes. L'action de la seule chimiothérapie (vidarabine, ribavirin), appliquée sur des microboutures nodales de *D. alata* cv *Kinabayo*, infectées par un potyvirus, a été décrite par MANTELL (1993). La production de plantules indemnes de virus est obtenue, pour ce cultivar, 210 j après la mise en culture, avec 3 subcultures de 60, 120 et 30 j sur un milieu composé de 2 phases liquide/solide renfermant 10^{-5} M d'agent antiviral.

D'autres techniques d'élimination des virus ou assimilées ont été décrites dans la littérature, leur utilisation pourrait présenter un intérêt pour l'igname.

ELECTROTHÉRAPIE

L'électrothérapie consiste à soumettre des plantes à un champ électrique de quelques milliampères pendant quelques minutes. Elle est citée dans la littérature pour la première fois en 1978 (JOSE-GUERERO, cité par LOZOYA-SALDANA *et al.*, 1996) dans une thèse sur les techniques d'élimination des virus de plantes. Il faut attendre 1980 pour voir cette technique utilisée pour l'obtention d'amandiers indemnes de virus (QUACQUARELLI *et al.*, cités par LOZOYA-SALDANA *et al.*, 1996). En 1996, LOZOYA-SALDANA *et al.*, appliquent cette technique à des apex de pomme de terre pour l'élimination du virus X. D'après ces auteurs, un traitement de 15 mA pendant 5 minutes suffit pour obtenir un pourcentage de plantes indemnes de virus de 60-100 %, comparé au 25-40 % par thermothérapie.

MICROGREFFAGE D'APEX

Sur la vigne, certaines variétés totalement virosées ont été assainies par microgreffage d'apex, normalement exempt de particules virales, sur microbouture constituée par une pousse de semis de pépin (AYUSO et PENA-IGLESIAS, 1978 ; BENIN et GRENNAN, 1984). Cette technique a été appliquée à d'autres plantes pour l'élimination de particules virales, comme chez le cerisier (DEOGRATIAS *et al.*, 1986).

Pour l'igname, une telle technique de microgreffage pourrait être envisagée, le Ymv n'étant pas transmis à partir de graines de *D. cayenensis* (THOUVENEL et FAUQUET, 1979).

En conclusion, les travaux sur l'éradication de viroses, utilisant les techniques de culture de méristèmes, thermothérapie, chimiothérapie, associées à la culture de méristèmes ou à la culture de microboutures, ont conduit, pour la plupart, à une éradication plus ou moins importante des virus observés. Cependant, si l'on veut appliquer en routine des techniques

d'éradication à un plus grand nombre de génotypes, dans le cadre d'une sanitation de germoplasme, une reprise de travaux est fortement souhaitée associant aux techniques précédemment citées les nouvelles techniques d'électrothérapie et de microgreffage. Cette dernière étant appliquée, en routine, sur la sanitation de la vigne (tableau IX ab).

Distribution et échange

L'échange de germoplasme peut se faire, soit à partir de matériel non aseptique (tubercules, bulbilles, graines, boutures de nœuds), soit à partir de matériel maintenu dans des conditions de culture *in vitro* (microboutures nodales, microtubercules ou microbulbilles, culture d'apex, embryons zygotiques ou somatiques, cals et suspension cellulaires). Différentes notes en dressent les possibilités et les recommandations (FAO/IBPGR, 1989 ; HASAN et TAKAGI, 1995 ; IBPGR, 1988 ; JACKSON *et al.*, 1984 ; NG, 1988).

Distribution et échange de matériel non aseptique

Cette procédure utilisée nécessite de respecter des consignes contraignantes liées à la quarantaine : lavage pour éliminer toute particule de sol, fumigation ou trempage dans un insecticide — carbaryl/malathion — et traitement dans un fongicide, et vérifications de l'état phytosanitaire.

L'échange de germoplasme chez les ignames a été réalisé par le passé sous la forme de tubercules en respectant les mesures de quarantaine. L'un des premiers exemples de transfert de collection sous la forme de tubercules d'igname est celui réalisé par MARTIN en 1974 de la collection du *Mayaguez Institute of Tropical Agriculture* (MITA) de Porto Rico vers l'Irat et l'Orstom de Côte d'Ivoire (ORSTOM, 1976 ; DEGRAS, 1986). La constitution d'une collection *in vitro* d'igname a été réalisée à 82 % à partir de boutures nodales prélevées sur des tubercules à leur levée de dormance provenant du Brésil, Cameroun, Guadeloupe, Nouvelle-Calédonie, Martinique et Porto Rico. Par la suite, la collection dupliquée au Lrgapt (MALAURIE *et al.*, 1993) a été enrichie par l'envoi de tubercules du Bénin, du Gabon et de Mélanésie.

L'échange de matériel végétal peut aussi se faire par graines collectées lors de prospection. MALAURIE *et al.*, (1993) considèrent que 13 % de la collection est issu de graines pour les ignames sauvages. Par la suite, la collection *in vitro* maintenue au Lrgapt a vu son nombre d'accessions augmenter pour les espèces *D. abyssinica*, *D. praehensilis*, *D. burkilliana*, à partir de tubercules issus de semis.

Tableau IX a. Techniques d'éradication des maladies utilisées pour l'igname.

Techniques d'éradication	Espèces	Utilisation expérimentale	Utilisation en routine	Eradication des virus
(A) Culture de méristèmes	<i>D. cayenensis-rotundata</i> , <i>D. japonica</i> , <i>D. praezensilis</i> , <i>D. rotundata</i> , <i>D. trifida</i> , <i>Dioscorea</i> sp.	+	-	+ / -
(B) Thermo-thérapie <i>in vivo</i> + culture de méristèmes	<i>D. alata</i>	+		
(C) Microboutures nodales ou apex + thermo-thérapie	<i>D. alata</i> , <i>D. trifida</i>	+	+ / -	+
(D) Microboutures nodales + chimiothérapie	<i>D. alata</i>	+	+ / -	+
(E) Microboutures nodales + thermo-thérapie et/ou chimiothérapie	<i>D. praezensilis</i>	+		+ / -
(F) Culture de méristèmes + thermo-thérapie et/ou + chimiothérapie	<i>D. cayenensis-rotundata</i> , <i>D. praezensilis</i>	+	-	+ / -

Tableau IX b. Nouvelles techniques d'éradication disponibles.

Espèces		Utilisation expérimentale	Utilisation en routine	Eradication des virus
Electrothérapie	pomme de terre	+	-	+
Microgreffage	citrus, vigne	+	+	+

L'échange de matériel végétal peut se faire aussi sous la forme de boutures de nœuds, prélevées sur du matériel *in vivo*, pour des délais d'acheminement relativement court (1 j). C'est le cas de prélèvement de boutures de nœuds d'ignames prélevées dans les germoirs de l'Idessa, à Bouaké, ou ceux de la Fast, situés sur les terrains de l'Ensa, à Abidjan (Côte d'Ivoire). Ou encore plus récemment, de prélèvement de boutures de nœuds sur des ignames maintenues dans les serres du Muséum national d'histoire naturelle de Brunoy (TOSTAIN et HLADIK, comm. pers.), pour 13 espèces, et introduits en culture *in vitro* au Lrgapt.

Distribution et échange de matériel cultivé *in vitro*

L'échange et la distribution de matériel *in vitro* pour l'igname ont été réalisés en premier lieu sous la forme de microboutures nodales. WITHERS et WHEELANS (1987), dans la base de données de l'Ibpg, font état de plusieurs cas d'échanges internationaux de boutures nodales de *D. alata*, *D. bulbifera*, *D. opposita* (MANTELL S.H., Wye College), *Dioscorea* sp. (JARRET R., Univ. de Floride), *Dioscorea* sp. (QUAK F., Res. Inst. Plant Protection, Wageningen). Ultérieurement, l'envoi de vitroplants

du Cenargen-Embrapa est réalisé de collection à collection *in vitro* d'igname (MALAURIE *et al.*, 1993). C'est à partir de cette collection (1989), ou à partir de son duplicata (Lrgapt) dès 1992, qu'une série de cultivars appartenant à *D. alata* et au complexe *D. cayenensis-D. rotundata* a été expédiée vers la Nouvelle-Calédonie (PELLEGRIN F., Orstom ; VANBERCIE et VERNIER P., Cirad) (tableau X).

