INSTITUT FRANCAIS DE RECEHRCHE SCIENTIFIQUE POUR LE DEVELOPPEMENT EN COOPERATION (ORSTOM)

CENTRE D'ADIOPODOUME B.P. V-51 ABIDJAN (Côte d'Ivoire)

Laboratoire de Biotechnologie UR. 7

QUELQUES ASPECTS DE LA MORPHOGENESE DES IGNAMES CULTIVEES IN VITRO

Alain PETERS

Mémoire de fin d'études de l'ISTOM INSTITUT SUPERIEUR DES TECHNIQUES D'OUTRE-MER 74ème Promotion

> Rapport de stage ORSTOM 10.07.86 - 12.12.86

\$84 VITRO PET



#200059014 200 FP1 Nor Nam

F 26.891 Ex1

MINISTERE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE Union-Discipline-Travail

MRS/DPR-4/S Nº ____/

AUTORISATION DE STAGE

LE MINISTRE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE DE COTE D'IVOIRE, soussigné, autorise Monsieur PETERS, étudiant en 3e Année à l'ISTOM en France, à effectuer un stage au Laboratoire de Biotechnologie du Centre ORSTOM d'Adiopodoumé.

Pendant son séjour, l'intéressé sera placé sous la tutelle scientifique du Centre ORSTOM d'Adiopodoumé.

A l'issue de son stage et sous une forme qui sera précisée par sa structure de tutelle scientifique, Monsieur PETERS devra communiquer à mes services (DPR) son rapport de stage.

Abidjan, le 15 335 1986

P/ Le Ministre et P.O.

Le Directeur de la Programmation, du Financement...,

pulita

D. COULIBALY

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

OFFICE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE OUTRE-MER

CENTRE D'ADIOPODOUMÉ

Boite Postale nº V-51 ABIDJAN République de Côte d'Ivoire Ivory Coset - Elfenbeinkûete

Tél. : (225) 33 24,45 - 37,44,45 - 37,41,70

ADIOPODOUMÉ, le 12 décembre 1986

ATTESTATION DE STAGE

Je soussigné, Jean LAUNAY Directeur du Centre CRSTOM d'Adiopodoumé, certifie que Monsieur PETERS Alain étudiant de l'Institut Supérieur Technique d'Outre Mer (ISTOM) a effectué un stage du 15 juillet au 12 décembre 1986 au laboratoire de Biotechnologie sur "la fusion protoplasmique de l'igname".

Jean LAUNAY
Directeur du Centre ORSIOM
d'ADIOPOLOUMB

REMERCIEMENTS

Ce stage a été effectué au laboratoire de Physiologie-Biotechnologie Végétales du Centre ORSTOM d'Adiopodoumé (BP. V-51) à ABIDJAN, en Côte d'Ivoire.

J'exprime toute ma gratitude à Monsieur Ministre de la Recherche Scientifique de Côte d'Ivoire, à Monsieur le Directeur du Centre ORSTOM d'Adiopodoumé pour m'avoir autorisé à effectuer ce stage.

Je remercie vivement Mr. H. CHRESTIN, Docteur d'Etat, qui a bien voulu m'accueillir au sein du laboratoire dont il est responsable. Je tiens à remercier tout particulièrement Mr. B. MALAURIE, responsable du programme Igname, Mme. M.F. TROUSLOT, Docteur d'Etat, pour la qualité de l'encadrement et les conseils qu'ils m'ont prodigués ainsi que pour leur grande disponibilité à mon égard durant tout le stage.

Je remercie également Mr. ZADI KOUBI P.; Mr. KASSE ZADI NESTOR et Mr. TOLLAH CHARLES qui m'ont permis d'aborder certaines techniques de culture "in vitro", pour l'aide qu'ils m'ont procuré et l'ensemble du personnel du laboratoire pour l'excellente ambiance de travail que j'y ai rencontré.

Je remercie enfin, Monsieur K. BONFOU et P. DAVID qui ont eu la gentillesse de dactylographier ce rapport avec beaucoup de compétence.

