

I. INTRODUCTION

L'igname est une importante plante à tubercule cultivée dans de nombreux pays à travers le monde et elle tient la deuxième place parmi les plantes à racines et tubercules la plus produite derrière le manioc.

À Madagascar elle est une plante introduite, depuis longtemps, par les premiers migrants qui ont peuplé l'île et elle y était considérée comme un aliment de base. En effet, sa culture s'était propagée dans toute l'île en fonction de la migration de ces populations. Plus tard, l'introduction d'autres plantes alimentaires faciles à cultiver comme la patate douce, le manioc, le taro, ..., a découragé les gens à produire de l'igname car c'est une plante exigeante en matière nutritive et demande une quantité de travail assez importante. Elle est devenue un aliment négligé et même méconnue par de nombreux malgaches. De ce fait, l'igname n'est utilisée que pendant la période de soudure alimentaire pendant laquelle le riz est en manque.

Madagascar présente une grande biodiversité d'igname puisqu'il possède une quarantaine d'espèces, c'est environ le dixième de toutes les espèces d'igname dans le monde. La grande majorité de ces ignames sont des plantes sauvages avec un taux d'endémisme élevé et trois espèces seulement sont cultivées à savoir *Dioscorea. alata*, *D. esculenta* et *D. bulbifera*. Ces ignames sauvages sont toujours l'objet de nombreuses recherches à Madagascar et peu ou pas de travaux sont effectués sur les ignames cultivées contrairement à celles des pays producteurs comme le Nigéria, Ghana, Côte d'Ivoire et les pays dans les Pacifiques.

D'autre part, face au problème de sécurité alimentaire et à la destruction de l'habitat des ignames sauvages endémiques à cause d'une exploitation irrationnelle de celles-ci, les organismes gouvernementaux et non gouvernementaux se sont engagés à promouvoir la diffusion de la culture des ignames cultivées à Madagascar notamment *D. alata*. L'objectif étant de préserver les ignames endémiques sauvages et d'avoir un régime alimentaire varié. De ce fait, il est indispensable de faire une étude génétique de ces ignames cultivées afin de connaître et de choisir les variétés les plus intéressantes pour la promotion et de pouvoir valoriser ce produit. C'est donc l'objectif de cette étude.

II. OBJECTIF

Cette partie a pour objectif de décrire de manière approfondie la diversité des ignames cultivées à Madagascar en étudiant plus en détail les caractères morphologiques sur la base de

critères scientifiques, en déterminant les caractères cytologiques et génétiques. Cette étude permettra également de retracer l'origine géographique des ignames cultivées de Madagascar en les comparant à des ignames provenant des régions des premières domestications de l'igname ou des régions dont seraient originaires les premières communautés qui ont migré à Madagascar. Une meilleure connaissance de la ploidie, de l'étendue de la diversité des ignames et de la structure des variétés sont les principales attentes de cette étude et permettraient d'envisager la stratégie la plus adaptée pour promouvoir la culture de ces ignames auprès des populations.

Pour atteindre ces objectifs, les hypothèses suivantes ont été avancées :

H1 : Les ignames cultivées à Madagascar, à travers les noms et les différentes formes constatées au niveau de cette plante, contiennent plusieurs variétés et certaines d'entre elles pourraient contribuer à la diversification et à la sécurisation alimentaire des malgaches.

H2 : La connaissance de l'origine géographique des ignames cultivées malgaches permettrait de tracer l'origine des premiers migrants à Madagascar supposés comme origine des malgaches.

III. MATERIELS ET METHODES

III.1 Matériels

III.1.1 Les zones de collectes

Les zones de collecte, pour cette étude, se localisent entre 12° 39' 28.8" et 23° 21' 18.6" de latitude et de 043° 34' 30.7" et 048° 03' 02.7" de longitude et à une altitude comprise entre 7m et 1260m au-dessus de la mer (Carte 11). Elles se situent :

- 1- aux alentours de la région de Diego-Suarez pour la partie Nord avec 25 localités,
- 2- le long de l'axe Antananarivo - Fianarantsoa et entre Ranomafana et le corridor Fandriana-Vondrozo pour les Hauts Plateaux avec 19 localités,
- 3- sur l'axe Moramanga-Tamatave et Fénérive-Est ainsi que dans la région de Vatomandry pour les parties Est et Nord-Est avec 33 localités,
- 4- dans les régions de Manakara, Farafangana et Vangaindrano pour la partie Sud-Est avec 18 localités,
- 5- dans les régions de Morondava et Ankarafantsika pour la partie Ouest avec 11 localités,
- 6- et enfin le long de l'axe Fianarantsoa-Tuléar pour la partie Sud-Ouest avec 15 localités.