Des structures de culture en conditions aseptiques peuvent être aussi utilisées comme structures de transit préalablement à leur introduction en plein champ. La culture *in vitro*, à la réception du matériel *in vivo* (tubercules) et après vérification phytosanitaire, va permettre de multiplier le matériel introduit et de le transférer au champ après acclimatation et contrôle phytosanitaire. Cette procédure, développée à Adiopodoumé (Côte d'Ivoire), a permis, en 1987, l'introduction à l'Idessa (Bouaké) de plusieurs clones de *D. alata* et du complexe *D. cayenensis-D. rotundata* en provenance du Brésil (Cenargen-Embrapa), de Nouvelle-Calédonie (Cirad-Irat) et de Porto Rico (Tropical Agric. Res. Station, Mayaguez) (tableau XI). Une bonne maîtrise de l'acclimatation est nécessaire pour le passage *in vitro-in vivo* et ces problèmes ont été abordés sur *D. alata* (LACOINTE et ZINSOU 1987a,b) et sur plusieurs cultivars appartenant à

Tableau X. Enrichissement de la diversité génétique des ignames de Nouvelle-Calédonie par le transfert et l'introduction de matériel sous la forme de vitroplants conservés, multipliés et diffusés par l'Orstom (1989-1995).

Implication de l'Irsta (1989, Adiopodoumé) et de l'Orstom de 1992 à 1995 (Lrgapt, Montpellier) dans la diffusion de cultivars d'igname, issus de Côte d'Ivoire, du Brésil, de Martinique et de Porto Rico, pour une introduction en Nouvelle-Calédonie par PELLEGRIN (Orstom), VANBERCIE et VERNIER (Cirad-ca).

N° Cultivar	Espèces	Nom du cultivar	Code donateur	Provenance
OA02	<i>D. alata</i>	Kinapay	-***	Côte d'Ivoire*
OA16	<i>D. alata</i>	Brazo Fuerte	-***	Côte d'Ivoire*
OA21	<i>D. alata</i>	Florido	-***	Côte d'Ivoire*
OA30	<i>D. alata</i>	White Lisbon	-***	Côte d'Ivoire*
IB02	<i>D. alata</i>	Hawai Branched	136 (Idessa)	Côte d'Ivoire*
IB21	<i>D. alata</i>	Prolific	138 (Idessa)	Côte d'Ivoire*
MA02	<i>D. alata</i>	Plimbite	-	Martinique
PR03	<i>D. alata</i>	Gemelos	PI390075	Porto Rico
PR04	<i>D. alata</i>	Leone Globe	PI 390100	Porto Rico
PR05	<i>D. alata</i>	Kinabayo	PI 390079	Porto Rico
PR08	<i>D. alata</i>	Moresby	PI390101	Porto Rico
EM10	<i>D. alata</i>	-	132	Brésil (Cenargen)
OA20	<i>D. cayenensis-D. rotundata</i>	Krenglé	-***	Côte d'Ivoire
IB14	<i>D. cayenensis-D. rotundata</i>	Krenglé	E.144 (Idessa)	Côte d'Ivoire
IB07	<i>D. cayenensis-D. rotundata</i>	Douba yésirou	262 (Idessa)	Côte d'Ivoire**
IB40	<i>D. cayenensis-D. rotundata</i>	Adola	266 (Idessa)	Côte d'Ivoire**

* Cultivars issus de la collection du Mita de Mayaguez et transférés par MARTIN en 1974 vers l'Orstom et l'Irat (ORSTOM, 1976, DEGRAS, 1986).

** Cultivars originaires du Bénin (pays Bariba).

*** Collection au champ d'Adiopodoumé.

Tableau XI. Utilisation des structures de culture *in vitro* pour la diffusion de matériel végétal issu de transfert international. Implication de l'Orstom en 1988 (Adiopodoumé, Côte d'Ivoire) dans l'introduction *in vitro* et la micropropagation de microboutures nodales de cultivars d'igname, issus de Porto Rico, de Nouvelle-Calédonie et du Brésil, pour une introduction et une diffusion en Côte d'Ivoire par R. DUMONT (Irat) et l'Idessa (Bouaké, Côte d'Ivoire).

N° Cultivar	Espèces	Nom du Cultivar	Code donateur	Provenance
PR04	<i>D. alata</i>	Leone Globe	PI 390100	Porto Rico
PR05	<i>D. alata</i>	Kinabayo	PI 390079	Porto Rico
PR06	<i>D. alata</i>	Binogas	PI 39 0072	Porto Rico
PR07	<i>D. alata</i>	Gunung	PI 390102	Porto Rico
PB03	<i>D. cayenensis-D. rotundata</i>	Corossol	-	Guadeloupe
NC01	<i>D. bulbifera</i>	Nouméa wa	IRAT 28	Nouvelle-Calédonie
NC06	<i>D. alata</i>	Gouvren	IRAT 84	Nouvelle-Calédonie
NC03	<i>D. alata</i>	Katjoa	IRAT 43	Nouvelle-Calédonie
NC05	<i>D. alata</i>	Deu	IRAT 50	Nouvelle-Calédonie
EM04*	<i>D. alata</i>	-	264	Brésil
EM10*	<i>D. alata</i>	-	132	Brésil
EM11*	<i>D. cayenensis-D. rotundata</i>	-	2526	Brésil

Le type de matériel expédié était sous la forme de tubercules sauf, pour les 3 cultivars provenant du Brésil (Cenargen-Embrapa)* qui ont été expédiés sous la forme de vitroplants.

différentes espèces d'ignames (MALAURIE, travaux non publiés). Cependant, le type de milieu utilisé (MALAURIE *et al.*, 1993) au Lrgapt, assurant une croissance ralentie ne pose pas de problème, et permet de procéder au sevrage à partir de ces conditions. Ce type de banque de gènes permettant la distribution internationale de matériel correspond bien à une banque active.

La potentialité de tubériser que présente un grand nombre d'ignames *in vitro* peut être utilisée à des fins

de transfert de matériel, les microtubercules et microbulbilles permettant d'avoir un plus grand pourcentage de réussite lors du passage au champ (NG, 1988b ; JOHN *et al.*, 1993 ; MALAURIE *et al.*, 1993 ; MANTELL, 1993). Ces tubercules formés *in vitro* sont à maturité dormants ; ils le demeurent durant 2 à 5 mois, comme ceux développés *in vivo*.

Récemment, une méthode originale expérimentée sur trois espèces d'igname (*D. alata*, *D. opposita*, *D. rotundata*) a été proposée par HASAN et TAKAGI

(1995). Ces derniers utilisent la technique d'encapsulation de boutures nodales dans des billes d'alginate dans le but de transfert de matériel. Cette procédure permet de maintenir, pendant au moins 2 semaines d'obscurité, les boutures nodales encapsulées, placées dans un cryotube de 1 ml, contenant 0.5 ml d'un milieu semisolidé MS. Ce maintien de 2 semaines à l'obscurité et la manipulation aisée des cryotubes permettent, selon ces auteurs, d'envisager, sans problème, des échanges internationaux de ressources génétiques.

La culture de méristèmes, associée à diverses thérapies dans le cas de plantes virosées, est préconisée pour l'échange et la distribution d'ignames conservées *in vitro*. La régénération de cette culture doit être suivie de contrôles par immunoenzymologie, inoculation mécanique sur plantes hôtes et microscopie électronique (NG et HAHN, 1985). Un contrôle de la conformité des plantes régénérées à partir des méristèmes pourrait être envisagé dans le cas de longue période de culture en présence de régulateurs de croissance. Par ailleurs, la mise à disposition de nouvelles méthodes (*immunocapture PCR* et *immunocapture reverse transcriptase PCR* avec les *primers* choisis) devrait permettre à l'ITA de diffuser des cultivars de *D. alata*, garantis sains, après culture de méristèmes et séries de contrôles pendant la phase *in vitro* et lors du transfert en serre *insect-proof*. D'après les auteurs, le temps total requis, à partir de la plante mère en plantation, pour la production de vitroplants, de microtubercules ou de minitubercules sains et indexés varie respectivement de 12 à 15 mois, de 17 à 20 mois et de 2 ans (NG *et al.*, 1997).