INTRODUCTION

1. GENERALITES

1.1. L'igname

- 1.1.1. Dioscorea alata
- 1.1.2. Dioscorea cayenensis
- 1.1.3. Dioscorea esculenta
- 1.1.4. Dioscorea dumetorum
- 1.1.5. Dioscorea bulbifera
- 1.1.6. Conclusion

1.2. La culture in vitro

- 1.2.1. Historique 1.2.2. Définitions
- 1.2.3. Aperçu des différentes techniques de

culture in vitro

1.2.4. Conclusion

2. MATERIEL ET METHODES

- 2.1. Le matériel végétal
- 2.2. Les milieux de culture
 - 2.2.1. Les éléments minéraux
 - 2.2.2. Les éléments organiques
 - 2.2.3. Les régulateurs de croissance
 - 2.2.4. Conditionnement des milieux

2.3. Techniques et conditions de culture

- 2.3.1. La micropropagation
- 2.3.2. Le sevrage
- 2.3.3. La callogenèse

2.4. Méthodes d'analyse des résultats

3. RESULTATS

3.1. Analyse de la morphogenèse in vitro chez les ignames microbouturées

- 3.1.1. Morphologie du développement
- 3.1.2. Comparaison de la cinétique de croissance
- de 4 ignames microbouturées sur M50
 - 3.1.3. Influence du milieu
 - 3.1.4. Influence du contenant
 - 3.1.5. Conclusion

3.2. Le sevrage

- 3.2.1. Introduction3.2.2. Résultats et discussion

3.3. La callogenèse

- 3.3.1. Introduction3.3.2. Les milieux de callogenèse
- 3.3.3. Résultats
- 3.3.4. Conclusion et discussion

CONCLUSION GENERALE

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

L'igname, plante vivrière des régions intertropicales humides, est une monocotylédone appartenant à la famille des Dioscoreacées. Cette famille de plantes herbacées aux tiges volubiles produisent des tubercules, des rhizomes, des bulbilles. Certaines espèces d'ignames ont été domestiquées et cultivées pour leurs tubercules comestibles tandis que d'autres se sont révélées être une source de sapogénines stéroïdiques (Dioscorea composita, D. deltoïdea) exploitable en culture in vitro (KAUL et STABA 1967, 1969).

Le genre Dioscorea renferme plus de 600 espèces. Mais, malgré cette diversité, une dizaine seulement sont cultivées :

- . Dioscorea alata, D. bulbifera, D. esculenta, D. batatas originaires d'Asie;
 - . D. cayenensis, D. rotundata, D. dumetorum originaires d'Afrique;
 - . D. trifida originaire d'Amérique;
 - . D. mumularia, D. pentaphylla originaires d'Océanie.

Parmi ces espèces, seules D. cayenensis, D. rotundata, D. alata font l'objet d'une culture à grande échelle et présentent une importance économique en Côte d'Ivoire.

La production mondiale est estimée entre 20 et 25 millions de tonnes de tubercules par an. Elle couvre 12 % de l'alimentation de base des populations des régions intertropicales et arrive au 4ème rang des plantes à tubercules après le manioc, la pomme de terre et la patate douce. Le premier producteur mondial est le Nigéria avec 14 millions de tonnes, la Côte d'Ivoire produit en moyenne 4 millions de tonnes par an.

Cependant, les difficultés d'amélioration variétales et le mode de culture astreignant de l'igname limitent son extension et s'opposent à son intégration dans un système de culture mécanisé.

L'amélioration de l'igname par les méthodes in vitro est une voie pour réduire ces difficultés. En effet, le recours aux techniques de culture in vitro permet de pallier aux insuffisances de la reproduction sexuée de l'igname en provoquant une variabilité génétique ou en créant des hybrides somatiques.

1. GENERALITES

1.1. L'igname

L'igname est une plante le plus souvent annuelle, quelquefois pérenne comme D. minutiflora ou D. mangenotiana. Il présente une phylotaxie variable; les feuilles sont d'abord alternes puis opposées. L'igname est principalement dioïque. Il existe néanmoins des variétés monoïques et plus rarement hermaphrodites. Les inflorescences sont des épis axillaires qui portent des fleurs très petites, de l'ordre du mm. Le fruit est une capsule triloculaire contenant en moyenne 6 graines ailées.

Les climats humides (1800 mm/an) à saisons sèches peu longues conviennent bien aux ignames. Ainsi, la production en Afrique de l'Ouest s'étend longitudinalement de la Côte d'Ivoire aux montagnes du Cameroun et latitudinalement de la forêt tropicale à la savane.

L'aire géographique des *Dioscorea* comprend tous les continents de la zone intertropicale et quelques régions des continents à climat tempéré. Cette large répartition prouve leur grande capacité d'adaptation qui se traduit par une

hétérogénéité morphologique et physiologique.

Les espèces cultivées sont dioïques et possèdent une floraison très irrégulière. La phase de reproduction est extrêmement réduite au profit de la phase végétative. Aussi, la reproduction sexuée est très délicate et difficile à obtenir en champ. De nombreux facteurs contribuent aux difficultés d'hybridation:

. la floraison incertaine;

la pollinisation précaire du fait de la dioecie, de la petitesse des fleurs, de la nature collante des grains de pollen, de leur faible variabilité (SADIK, 1976);

. l'incompatibilité inter ou intra spécifique qui peut exister.