Carte 11: Sites de collectes des accessions pour l'analyse génétique

III. 1.2 La collecte

La collecte des matériels végétaux a été réalisée soit dans les jardins de case des paysans, soit dans les champs où ils sont mélangés à d'autres cultures comme le manioc, le caféier, le jacquier, etc., soit dans des jachères.

Toutes les parties de l'igname ont fait l'objet de collecte. En effet, des feuilles pour les analyses génétiques et virales, des tubercules pour la mise en place d'une collection vivante et des spécimens d'herbiers pour les études morphologiques ont été récoltés.

Pour la collecte des données, les données passeport (voir glossaire) de chaque accession ont été enregistrées, c'est-à-dire toutes les informations concernant chacune des accessions (voir glossaire) à savoir les noms locaux, les noms scientifiques, le numéro de récolte, les coordonnées géographiques, la localité et la date de récolte, le nom du paysan propriétaire de l'accession, l'état végétatif de l'accession, la partie collectée de la plante,...(Annexe I).

III.1.3 Mise en place d'une collection vivante

Les tubercules des accessions collectées dans chaque site ont été utilisés pour la mise en place d'une collection vivante à l'université d'Antananarivo. Cette collection nous a permis d'avoir des informations qui ont manqué lors de nos investigations sur terrain et de nous assurer également de la disponibilité des feuilles pour les analyses cytogénétiques et virales.

III.1.4 Les accessions

Trois espèces cultivées d'ignames ont été étudiées à savoir *Dioscorea alata*, *D. esculenta* et *D. bulbifera*. Cette dernière n'est pas cultivée, de nos jours, à Madagascar mais elle se trouve à l'état spontané dans la nature.

Dans les 91 sites de collectes prospectés, au total 322 accessions collectées ont été utilisées pour les analyses (Tableau 14). Le plus grand nombre d'accessions et d'espèces d'ignames, avec une proportion de 35%, a été constaté sur la côte Est étant donné que cette zone répond le plus aux conditions climatique et agronomique dans lesquelles les ignames se développent.

Tableau 14: Nombre d'accessions collectées par zone géographique

	<i>D. alata</i>	<i>D. esculenta</i>	<i>D. bulbifera</i>	Nombre d'accessions	Pourcentage des accessions (%)
HAUTS PLATEAUX	13	0	6	19	5.90
EST	79	24	9	112	34.78
NORD	58	0	1	59	18.32
OUEST	18	0	0	18	5.59
SUD	53	0	2	55	17.70
SUD EST	50	5	2	57	17.70
TOTAL	273	29	20	322	100

L'analyse de la diversité morphologique a été réalisée à partir des informations obtenues sur les spécimens d'herbier, les observations faites sur les terrains ainsi que sur la collection vivante. Cette dernière a été installée à partir des 75 accessions qui présentaient des tubercules. La collection vivante a permis également le prélèvement de feuilles pour les analyses génétique et virale selon les besoins.

La détermination du nombre de chromosomes a été réalisée dans le laboratoire « Amélioration Génétique des Espèces à Multiplication Végétative » du CIRAD Montpellier. Pour ce faire, des racines en croissance avec un apex intact ont été utilisées d'où la nécessité de disposer de matériel frais: Neuf tubercules d'ignames représentant la diversité morphologique observée ont été amenés à Montpellier et ont été plantés en pot dans la serre. Parmi ces tubercules, 7 ont pu germer au moment du prélèvement des racines.

Enfin, des feuilles de *D. alata* de Madagascar au nombre de 69 accessions ont été utilisées pour le génotypage et 11 autres accessions de *D. alata* du Vanuatu (dans le Pacifique) ont servi comme « outgroup » (Tableau 15). MALAPA (2005) a classé les accessions de Vanuatu en 36 convars (M1 à M36) ou groupements des accessions similaires au niveau des appareils aériens. Ces regroupements ont été faits d'une manière intuitive et ne considère pas les caractères du tubercule ni la couleur pourpre. Ainsi, les 11 accessions « outgroup » appartiennent aux convars M1 et M4 (Annexe II).