Dans leurs études menées sur la différenciation des isolats de virus de l'igname, GOUDOU-URBINO *et al.* (1996b) mettent en évidence l'absence de relation entre l'origine des isolats (géographique ou espèces hôtes) et la grande variabilité des différentes souches virales. Ces derniers préconisent l'application de procédures phytosanitaires plus rigoureuses pour éviter l'introduction de matériel infecté lors d'échanges internationaux.

En conclusion, pour les échanges de matériel végétal, ne subsiste que les contraintes d'indexation, et d'éradication pour le matériel virosé. Toute diffusion de matériel, réalisé depuis lors, n'a concerné que les accessions cataloguées indemnes des virus dont maîtrisait à l'époque l'indexation.

Conclusion et perspectives

Ce chapitre tente de préciser les différentes études à réaliser permettant la conservation et l'échange de germoplasme en général, et chez les ignames, en particulier, dans le cadre des ressources

génétiques des plantes. La conservation d'un germoplasme est, d'une part, en amont, tributaire des collectes ou introductions de matériel, et d'autre part, en aval, dépendante d'une bonne connaissance de ses accessions (évaluation, caractérisation) et de leur état phytosanitaire. Mais la bonne conservation d'un germoplasme dépend aussi des techniques qui lui seront appliquées. Une combinaison de plusieurs méthodes (*in situ* — collection au champ —, *ex situ* — collection *in vitro* —, croissance ralentie, cryoconservation) conduirait à de meilleurs résultats dans le cas de l'igname (HANSON, 1986).

Selon PERRINO (1992), les collections de plantes, *in vivo* ou *in vitro*, seront toujours indispensables aux biotechnologues. Ces derniers, ne pouvant inventer par eux-mêmes des gènes, dépendent étroitement des gènes que recèle la nature.

La culture *in vitro* de l'igname contribue à la sauvegarde de la biodiversité du genre *Dioscorea*. Une application des résultats obtenus en cryoconservation, sur 2 espèces d'igname, à un plus grand nombre d'espèces, devrait permettre un transfert de technologie. L'utilisation de nouvelles techniques, d'une part pour l'élimination des pathogènes (électrothérapie, microgreffage), en complément de celles déjà existantes, et d'autre part, pour l'obtention de plantes résistantes à certains virus (transformation), devrait garantir à l'igname le statut de plante « indemne de virus » et permettre les échanges internationaux, et à long terme une distribution de cultivars sains pour le paysan.

Considérant que nous sommes actuellement capables de :

- gérer en routine des collections *in vitro* maintenues dans des conditions de croissance ralentie ;
- caractériser les accessions avec les techniques isozymiques et moléculaires ;
- indexer pour un plus grand nombre de virus ;
- produire quelques vitroplants indemnes de virus ;
- assurer la distribution internationale et le sevrage de ce matériel à partir d'une collection *in vitro* en croissance ralentie, correspondant bien à une banque active, quelles peuvent être les perspectives à envisager ?

Les différentes études, à développer ou à continuer sur la conservation et sur l'état phytosanitaire d'un germoplasme, peuvent être :

- le renforcement de la conservation de germoplasme par un développement de la conservation *in situ* (« conservatoire »), et la conservation sous la forme de banque de graines ;
- l'application des résultats obtenus en cryoconservation à un plus grand nombre de génotypes, plus représentatif de la diversité ;
- la continuation de recherches de techniques d'indexation et de thérapie pouvant permettre, à l'avenir, de transférer sans contraintes du matériel sain.

Remerciements

La rédaction de cette communication sur « La conservation et l'échange de germoplasme chez les ignames (*Dioscorea* sp.) » tient compte d'aspects virologiques. Une lecture par des spécialistes de cette discipline se révélait nécessaire. Je tiens donc à remercier les Dr J. DUBERN et D. FARGETTE, pour leurs avis et commentaires.

Références bibliographiques

- ACHEAMPONG E., 1988. Germplasm preservation of tuber crops by tissue culture methods. *In* The Use of Biotechnology for the Improvement of Cassava, Yams and Plantain in Africa. Contributions from a meeting of African research institutions. IITA, Ibadan, Oyo State, Nigeria, Meeting Reports Series 2 : 17-18.
- AKORODA M.O., 1993. Yams *Dioscorea* spp. *In* Genetic Improvement of Vegetable Crops, G. KALLOO et B. O. BERGH (Ed.). Pergamon Press, Oxford, UK, p. 717-733.
- ALEMAN M.E., 1996. Caractérisation moléculaire, diversité génétique et contrôle du virus de la mosaïque de l'igname (Ymv). Thèse, doctorat en sciences agronomiques. Ensam, Montpellier, France, 138 p.
- ALEMAN M.E., GOUDOU-URBINO C., DUBERN J., FAUQUET C., 1996a. Analysis of sequence variations in the P1, HC, P3, N1b and CP regions of Yam Mosaic Potyvirus isolates : implications for potyvirus intra-species molecular diversity. *J. of General Virology* 78 : 1253-1264.
- ALEMAN M.E., MARCOS J.F., BRUGIDOU C., FUX C.I., GOUDOU-URBINO C., DUBERN J., 1996b. Genomic Organization, Molecular Diversity and Control of Yam (*Dioscorea*) Mosaic Virus. *ILTAB Review* 1991-1996, p. 81-82.
- AMMIRATO P.V., 1984. Yams. *In* Handbook of Plant Cell Culture Vol. 3. Crop Species, AMMIRATO P.V. et al., (Eds.). Macmillan, New York, USA, p. 327-354.
- ANONYME, 1996. Caractérisation génétique des ignames de Nouvelle-Calédonie. 1) Variabilité morpho-agronomique, 2) Variabilité des isozymes. Projet Cordet 93 T A1, programme cultures vivrières. Cirad-ca, Nouvelle-Calédonie.
- ARAKI H., SHI L., YAKUWA T., 1992. Effects of auxin, cytokinin and nitrogen concentration on morphogenesis of tissue-cultured shoot apex of Chinese Yam (*Dioscorea opposita* Thunb.). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 60 : 851-857.
- ARNOLIN R., GAMIETTE F., DEGRAS L., 1991. Obtention de plantules d'igname (*D. alata* et *D. cayenensis-rotundata*) par culture d'embryon *in vitro*. *In* Annual meeting of Caribbean Food Crops Society, Guadeloupe, Gosier, 1-6 July 1989. Les colloques de l'Inra, Inra, Paris, France, 25 : 646-659.
- ASEMOTA H.N., RAMSER J., LOPEZ-PERALTA C., WEISING K., KAHL G., 1996. Genetic variation and cultivar identification of Jamaican yam germplasm by random amplified polymorphic DNA analysis. *Euphytica* 92 : 341-351.
- ASHMORE S., 1997. Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources. International Plant Genetic resources Institute, Rome, Italy, 67 p.
- AYENSU E.S., COURSEY D.G., 1972. Guinea yams. The botany, ethnobotany, use and possible future of yams in West Africa. *Econ. Bot.* 26: 301-318.
- AYUSO P., PENA-IGLESIAS A., 1978. Shoot apex (meristem) grafting: a novel and promising technique for regeneration of virus infected grapevines. *In* Proceeding of the 6th conference on virus of grapevines. *Monografias* 18 : 319-323.
- BALAGNE M., 1985. Le microbouturage *in vitro* de l'igname cousse couche *Dioscorea trifida* en vue de son application pour la guérison des variétés atteintes de viroses. Thèse de 3^e cycle. Ustl, Montpellier, France, 144 p.
- BENIN M., GREANAN S., 1984. Le microgreffage une technique d'élimination des virus de la vigne. *Proc. Agric. Vitic.* 2 : 33-36.
- BOURRET (-CORTADELLAS) D., 1973. Etude ethnobotanique des *Dioscorea* alimentaires, ignames de Nouvelle-Calédonie. Doctorat de 3^e cycle. Faculté des sciences, Paris, France, 135 p.
- BOUSALEM M., 1995. Mise au point d'outils immunologiques et moléculaires pour la détection et la caractérisation des potyvirus infectant l'igname. Caractérisation moléculaire préliminaire de l'isolat BFC 56 du Yam Mosaic Virus. Laboratoire de phytovirologie des régions chaudes (Lprc), Orstom, Montpellier, France, 23 p. (document interne).
- BURKILL I.H., 1960. The organography and the evolution of *Dioscoreaceae*, the family of the yams. *J. Linn. Soc. (Bot.)* 56 : 319-412.
- BUTENKO R.G., POPOV A.S., VOLKOVA L.A., CHERNYAK N.D., NOSOV A.M., 1984. Recovery of cell cultures and their biosynthetic capacity after storage of *Dioscorea deltoïdea* and *Panax ginseng* cells in liquid nitrogen. *Plant Science Letters* 33 (3) : 285-292.
- CHANDLER F.L., HAQUE S.Q., 1984. The use of tissue culture in the production of improved yam and sweet potato planting material. *In* FAO Plant Production and Protection Paper 59 : 69-87.
- CHARRIER A., DEREUDDRE J., ENGELMANN F., 1991. The implications of biotechnology in germplasm conservation and utilization. *In* Crop Genetic