La multiplication végétative est le seul moyen d'assurer la continuité de la culture. Elle se fait traditionnellement à l'aide des tubercules.

Des fragments de tubercules sont enterrés au sommet des buttes début avril avant la saison des pluies. Le port lianescent de l'igname nécessite le tuteurage de la parcelle. L'arrêt de la croissance végétative et le dessèchement du feuillage marquent le début de la récolte. Elle intervient 6 à 11 mois après la plantation. Les tubercules récoltés ont des formes et des couleurs très variables selon les variétés. Ils entrent en dormance après la

Les différentes espèces se distinguent par leurs caractéristiques botaniques portant sur la tige, la feuille et le tubercule.

1.1.1. Dioscorea alata

Cette espèce, largement répandue dans toutes la zone intertropicale, est originaire d'Asie.

Elle présente une tige quadrangulaire, ailée et des feuilles cordiformes reconnaissables. Certains cultivars fleurissent abondamment en formant des fleurs mâles et femelles, mais la production de fruits est extrêmement rare. En plus du tubercule, des bulbilles apparaissent à l'aisselle des feuilles supérieures chez quelques cultivars : 'Brazo Fuerté', 'Ouodouble',

Il existe de nombreux types variétaux qui sont autant de formes différentes de tubercule.

Cette espèce est tardive et se récolte 8 à 11 mois après la plantation.

1.1.2. Dioscorea cayenensis, D. rotundata

Originaires d'Afrique, ces deux espèces sont difficiles à dissocier. Leurs tiges sont cylindriques, épineuses ou inermes, leurs feuilles plus arrondies que D. alata. D. cayenensis fleurit quelquefois mais donne en majorité des fleurs mâles ce qui réduit les possibilités de fécondation. Quelques D. rotundata multipliées par voie végétative arrivent à fleurir et à produire des graines (SADIK, 1976).

Le cycle végétatif de *D. cayenensis* est identique à celui de *D. alata* tandis que *D. rotundata* possède un cycle végétatif plus court avec la possibilité d'obtenir 2 récoltes. En effet, si on coupe le tubercule 5 à 6 mois après la plantation en laissant le sommet du tubercule bien en place dans la butte, la plante poursuit sa croissance et produit une deuxième récolte 3 à 4 mois après la première.

1.1.3. Dioscorea esculenta

Il s'agit d'une espèce à tige cylindrique, épineuse et à feuilles petites en forme de cœurs.

Elle est originaire d'Asie du Sud Est et possède un cycle végétatif long de 8 à 11 mois.

Elle produit plusieurs petits tubercules (20 à 50) à chair blanche par pied.

1.1.4. Dioscorea dumetorum

Cette espèce africaine se rencontre fréquemment à l'état sauvage. Elle présente des feuilles trilobées et une tige cylindrique non épineuse. Elle est très vigoureuse, fleurit et produit un groupe de gros tubercules ainsi que des bulbilles. Les tubercules sauvages sont souvent

1.1.5. Dioscorea bulbifera

Cette espèce, d'origine asiatique ou africaine possède une tige cylindrique, non épineuse qui porte de larges feuilles.

Elle a la particularité de produire de gros tubercules aériens ou bulbilles qui sont les principaux organes de réserve. Celles-ci apparaissent à l'aisselle des feuilles supérieures en fin de cycle et assurent une propagation végétative dans les conditions naturelles.

1.1.6. Conclusion

Les ignames présentent une diversité génétique qui gagnerait à être exploitée à des fins agronomiques et alimentaires. Cependant, la mise en valeur de la richesse du genre Dioscorea se heurte à l'insuffisance de la reproduction sexuée. En effet, la Biologie florale des espèces cultivées ne permet pas d'assurer aisément une sélection classique par hybridation zygotique, interdisant même toute hybridation interspécifique. La culture in vitro permet de contourner cet obstacle en ayant recours à la voie somatique. Elle offre la possibilité de progresser en matière de sélection.

1.2. La culture in vitro

1.2. 1. Historique

Les premières cultures de tissus de Dicotylédones ont été réalisées par GAUTHERET, NOBECOURT et WHITE en 1939 tandis que celles de Monocotylédones ont été mises au point par MOREL et WETMORE en 1950.

En ce qui concerne les Dioscoréacées, les premiers travaux ont porté sur la formation de bulbilles *in vitro*. Les premières colonies tissulaires ont été obtenues sur *D. composita* et *D. sansibarensis* (RAO, 1969). Plusieurs voies de recherches sont suivies à l'heure actuelle:

- Production de métabolites secondaires ;
- Production de semences artificielles(bulbilles, embryons somatiques)
- Recherche de variabilité;
- Fusion de protoplastes.