III.2 Méthodes

III.2.1 Caractérisation de la diversité morphologique

L'Analyse factorielle des correspondances (AFC) est une méthode d'analyse descriptive à multiple dimensions employée pour traiter des données qualitatives (BENZECRI, 1976). Elle a été effectuée à partir d'un tableau de contingence croisant les descripteurs agromorphologiques avec les cultivars. Elle permet de regrouper et de caractériser les cultivars qui se ressemblent le plus sur le plan morphologie. Les variables utilisées ont été établies à partir des descripteurs standardisés de l'IPGRI/IITA (1997) pour l'igname. Ainsi, 27 descripteurs (Tableau 16) ont été utilisés pour la construction du tableau de contingence dont huit (8) se rapportent à la caractérisation de la feuille, sept (7) à celle de la tige, un (1) à celle des bulbilles et 11 à celle du tubercule. Le logiciel R a été utilisé pour le traitement des données et la réalisation de l'AFC.

Tableau 15: Liste des accessions utilisées pour le génotypage

Nom vernaculaire	Numéro d'herbier	Région
Ovy Taretra	259a4	Centre-sud
Ovy tanty	57slash3	Centre
Florido	Florido	*n.d
Ovy Toko	i260	Ouest
Ovy lalaina	i429	Est
Ovy lohandambo	i431	Est
Ovy lava	i432	Est
i433	i433	Est
Ovy tanty	i435	Centre
Ka5	Ka5	Vanuatu
Ovy vazaha	MT238	Est
Ovy lalaina	MT276	Est
Ovibe	MT303	Est
Ovy fotsy	MT330	Nord
Majôla maroanaka	MT332	Nord
Majôla maroanaka	MT334	Nord
Ovy lava	MT335	Est
Majôla	MT337	Nord
Majôla	MT339	Nord
Majôla	MT340	Nord
Majôla	MT341	Nord
Majôla	MT345	Nord
Majôla	MT346	Nord
Majôla	MT347	Nord
Majôla	MT349	Nord
Majôla	MT350	Nord
Majôla	MT355	Nord
Majôla	MT364	Nord
Majôla	MT365	Nord
Majôla	MT367a	Nord
Majôla	MT367b	Nord
Majôla	MT370	Nord
Majôla	MT371	Nord
Majôla	MT372	Nord

*n .d : non déterminé

Nom vernaculaire	Numéro d'herbier	Région
Majôla	MT374	Nord
Majôla	MT376	Nord
Majôla	MT377	Nord
Majôla	MT378	Nord
Majôla	MT379	Nord
Majôla	MT381	Nord
Majôla	MT382	Nord
Majôla	MT385	Nord
Majôla	MT386	Nord
Ovy bleu	MT390	Est
Ovy bleu	MT391	Est
Ovy fotsy	MT406	Est
Ovy lalaina	MT416	Est
Ovy lalaina	MT427	Est
Ovy lalaina	MT429	Est
Ovy lalaina	MT434	Est
Bemako	MT464	Sud
Bemako	MT467	Sud
Revoroke	MT485	Sud
Ovy lava	MT498	Sud
Ovy tanty	MT506	Centre
Ovy Bodoa	RAV016	Centre-sud
Ovy voay	RAV034	Centre-sud
Ovy lava	RAV040	Centre-sud
Ovy voay	RAV044	Centre-sud
Ovy voay	RLH72	Ouest
Tangôlina fotsy	TGLNFotsy	Nord
Vu24	Vu24	Vanuatu
Vu3736	Vu3736	Vanuatu
Vu402	Vu402	Vanuatu
Vu47	Vu47	Vanuatu
Vu564	Vu564	Vanuatu
Vu564/i430	Vu564/i430	Vanuatu
Vu639	Vu639	Vanuatu
Vu678	Vu678	Vanuatu