- Resources of Africa. Vol II. Proceedings of an International Conference on Crop Genetic Resources of Africa. N.Q. NG, P. PERRINO, F. ATTERE, H. ZEDAN (Eds.). IITA/IBPGR/UNEP/CNR, Ibadan, Nigeria, p. 279-286.
- CHARRIER A., HAMON S., 1991. Germplasm collection, conservation and utilization activities of the Office de la recherche scientifique et technique d'outre-Mer (Orstom). In Crop Genetic Resources of Africa. Vol II. Proceedings of an International Conference on Crop Genetic Resources of Africa. N.Q. NG, P. PERRINO, F. ATTERE, H. ZEDAN (Eds.). IITA/IBPGR/UNEP/CNR. Ibadan, Nigeria, p. 41-52.
- CHULAFICH L., GRUBISHICH D., VUIICHICH R., VOLKOVA L.A., POPOV A.S., 1994. Somatic embryo production *in vitro* in *Dioscorea caucasica* Lipsky and *Dioscorea balcanica* Kusanin and cryopreservation of their organogenic callus tissue. Russian Journal of Plant Physiol. 41 (6) : 821-826.
- CORTES MONLLOR A., LIU L.J., 1983. Tissue culture propagation of yam in Puerto Rico. J. Agric. Univ. Puerto Rico 67 : 419-428.
- CORTES MONLLOR A., LIU L.J., ARROYO E., 1982. An improved medium for tissue culture of yam *Dioscorea* sp. *in vitro* in Puerto Rico. Phytopathology 72 (1) : 171.
- COURSEY D.G., 1967. Yams. Longmans, London, UK, 230 p.
- COURSEY D.G., MARTIN F.W., 1972. The past and future of the yams as crop plants. Pantl. Foods & Human. Nutr. 2 (3/4) : 133-138.
- DALOUMAN R., 1989. Evolution des sucres solubles majeurs et de l'activité 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, Côte d'Ivoire, 75 p.
- DALOUMAN R., 1994. Aspects biochimiques liés à la tubérisation *in vitro* de l'igname *Dioscorea alata* L. : métabolisme des sucres et des protéines. Thèse de 3^e cycle, spécialité biochimie. Université nationale de Côte d'Ivoire, faculté des sciences et techniques, Abidjan, Côte d'Ivoire, 113 p.
- DALOUMAN R., TROUSLOT M-F., TROUSLOT P., CRESTIN H., DIOPOH K.J., 1992. Sucres solubles et activité invertase acide au cours de la croissance chez l'igname (*Dioscorea* spp.) *in vitro*. Poster III. Troisième forum des jeunes chercheurs en physiologie végétale, Perpignan, 3-4 septembre 1992. Société française de physiologie végétale, Abstract book.
- DALOUMAN R., TROUSLOT M.F., TROUSLOT P., DIOPOH K.J., 1993. Sucres solubles et activité invertase acide au cours de la croissance chez l'igname (*Dioscorea* spp.) *in vitro*. Résumé Comm. Symp. « L'Afrique face au défi des biotechnologies végétales : cas de l'igname » Abidjan, 19-23 avril 1993. Programmes et résumés. IIRSDA, Abidjan, Côte d'Ivoire, 45 p.
- DEGRAS L., 1986. L'igname, techniques agricoles et productions tropicales. Maisonneuve et Larose, Paris, France, 409 p.
- DEGRATIAS J.M., LUTZ A., DOSBA F., 1986. Microgreffage d'apex de cerisiers (*Prunus avium* L.) multipliés *in vitro* en vue de l'élimination de trois types de particules virales (Clsv, Pdv et Nrsv). Fruits 41 (11) : 675-680.
- DEREUDDRE J., SCOTTEZ C., ARNAUD Y., DURON M., 1990. Résistance d'apex caulinaires de vitroplants de poirier (*Pyrus communis* L. cv Beurré Hardy), enrobés dans l'alginate, à une déshydratation puis à une congélation dans l'azote liquide : effet d'un durcissement préalable au froid. C. R. Acad. Sc. Paris, Série III 310 : 317-323.
- DEREUDDRE J., BLANDIN S., HASSEN N., 1991. Resistance of alginate-coated somatic embryos of carrot (*Daucus carota* L.) to desiccation and freezing in liquid nitrogen: 1. Effects of preculture. Cryo-Letters 12 : 1125-134.
- DODDS J.H., WATANABE K., 1990. Biotechnical tools for plants genetic resources management. Diversity 6 : 26-28.
- DUBERN J., 1994. Amélioration et valorisation de l'igname. Projet Cee Std2. Rapport de synthèse. Orstom, Montpellier, France, 22 p.
- DUBERN J., GIVORD L., GOUDOU-URBINO C., KONATE G., MALAURIE B., QUIOT J-B., 1993a. Amélioration et valorisation de l'igname. Projet Cee Std2. Rapport d'exécution pour la période du 01/09/91 au 01/09/92. Orstom, Montpellier, France, 37 p.
- DUBERN J., GIVORD L., GOUDOU-URBINO C., KONATE G., MALAURIE B., QUIOT J.B., 1993b. Amélioration et valorisation de l'igname. Projet Cee Std2. Rapport d'exécution pour la période du 01/09/92 au 01/09/93. Orstom, Montpellier, France, 54 p.
- DUSSERT S., CHABRILLANGE N., ANTHONY F., ENGELMANN F., RECALT C., HAMON S., 1997. Variability in storage response within a coffee (*Coffea* spp.) core collection under slow growth conditions. Plant Cell Rep. 16 : 344-348.
- ELLIS R.H., HONG T.D., ROBERTS E.H., 1985. *Dioscoreaceae*. In Handbook of Seed Technology for Genebanks. Handbook for Genebanks n° 3, Vol. I. Compendium of Specific, Germination information and Test Recommendation. IPBGR, Italy, Rome, 34 : 329-331.
- ENGELMANN F., 1991. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm, a review. Euphytica 57 : 227-243.