Tableau 16: Modalité des descripteurs utilisés

	DESCRIPTEUR	MODALITE
T I G E	Hauteur (Htr)	(1) >6m; (2) < 6m
	Couleur tige (Ctg)	(1) Vert; (2) vert jaunâtre; (3) vert violacé; (4) brun; (5) violet
	Ailes (Ail)	(0) Absent; (1) vert; (2) vert à bord violacé; (3) violet
	Pubescence (Pubt)	(0) Absent; (1) présent
	Spinescence (Spi)	(0) Absent; (1) présent
	Sens d'enroulement (Enr)	(1) Gauche; (2) droit
	Section transversale (Sct)	(1) Quadrangulaire; (2) ronde; (3) hexagone; (4) octogone
F E U I L L E	Forme (Frmf)	(1) Cordé; (2) cordée allongée; (3) cordé élargi; (4) sagittée
	Couleur limbe (Cli)	(1) Vert clair; (2) vert foncé; (3) vert violacé; (4) vert jaunâtre
	Couleur pétiole (CLp)	(0) Blanchâtre; (1) vert; (2) vert à bord violet; (3) violet
	Pubescence (Pubf)	(0) Absent; (1) présent
	Epine (Epnf)	(0) Absent; (1) présent
	Couleur base pétiole (Cbp)	(1) Violet; (2) vert
	Texture (Txtf)	(1) Souple; (2) coriace
	Distance entre les lobes (Dsl)	(1) Faible; (2) moyen; (3) très éloigné
T U B E R C U L E	Forme (Frmt)	(1) Arrondie; (2) ovale oblongue; (3) cylindrique; (4) irrégulier; (5) oblongue; (6) aplati
	Développement (Dvp)	(1) en profondeur; (2) superficiel
	Nombre (Nbr)	(1) 1; (2) >5; (3) ≤5
	Taille (Tai)	(1) Petit; (2) moyen; (3) gros
	Racine armée (Rar)	(0) Absent; (1) présent
	Couleur de la peau (Cpot)	(1) Marron clair; (2) marron foncé; (3) violet clair; (4) violet foncé; (5) blanc cassé
	Couleur de la chair (Ccht)	(1) Blanc; (2) blanc-cassé; (3) jaunâtre; (4) violet; (5) blanc violet
	Uniformité de couleur de la chair (Unf)	(0) Absent; (1) présent
	Longueur (Lngt)	(1) 0 à 40 cm; (2) >40 cm
	Couleur sous l'écorce (Csé)	(1) Blanc; (2) jaunâtre; (3) rouge violacé; (4) violet
	Oxydation après coupe (Oxy)	(0) Absent; (1) présent
BULBILLE	Bulbille (Bul)	(0) Absent; (1) présent;

III.2.2 Comptage des chromosomes

Le comptage des chromosomes a été réalisé sur des cellules en division, au stade métaphase de la mitose. La technique utilisée consiste à éclater le protoplaste afin de libérer les chromosomes (D'HONT et *al.*, 1996; MALAPA, 2005). Ces derniers ont été étalés et colorés avec une coloration DAPI (4',6'-diamidino-2-phényl-indole) avant d'être observés et comptés.

III.2.2.1 Prélèvement des racines

Le prélèvement des racines d'igname s'est fait au mois de novembre vers la fin de la matinée, entre 11 et 12 heures, un jour ensoleillé pour avoir un bon index mitotique. Et comme l'igname est une plante à tubercule, il est recommandé de faire les prélèvements avant le phénomène de tubérisation pour éviter la présence en quantité importante de réserves (en particulier des amyloplastés) qui peuvent gêner le comptage des chromosomes.

Les jeunes racines dont l'apex est bien visible ont été prélevées. Les morceaux de racines ont ensuite été mis dans une solution de PBS 1X /Bisulfite de Sodium 0,5 % pour éviter le brunissement. La fixation a été faite dans l'hydroxy-quinoléine 0,4 % pendant 4 heures à température ambiante. Cette étape permet de bloquer la division cellulaire en inhibant la formation des fuseaux achromatiques. Les racines ont alors été rincées, 3 fois, avec la solution (3 :1) [une solution fixatrice à 3 volumes d'éthanol et 1 volume d'acide acétique], puis incubées une nuit dans cette solution. Le lendemain, elles ont été rincées de nouveau avec la même solution et puis gardées 48h à 4°C avant de les mettre dans une solution d'éthanol de 70 %. Ces racines peuvent se conserver plusieurs mois à 4°C.

III.2.2.2 Coloration

Elle consiste à colorer les chromosomes pour les mettre en évidence et pour rendre facile l'observation au microscope. La coloration a été faite après avoir repéré les noyaux en métaphase. Le DAPI a été ainsi appliqué (2 gouttes) sur la lame pendant 5mn et à l'abri de la lumière si possible car le colorant est Photosensible. Ensuite, couvrir la lame avec une lamelle pour répandre le colorant et puis fixer la lamelle avec du vernis à ongle afin de l'empêcher de se déplacer.

III.2.2.3 Observation microscopique

C'est avec un microscope à épifluorescence Leica DM/RAX2 (Heidelberg Allemagne) muni d'une caméra refroidie «ORCA-ER C4742-80» Hamamatsu et reliée à un ordinateur que

le repérage des métaphases a été réalisé. Le logiciel Volocity (Perkin Helmer) a été utilisé pour observer, repérer la position des chromosomes sur la lame et acquérir les images. Les chromosomes ont ensuite été comptés à l'aide du logiciel image J.