- ENGELMANN F., 1997. *In vitro* conservation methods. In *Biotechnology and Plant Genetic Resources : Conservation and Use*, B.V. FORD-LLOYD, J.H. NEWBERRY and J.A. CALLOW (Eds.). CABI, *in press*.
- ENGELS J.M.M., 1993. How can biotechnology be exploited in the conservation and use of biological diversity ? In *GTZ Workshop on Plant Biotechnology in Technical Cooperation Programmes*, 6-11 October 1993. Legaspi, Philippines, p. 1-33.
- 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^e cycle, Paris XI, n° 3460. Orsay, France, 80 p.
- FABRE J., DEREUDDRE J., 1990. Encapsulation-dehydration : a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot-tips. *Cryo-Letters* 11 : 413-426.
- FAUQUET C., THOUVENEL J.-C., 1987. Cucumber mosaic on sweet potato and yam. *Plant Viral Diseases in the Ivory Coast*. Documentations techniques n° 46, Orstom, Paris, France, 29 p.
- FAO/IBPGR 1989. Technical guidelines for the safe movement of yam germplasm. A.A. BRUNT, G.V.H. JACKSON, E.A. FRISON (Eds). FAO, Italy, Rome, p. 1-20.
- FAO, 1996. The State of the World's Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. Background Documentation prepared for the International Technical Conference on Plant Genetic Resources, Leipzig, Germany, 17-23 June, 1996. FAO, Rome, Italy, 336 p.
- FAUTRET A., DUBLIN P., CHAGVARDIEFF P., 1988. Callogenèse et néoformation chez deux espèces d'ignames comestibles, *Dioscorea alata* et *D. trifida*. In *Proc. 7th symposium ISTRC, Gosier (Guadeloupe)*, 1-6 July 1985. Paris, France, INRA (1988) : 365-386.
- FORSYTH C., VAN STADEN J., 1982. An improved method of *in vitro* propagation of *Dioscorea bulbifera*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 1 (4) : 275-281.
- FORSYTH C., VAN STADEN J., 1984. Tuberization of *Dioscorea bulbifera* stem nodes in culture. *J. Plant Physiol.* 115 : 79-83.
- FRISON E., SERWINSKI J. (eds), 1995. Directory of European Institutions Holding Plant Genetic Resources, fourth edition. Vol. 1 and 2. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 499 p., 87 p.
- FURMANOWA M., GUZEWSKA J., 1989. *Dioscorea*: *in vitro* culture and the micropropagation of diosgenin-containing species. In *Biotechnology in agriculture and forestry; Medicinal and Aromatic Plants* (vol. 7). Y.P.S. BAJAJ (Ed). Springer-Verlag, Paris, France, p. 162-184.
- GOUDOU-URBINO C., 1995. La mosaïque de l'igname : aspects épidémiologiques au Burkina Faso et variabilité du virus. Thèse de l'université Montpellier II. Montpellier, France, 147 p.
- GOUDOU-URBINO C., GIVORD L., QUIOT J.B., BOEGLIN M., KONATE G., DUBERN J., 1996a. Differentiation of yam virus using symptomatology, western blot assay, and monoclonal antibodies. *Journal of Phytopathology* 144 (5) : 235-240.
- GOUDOU-URBINO C., KONATE G., QUIOT J.B., DUBERN J., 1996b. Etiology and ecology of yam mosaic disease in Burkina Faso. *Tropical Sciences* 36 : 34-40.
- GOUDOU-URBINO C., BOUSALEM M., PINEL A., FARGETTE D., DUBERN J., 1997. Les virus de l'igname : aspects épidémiologiques et variabilité (Yam viruses: epidemiology and variability). In *Séminaire international. L'igname : plante séculaire et culture d'avenir*. Montpellier 3-6 juin 1997. Cirad, Montpellier, France.
- GREWAL S., KOUL S., SACHDEVA J., ATAL C.K., 1977. Regeneration of plants of *Dioscorea deltoidea* by apical meristem culture. *Indian J. Exp. Biol.* 15 : 201-203.
- HAMON P., HAMON S., TOURE B., 1986. Les ignames cultivées du complexe *Dioscorea cayenensis-D. rotundata* de Côte d'Ivoire. Inventaire et description des « cultivars » traditionnels. Faculté des sciences et techniques, Abidjan, Côte d'Ivoire. Ipbg, Rome, Italie, 63 p.
- HAMON P., TOURE B., 1990. Characterization of traditional yam varieties belonging to the *Dioscorea cayenensis-rotundata* complex by their isozymic patterns. *Euphytica* 46 : 101-107.
- HAMON P., DUMONT R., ZOUNDJIEKPON J., TIO-TOURE B., HAMON S., 1995. Les ignames sauvages d'Afrique de l'Ouest. Caractéristiques morphologiques. Orstom, Paris, France, 84 p.
- HAMON S., NOIROT M., ANTHONY F., 1995. Developing a coffee core collection using the principal components score strategy with quantitative data. In *Core collections of Plant Genetic Resources*, HODGKIN T., BROWN A.H.D., VAN HINTUM T.J.L. AND MORALES E.A.V. (Eds). Wiley-Sayce, London, UK, p. 117-126.
- HANSON J., 1986. Methods of storing tropical root crop germplasm with special reference to yam. FAO/IBPGR Plant Genetic Resources Newsletter 64 : 24-32.
- HARRISON B.D., ROBERTS I.M., 1973. Association of virus-like particles with internal brown spot of yam (*Dioscorea alata*). *Trop. Agric. (Trinidad)* 50 : 335-340.
- HASAN S.M.Z., TAKAGI H., 1995. Alginate-coated nodal segments of yam (*Dioscorea* spp.) for germplasm exchange and distribution. *Plant Genetic Resources Newsletter* 103: 32-35.

- HAUDRICOURT A.G., 1964. Nature et culture dans la civilisation de l'igname : l'origine des clones et des clans. L'homme, revue française d'anthropologie, janvier-avril.
- HEARON S.S., CORBETT M.K., LAWSON R.H., GILLESPIE A.G., WATERWORTH H.E., 1978. Two flexuous-rod viruses in *Dioscorea floribunda* : symptoms, identification and ultrastructure. *Phytopathology* 68 : 1137-1146.
- HENSHAW G.G., 1982. Tissue culture methods and germplasm storage. *In Plant Tissue Culture*, A. FUJIWARA Ed., Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture, p. 789-792.
- HLADIAK A., BAHUCHET S., DUCATILLON C., HLADIAK C.M., 1984. Les plantes à tubercules de la forêt dense d'Afrique centrale. *Rev. écol. (Terre et vie)* 39 : 249-290.
- HONG T.D., ELLIS R.H., 1996. A protocol to determine seed storage behaviour. IPGRI technical Bulletin n° 1., J.M.M. ENGELS and J. TOLL, vol. (Eds). IPBGR, Rome, Italy. 62 p.
- HUGHES J.D'A., 1986. Viruses of the Araceae and *Dioscorea* species: their isolation, characterization and detection. Ph. D Thesis, University of Reading, UK.
- IBPGR, 1986. 2. Root and Tuber Crops, 2ndéd. *In Directory of Germplasm Collections*. J. TOLL, T. LAWRENCE, D.H. VAN SLOTEN (Eds). IPBGR, Rome, Italy, p. 130-155.
- IITA, 1981. Annual report for 1980. IITA, Ibadan, Nigeria.
- IBPGR, 1988. IBPGR Advisory Committee on *in vitro* storage. Conservation and movement of Vegetatively Propagated Germplasm : *in vitro* Culture and Disease Aspects. International Board for Plant Genetic Resources, Rome, 60 p.
- JACKSON G., IKIN B., FIRMAN I., 1984. Guidelines for the transfer of root crop germplasm. Suva, Fidji, Food and Agriculture Organisation of the United Nations in association with the South Pacific Commission. FAO, Rome, Italy, Fied Document 6, 25 p.
- JEAN M., CAPPADOCIA M., 1991. *In vitro* tuberization in *Dioscorea alata* L. Brazo fuerte and Florido and *D. abyssinica* Hoch. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 26 : 147-152.
- JEAN M., CAPPADOCIA M., 1992. Effects of some growth regulators on *in vitro* tuberization in *Dioscorea alata* L. Brazo fuerte and *D. abyssinica* Hoch. *Plant Cell Reports* 11 : 34-38.
- JOHN J.L., COURTNEY W.H., DECOTEAU D.R., 1993. The influence of plant growth regulators and light on microtuber induction and formation in *Dioscorea alata* L. cultures. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 34 : 245-252.
- KNUTH R., 1924. *Dioscoreaceae*. A. Engler. *Das Pflanzenreich*, IV-43, 87. Heft, 1-387.
- KOBAYASHI N., 1991. Production of virus-free plants and its mass propagation by tissue culture in Chinese yam, *Dioscorea opposita* Thunb. *Bulletin of the Saitama Horticultural Experiment Station* 18 : 81-99.
- KUO C.G., 1991. Conservation and distribution of sweet potato germplasm. *In In vitro Methods for Plant Genetic Resources*. J.H. DODDS (Ed.). Chapman and Hall, London, UK, p. 123-159.
- LACOINTE A., ZINSOU C., 1987a. Croissance et développement au champ de l'igname (*Dioscorea alata* L.) à partir de plants produits par culture *in vitro*. *Agronomie* 7 (5) : 331-338.
- LACOINTE A., ZINSOU C., 1987b. Effet de la date de plantation sur la croissance et le développement de plantules d'igname (*Dioscorea alata* L.) produites par culture *in vitro*. *Agronomie* 7 (7) : 475-481.
- LANGIS R., SCHNABEL B., EARLE E.D., STEPONKUS P.L., 1989. Cryopreservation of *Brassica campestris* L. cell suspensions by vitrification. *Cryo-Letters* 10 : 421-428.
- LATTA R., 1971. Preservation of suspension culture of plant cells by freezing. *Can. J. Bot.* 40 : 1253-1254.
- LAUZER D., LAUBLIN G., VINCENT G., CAPPADOCIA M., 1992. *In vitro* propagation and cytology of wild yams, *Dioscorea abyssinica* Hoch. and *D. mangelotiana* Miège. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 28 : 215-223.
- LOZOYA-SALDANA H, ABELLO F.J., GARCIA G DE LA R., 1996. Electrotherapy and shoot tip culture eliminate potato virus X in potatoes. *Amer. Pot. J.* 73 : 149-154.
- LRGAPT, 1993. Rapport annuel du laboratoire de ressources génétiques et amélioration des plantes tropicales. HAMON S. (Ed.). Orstom, Montpellier, France, 39 p.
- MALAURIE B., TARDIEU F., THOUVENEL J.C., 1988a. Rapid production of disease-free germplasm of *Dioscorea* spp. (Monocotyledonous). *In 8th International Biotechnology Symposium*, Paris, 17-22 July 1988. Société française de microbiologie, France, Abstract Book, p. 248.
- MALAURIE B., TARDIEU F., THOUVENEL J.C., 1988b. 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. Abstract Book, p. 51.
- MALAURIE B., THOUVENEL J.C., 1988. Production de plants d'igname, dépourvus de viroses, par culture de méristèmes. *In Les échanges Nord-Sud, 2^e Salon international de la coopération et de l'aide au développement (Sicad)*, 7-11/12/1988, Montpellier, poster

- session. Agropolis, 4^e Rencontres internationales, Montpellier, France, 3 p.
- MALAUURIE B., PUNGU O., DUBERN J., THOUVENEL J.C., 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.). Plant Virology in the Tropics, abstract 9-10 April 1992. AAB, Association of Applied Biologists, University of York, UK.
- MALAUURIE B., PUNGU O., DUMONT R., TROUSLOT M.F., 1993. The creation of an *in vitro* germplasm collection of yam (*Dioscorea* spp.) for genetic resources preservation. Euphytica 65 : 113-122. Corrigendum 66 : 243.
- MALAUURIE B., PUNGU O., TROUSLOT M.F., 1995a. Effect of growth regulators concentrations on morphological development of meristem-tips in *Dioscorea cayenensis-D. rotundata* complex and *D. praehensilis*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 41 : 229-235.
- MALAUURIE B., THOUVENEL J.C., PUNGU O., 1995b. Influence of meristem-tip size and location on morphological development in *Dioscorea cayenensis-D. rotundata* complex "Grosse Caille" and one genotype of *D. praehensilis*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 42 : 215-218.
- MALAUURIE B., TROUSLOT M.F., 1995. Les ignames. In Biotechnologies végétales Bv9d. Cned-Aupelf-Uref, chapitre 10 : 49-77.
- MALAUURIE B., TROUSLOT M.F., 1997. Cryopreservation of *in vitro* yam (*Dioscorea* sp.) apices by the encapsulation-dehydration technique for long term conservation. Cryo-Letters 18 : 68.
- MALAUURIE B., TROUSLOT M.F., ENGELMANN F., CHABRILLANGE N., 1998a. Effect of pretreatment conditions on the cryopreservation of *in vitro*-cultured yam (*Dioscorea alata* Brazo Fuerte and *D. bulbifera* "Nouméa Imboro" shoot apices by encapsulation-dehydration. Cryo-Letters 19 : 15-26.
- MALAUURIE B., TROUSLOT M.F., BERTHAUD J., CHABRILLANGE N., RECALT C., DUSSERT S., 1998b. The use of slow growth condition culture and cryopreservation in liquid nitrogen for medium and long term conservation and utilisation of *in vitro* yam (*Dioscorea* sp.) Germplasm. Proceedings of the workshop on conservation & utilisation of cassava, sweetpotato and yam germplasm in Sub-Saharan Africa. Nairobi, November 11 to 13, 1997 (*in press*).
- MANDAL B.B., CHANDEL K.P.S., DWIVEDI S., 1996. Cryopreservation of yam (*Dioscorea* spp.) shoot apices by encapsulation-dehydration. Cryo-Letters 17 : 165-174.
- MANTELL S.H., HAQUE S.Q., 1979. Disease free yams: their production, maintenance and performances. Caribbean Agricultural Research and Development Institute, Trinidad, Yam Virus Bull. 2, 22 p.
- MANTELL S.H., HUGO S.A., 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., HAQUE S.Q., WHITEHALL A.P., 1978. Clonal multiplication of *Dioscorea alata* L. and *Dioscorea rotundata* Poir. yams by tissue culture. J. Hort. Sci. 53 (2) : 95-98.
- MANTELL S.H., HAQUE S.Q., WHITEHALL A.P., 1980. Apical meristem tip culture for eradication of flexuous rod viruses in yams (*Dioscorea alata*). Trop. Pest Mgt. 26 (2) : 170-179.
- MANTELL, S.H., 1993. Integrated use of micropropagation and conventional propagation techniques for production of certified seed tubers of tropical yams (*Dioscorea* spp.). In Adapted propagation techniques for commercial crops of the tropics. Proceedings of the southeast Asian Regional workshop on propagation techniques for commercial crops of the tropics, Ho Chi Minh City, Vietnam, 7-12 February 1993. IFS, International Foundation for Sciences, p. 66-93.
- MARCHOUX G., 1980. Pathologie des ignames en Guadeloupe, maladies virales. L'igname. Séminaire international de Pointe-à-Pitre du 28-7 au 2-8-1980. Les colloques de l'Inra, Inra, Paris, France, p. 93-105.
- MARTIN F.W., DEGRAS L., 1978. Tropical yams and their potential. Part 6. Minor cultivated *Dioscorea* species. USDA agriculture handbook n° 538, 23 p.
- MARTIN F.W., RHODES A.M., 1978. The relationship of *Dioscorea cayenensis* and *D. rotundata*. Trop. Agric., Trin. 55 : 193-206.
- MATHEWS R.E.F. (ed.), 1993. Diagnosis of Plant Virus Diseases. CRC Press, London, UK.
- MATSUBARA S., ISHIHARA M., 1988. Production and vegetative propagation of virus-free plants of *Dioscorea* species. Scientific Reports of the Faculty of Agriculture, Okayama University, Japan, n° 72, p. 19-26.
- MIEGE J., 1952. Contribution à l'étude systématique des *Dioscorea* Ouest africaines. Thèse, Paris, France, 266 p.
- MIEGE J., 1954. Nombres chromosomiques et répartition géographique de quelques plantes tropicales et équatoriales. Rev. Cyt. et Biol. Végétales 15 (4) : 327-344.
- MIEGE J., 1982. Etude chimiotaxonomique de dix cultivars de Côte d'Ivoire relevant du complexe *Dioscorea cayenensis-D. rotundata*. Yams-Ignames, J. MIEGE, S.N. LYONGA, (Ed.). Claredon Press, Oxford, UK, 197-231.
- MIGLIORI A., CADILHAC B., 1976. Contribution à l'étude de la maladie du virus de l'igname *Dioscorea*