III.2.2.4 Evaluation du nombre de ploïdie

Plusieurs études ont été déjà réalisées en ce qui concerne le niveau de ploïdie de *D. alata*. Les travaux récents de ARNAU et *al.* (2009) et NEMORIN et *al.* (2013) ont montré que le nombre de base chromosomique de *D. alata* est de $x=20$ et que les niveaux de ploïdie trouvés sont di-, tri-, tétraploïde ou $2n= 2x, 3x$ et $4x$ respectivement. En effet, $x=20$ est adopté comme nombre de base chromosomique de *D. alata* pour cette étude.

III.2.3 Diversité moléculaire

III.2.3.1 Extraction d'ADN nucléaire

Elle a été réalisée selon un protocole mis au point par RISTERUCCI et *al.* (2000). Pour chaque accession, 500mg de feuilles ont été broyées dans de l'azote liquide. Puis 5ml de tampon d'extraction préchauffé à 74°C sont ajoutés au broyat. Après, il est incubé pendant 20 mn à 74°C. Ensuite 5ml de chloroforme isoamyl alcool sont rajoutées. Le mélange est centrifugé à 9000g pendant 15mn. Le surnageant constitué de la phase aqueuse est récupéré. Cette opération est réalisée deux fois pour pouvoir obtenir un ADN nucléaire de très bonne qualité. L'ADN est ensuite précipité par ajout de 0.6% de volume d'isopropanol. Les pelotes d'ADN sont précipitées après centrifugation à 3000g pendant 10mn. L'ADN est séché au Speed-Vacuum. Il est ensuite repris dans 400µl de Tris-EDTA durant toute une nuit avant de les conserver à -20°C.

III.2.3.2 Génotypage avec les marqueurs microsatellites

Cette technique est basée sur la détermination de la variation de la longueur des répétitions des motifs microsatellites. Les marqueurs microsatellites sont co-dominants et très polymorphes d'où le choix de cette technique pour la caractérisation de la diversité des ignames cultivées à Madagascar.

a- L'amplification

L'amplification a été réalisée à l'aide de la technique PCR en utilisant 10 marqueurs microsatellites développés par TOSTAIN et *al.* (2006). Elle consiste à amplifier les marqueurs microsatellites à partir des séquences d'ADN hybridées avec les amorces spécifiques et marquées par fluorescence.

Ainsi, chaque amplification a été effectuée dans 5 µl d'ADN avec un Mix PCR composé de 5 µl de tampon PCR à 1X, 200µM de dNTP, 0.50mM de MgCl₂, 0.08µM d'amorce sens marquée avec la queue M13, 0.10µM d'amorce antisens, 0.10µM de M13 marqué et de 0.10U/µl de Taq polymérase.

Les échantillons ont été randomisés dans des plaques à 96 puits. Ces plaques PCR ont été par la suite déposées dans le thermocycler Biometra et le programme est lancé selon les conditions propices aux différentes étapes de l'amplification telles que la dénaturation, l'hybridation et l'élongation.

L'amplification a été réalisée avec 5min de dénaturation à 95°C suivie de 10 cycles en touchdown allant de 56°C à 51°C pendant 1min pour l'hybridation, 45s de dénaturation à 94°C et 1min15s à 72°C pour l'élongation, suivie de 25 cycles qui fonctionnent de la même manière que le touchdown sauf que la température d'hybridation reste à 51°C, ce programme fini par une élongation finale à 72°C pendant 5min.

b- Génotypage

Le polymorphisme des couples d'amorces a été testé à l'aide d'un analyseur Li-Cor® 4300 (Photo 85). Une quantité de 2µl (dans le cas du marquage au fluorochrome excitable à 700nm) ou 3µl (dans le cas du marquage au fluorochrome excitable à 800nm) du produit d'amplification est mélangée à 10µl de mix contenant du Bleu urée permettant de rester en condition dénaturantes et des ADN témoins (Desmiling) permettant de tenir compte des déformations du gel au cours de l'électrophorèse lors de la lecture des gels. Le mélange est ensuite porté 3min à 95°C dans le thermocycleur pour la dénaturation puis stocké dans la glace pour garder l'ADN à l'état dénaturé. Un volume de 1,5 µl de ce produit est déposé dans chaque puits, la migration par électrophorèse est effectuée à 1500V sur un gel d'acrylamide à 6,5%. Les échantillons sont révélés à l'aide d'un laser qui émet un faisceau à une longueur d'onde de 700 et 800nm excitant ainsi le fluorochrome porté par la queue M13 des ADN amplifiés.



Photo 85 : Analyseur Li-Cor® 4300 (*a : emplacement du gel acrylamide ;
b : l'appareil relié à l'ordinateur*)