- trifida* en Guadeloupe. Ann. Phytopathol. 8 (1) : 73-78.
- MIGNOUNA H.D., CAMARA F., KOUROUMA S., 1997. Collecting germplasm of wild and cultivated yam (*Dioscorea* spp.) in Guinea. Plant Genet. Resour. Newsl. 109 : 15-16.
- MIKAMI T., 1984. Virus-free plant propagation through meristem-tip culture of Japanese yam and garlic. Research Journal of Food and Agriculture 7 (4) : 17-20.
- MITCHELL S.A., ASEMOTA H.N., AHMAD M.H., 1995a. Effects of explant source, culture medium strength and growth regulators on the *in vitro* propagation of three Jamaican yams (*Dioscorea cayenensis*, *D. trifida* and *D. rotundata*). J. Sci. Food Agric. 67 : 173-180.
- MITCHELL S.A., ASEMOTA H.N., AHMAD M.H., 1995b. Factors affecting the *in vitro* establishment of Jamaican yams (*Dioscorea* spp.) from nodal pieces. J. Sci. Food Agric. 67 : 541-550.
- MUMFORD R.A., SEAL S.E., 1997. Detection and characterization of yam potyviruses. In Yam viruses, Annual Collaborators Meeting, IITA-JIC-NRI, Gatsby-funded Biotechnology Projects, 7-9 February 1997. IITA, Ibadan, Nigeria, Extended Abstracts, p. 14-15.
- MUZAC-TUCKER I., AHMAD M.H., 1995. Rapid detection of polymorphism in yams (*Dioscorea* sp.) through amplification by polymerase chain reaction and rDNA variation. J. Sci. Food Agric. 67 : 303-307.
- NAGASAWA A., FINER J.J., 1989. Plant regeneration from embryonic suspension cultures of chinese yam (*Dioscorea opposita* Thumb.). Plant Science 60 : 263-271.
- NG S.Y.C., 1988. *In vitro* tuberization in white yam (*Dioscorea rotundata* Poir.). Plant Cell Tiss. Org. Cult. 14 : 121-128.
- NG S.Y.C., 1991. *In vitro* conservation and distribution of root and tuber crop germplasm. In Crop Genetic Resources of Africa, Vol. II, N.Q. NG, P. PERRINO, F. ATTERE & H. ZEDAN (Ed). (2.3) : 95-106.
- NG S.Y.C., 1992. Tissue culture of root and tuber crops at IITA. In Biotechnology: enhancing research on tropical crops in Africa, G. THOTTAPPILLY, D.R. MONTI, D.R. MOHAN RAJ, A.W. MOORE (Eds). CTA/IITA, Ibadan, Nigeria, p. 135-141.
- NG S.Y., HAHN S.K., 1985. Application of tissue culture to tuber crops at IITA. In Biotechnology in international research. IRRI, Manila, Philippines, p. 29-40.
- NG S.Y.C., HUGHES D'A., THOTTAPPILLY G., 1997. Proposal for dissemination of *D. alata* germplasm. In Yam viruses, Annual Collaborators Meeting, IITA-JIC-NRI, Gatsby-funded Biotechnology Projects, 7-9 February 1997. Extended Abstracts, IITA, Ibadan, Nigeria, p. 18-19.
- NGALA O.Y., 1989. Effects of chemical treatment in the elimination of contaminants from yam (*Dioscorea rotundata* Poir. cv. bonakanda) tissue culture. Mémoire d'ingénieur agronome. Cuds, Dschang, Cameroun, 128 p.
- NIWATA E., MATSUNAKA K., FUKUSHI K., 1983. Clonal propagation of chinese yam (*Dioscorea opposita*) from shoot meristem tips. Tohoku Agricultural Research 33 : 255-256.
- OKOLI O.O., 1991. Yam germplasm diversity, uses and prospects for crop improvement in Africa. In Crop genetic resources of Africa. Vol. II. Proceedings of an international symposium, Ibadan, Nigeria, 17-20 October 1988 Vol. II, N.Q. NG, P. PERRINO, F. ATTERE & H. ZEDAN (Eds). IITA, Ibadan, Nigeria, p. 109-117.
- ONWUEME I.C., 1978. The tropical tuber crops. Yams, Cassava, Sweet potato, Cocoyams. J. Wiley & sons, Chichester, UK, p. 3-106.
- OOSAWA K., KURIYAMA T., SUGAHARA Y., 1981. Clonal multiplication of vegetatively propagated crops through tissue culture, 1. Effective balance of auxin and cytokinin in the medium and suitable explant part for mass production of plantlets in strawberry, garlic, scallion, Welsh onion, yam and taro. Bulletin of the Vegetable and Ornamental Crops Research Station. Series A. 9 : 1-46.
- ORSTOM, 1976. Rapport du service d'expérimentation biologique (Seb). Orstom, Adiopodoumé, Côte d'Ivoire.
- PATHIRANA R., 1991. Achievements and prospects of *in vitro* methods for conservation of plant genetic resources. In Conservation of plant genetic resources through *in vitro* methods. Proceedings of the MNCPGR/CSC international workshop on tissue culture for the conservation of biodiversity and plant genetic resources held in Kuala Lumpur, Malaysia, 28-31 May 1990, A.H. ZAKRI, M.N. NORMAN, A.G.A. KARIM & M.T. SENAWI (Eds). MNCPGR, Kuala Lumpur, Malaysia, p. 213-230.
- PEDRALLI G., 1994. Collecting wild relatives of yam (*Dioscorea* spp.) in the Espinhaço range, Brazil. Plant Genet. Resour. Newsl. 97 : 51.
- PERRINO P., 1992. Plant genetic resources and their conservation. In Biotechnology: enhancing research on tropical crops in Africa, G. THOTTAPPILLY, D.R. MONTI, D.R. MOHAN RAJ, A.W. MOORE (Eds). CTA/IITA, Ibadan, Nigeria, p. 99-104.
- PHILLIPS S., BRUNT A.A., 1988. *Dioscorea* latent virus. AAB Descriptions of Plant Viruses, n° 335. Association of Applied Biologists, Wellesbourne.
- POLGE C.A., SMITH A.V., PARKES A.S., 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. Nature 164 : 666.

- POPOV A.S., VOLKOVA L.A., BUTENKO R.G., 1984. Significance of improved freezing program to organize a plant cell and meristem cryobank. *In* Plant tissue and cell culture application to crop improvement, F.J. NOVAK, L. HAVEL & J. DOLEZEL (Eds). Czechoslovak Academy of Sciences, Prague, Czechoslovakia, p. 561-562.
- POPOV A.S., VOLKOVA L.A., 1994. Cryopreservation and some characteristics of *Dioscorea deltoidea* cell cultures in the vitamin-free medium. *Russian Journal of Plant Physiol.* 41 (6) : 815-820.
- POPOV A.S., FEDOROVSKII D.N., 1992. Injuries to the plasmalemma of *Dioscorea* cells cultured *in vitro* incurred in the process of their cryopreservation. *Soviet Plant Physiology* 39 (2-2) : 211-216.
- PORTH A., LESEMANN D.-E., VETTEN H.J., 1987. Characterization of potyvirus isolates from West Africa yams (*Dioscorea* spp.). *J. Phytopathol.* 120 : 166-183.
- RAMSER J., LOPEZ-PERALTA C., WETZEL R., WEISING K., KAHL G., 1996. Genomic variation and relationships in aerial yam (*Dioscorea bulbifera* L.) detected by random amplified polymorphic DNA. *Genome* 39 : 17-25.
- RAO V.R., RILEY K.W., 1994. The use of biotechnology for conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Gen. Res. Newsletter* 97 : 3-19.
- SADIK S., 1977. A review of sexual propagation for yam improvement. *Proceedings of the 4th Symposium of the International Society for Tropical Root Crops*, p. 40-44.
- SAKAI A., 1984. Cryopreservation of apical meristems. *In* *Horticultural Reviews*, J. JANICK (Ed). Purdue University, p. 357-372.
- SALAZAR S.S., FERNANDEZ R.Z.Z., 1988. Thermo-therapy, shoot tip culture, axillary bud proliferation and plant regeneration in yam (*Dioscorea trifida* L.). *In* VIIth Symposium of the International Society for Tropical Root Crops, Gosier (Guadeloupe), 1-6 July 1985. *Les colloques de l'Inra, Inra, Paris*, p. 439-445.
- SALEIL V., 1986. Développement *in vitro* des apex isolés à partir de deux espèces d'igname : *D. alata* et *D. trifida*. Thèse de 3^e cycle. Ustl, Montpellier, France, 149 p.
- SALEIL V., DEGRAS L., JONARD R., 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.
- SCHAFFER W., GORZ A., KAHL G., 1987. T-DNA integration and expression in a monocot crop plant after induction of *Agrobacterium*. *Nature* 327 : 529-532.
- SENGUPTA J., MITRA G.C., SHARMA A.K., 1984. Organogenesis and tuberization in cultures of *Dioscorea floribunda*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 3 : 325-331.
- SHIRAKO Y., EHARA Y., 1986. Rapid diagnosis of chinese yam necrotic mosaic virus infection by electro-blot immunoassay. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 52 : 453-459.
- STANWOOD P.C., BASS L.N., 1981. Seed germplasm preservation using liquid nitrogen. *Seed Sci. & Technol.* 9 : 423-437.
- TANAKA S., 1977. Chinese yam *Dioscorea opposita* Thunb. in Japan. *Tropical Root and Tuber Crops Newsletter* 10 : 4-5.
- TANNOURY M., RALAMBOSSA J., KAMINSKE M., DEREUDDRE J., 1991. Cryoconservation par vitrification d'apex enrobés d'œillets (*Dianthus caryophyllus* L.) cultivés *in vitro*. *C.R. Acad. Sc. Paris, Série III* 313 : 633-638.
- TERAUCHI R., CHIKALEKE V.A., THOTTAPPILLY G., HAHN S.K., 1993. Origin and phylogeny of Guinea yams as revealed by RFLP analysis of chloroplast DNA and nuclear ribosomal DNA. *IITA-Research* 6 : 1-6.
- THOUVENEL J.-C., DUMONT R., 1990. Perte de rendement de l'igname infectée par le virus de la mosaïque en Côte d'Ivoire. *Agron. Trop.*, p. 45.
- THOUVENEL J.-C., FAUQUET C., 1979. Yam mosaic, a new potyvirus infecting *Dioscorea cayenensis* in the Ivory Coast. *Ann. appl. Biol.* 93 : 279-283.
- THOUVENEL J.-C., FAUQUET C., 1986. Yam mosaic virus, n° 314. Description of plant viruses. Association of Applied Biologists. December 1986. Kew, Surrey, UK.
- TOR M., MANTELL S. H., AINSWORTH C., 1992. Endophytic bacteria expressing beta-glucuronidase cause false positives in transformation of *Dioscorea* species. *Plant Cell Reports* 11 (9) : 452-456.
- TOR M., AINSWORTH C., MANTELL S.H., 1993. Stable transformation of the food yam *Dioscorea alata* L. by particle bombardement. *Plant Cell Reports* 12 (7-8) : 468-473.
- TROUSLOT M.-F., 1985. Analyse de la croissance et morphogénèse de l'igname *Dioscorea* complexe *D. cayenensis-D. rotundata*. Orstom, Collection Travaux et Documents n° 185, 370 p.
- TROUSLOT M.-F., CHAMPAGNAT M., TORT M., LOISEAU M., ERAUD C., 1993. Developmental morphology of seedlings of *Dioscorea cayenensis-D. rotundata* complex. *Phytomorphology* 43 : 49-57.
- TWYFORD C., MANTELL S.H., 1990. Cultural conditions required for cell division, callus induction and early stages of somatic embryogenesis in protoplast and tissue explants of *Dioscorea alata* L. cv. Oriental. *Proc 8th Symp November 1988, Bangkok. ISTRC, Bangkok, Thailand*, p. 624.

- TWYFORD C., MANTELL S.H., 1996. Production of somatic embryos and plantlets from root cells of the Greater Yam. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 46 : 17-26.
- TWYFORD C.T., VIANA A.M., JAMES A.C., MANTELL S.H., 1990. Characterization of species and vegetative clones of *Dioscorea* food yams using isoelectric focussing of peroxidase and phosphatase isoenzymes. *Trop. Agric.* 67 : 337-341.
- URAGAMI A., SAKAI A., NAGAI M., TAKAHASHI T., 1989. Survival of cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* cryopreserved by vitrification. *Plant Cell Reports* 8 : 418-421.
- URAGAMI A., 1993. Cryopreservation of cultured cells and organs of vegetables. In Reprint from JICA GRP REF n° 6, 111-135.
- VIANA A.M., MANTELL S.H., 1989. Callus induction and plant regeneration from excised zygotic embryos of the seed-propagated yams *Dioscorea composita* Hemsc. and *D. cayenensis* Lam. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 16 : 113-122.
- WAITT A.W., 1963. Yams, *Dioscorea* Species. *Field Crop Abstract* 16 (3) : 145-157.
- WITHERS L.A., 1991. Crop strategies for roots and tubers : potato- A model for refinement, Yam, a problem for development. In *Workshop on Conservation of Plant Genetic Resources*, BECKER B. (Ed). ATSAF/IBPGR, Bonn., p. 11-14.
- WITHERS L.A., WHEELANS S.K., 1987. Database search on *Dioscorea* spp., *Ipomea* spp., *Manihot* spp., *Solanum tuberosum*, *Tropaeolum* spp. or *Ullucus* spp. Date of survey: 1985, search result: 119 records. IBPGR *in vitro* Conservation Databases, Univ. Nottingham, School of Agriculture, UK., 50 p.
- XINHUA F., QUIQUAN S., XINGCUN, J., 1986. Transformation of the monocot *Dioscorea opposita* using *Agrobacterium tumefaciens*. *Genetic Manipulation Crops Newsletter* 2 : 52-59.
- YAZAWA S., ASAHIRA T., 1979. Bulbil formation of *Dioscorea opposita* cultured *in vitro*. *Memoir of the College of Agriculture, Kyoto University. Crop Science Series* 113 : 39-51.
- ZOUNDJIHEKPON J., *et al.*, 1997. Gestion des ressources génétiques des ignames africaines et conservation *in situ*. In *Actes du colloque Gestion des ressources génétiques des plantes en Afrique des savanes*. Bamako, Mali, 24-28 février 1997. IER-BRG-Solagral, Paris, France, 121-128.
- ZOUNDJIHEKPON J., TIO-TOURE B., 1992. Collecting wild yams in West Africa. Benin, Cameroon and Côte d'Ivoire. FAO/IBPGR, *Plant Genet. Resour. Newsl.*90 : 39-41.

Malaurie Bernard, Trouslot Marie-France, Berthaud Julien.
(1997)

Conservation et échange de germoplasme chez les ignames
(*Dioscorea* spp.)

In : Berthaud Julien (ed.), Bricas N. (ed.), Marchand J.L. (ed.)
L'igname, plante séculaire et culture d'avenir = Yam, old plant
and crop for the future

Montpellier : CIRAD, 135-161. L'igname, Plante Séculaire et
Culture d'Avenir : Séminaire International, Montpellier (FRA),
1997/06/03-06. ISBN 2-87614-313-5