1.2.2. Définitions

La culture *in vitro* recouvre toutes cultures de matériel végétal effectuées en conditions aseptiques. Elle fait appel aux potentialités génétiques des cellules végétales. Celles-ci renferment la totalité de l'information génétique d'une plante dans leurs noyaux et devraient, par conséquent, pouvoir reproduire cette plante. Cette aptitude des cellules à exprimer la totalité du génome est la totipotence cellulaire. Elle se manifeste lors de la mise en culture *in vitro*, l'explant étant libéré des corrélations existant dans la plante entière.

La mise en culture in vitro s'accompagne généralement d'une dédifférenciation et d'une reprise de l'activité mitotique. L'explant peut évoluer dans différentes directions (callogène, organogène, embryogène...) suivant certains facteurs:

- le choix de l'explant
- le milieu de culture
- les conditions de culture.

La culture *in vitro* vise à orienter et à contrôler les processus physiologiques qui commandent le devenir de l'explant en modulant ces trois facteurs.

1.2.2.1. Le choix de l'explant

Le choix de l'explant est primordial dans l'obtention de la réponse désirée. C'est-à-dire que selon la nature de l'explant (feuille, tige, racine), son passé, son âge, sa taille, la réponse in vitro peut varier considérablement. Il convient de choisir un explant capable de réagir favorablement ("tissu compétant") aux conditions in vitro.

1.2.2.2. Le milieu de culture

Le milieu de culture est une solution nutritive aqueuse qui sert de support à la croissance. Elle contient des macroéléments, des oligoéléments, des éléments organiques (sucres, vitamines, acides aminés, et des régulateurs de croissance selon les besoins). La solution est solidifiée au moyen de gélose que l'on ajoute au milieu de culture.

Des auteurs ont mis au point des solutions bien définies de micro et macroéléments (MURASHIGE et SKOOG, 1962; HELLER, 1959) et de vitamines (MOREL et WETMORE, 1950). Les régulateurs de croissance peuvent être additionnés à des concentrations variables pour stimuler l'embryogenèse, la rhizogenèse, la caulogenèse ou la callogenèse.

1.2.2.3. Les conditions de culture

Les conditions de culture comprennent le type de flaconnage, la lumière et la température. Elles peuvent influer fortement sur le comportement de l'explant notamment par la photopériode, l'intensité et la qualité de l'éclairement, les hautes températures.

1.2.3. Aperçu des différentes techniques de culture in vitro (Tableau 1)

1.2.3.1. La micropropagation

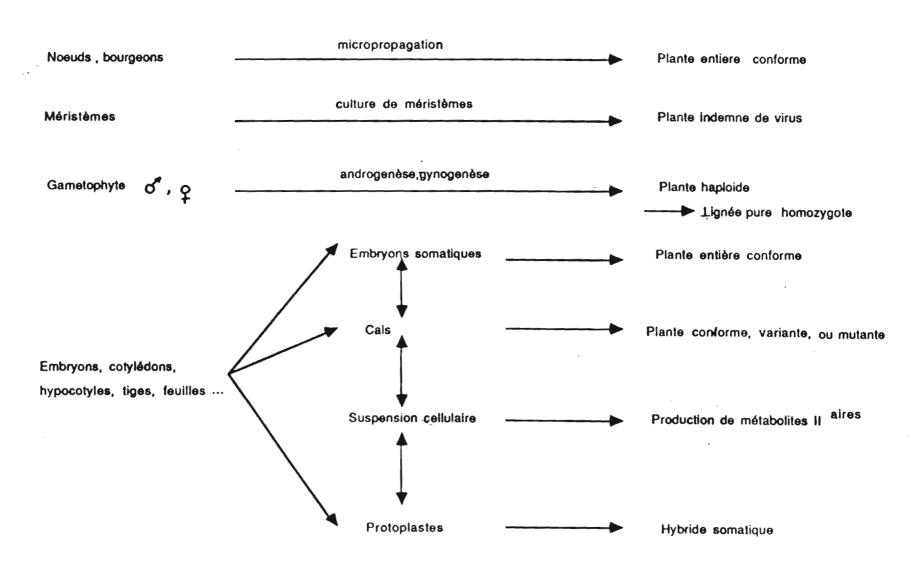
La micropropagation est une multiplication végétative in vitro. Elle utilise les capacités naturelles de multiplication d'une espèce pour la reproduire un grand nombre de fois. La reproduction étant conforme, on obtient ainsi des clones. La vitrothèque d'igname, constituée par Monsieur MALAURIE au laboratoire de Biotechnologie de l'Institut français de recherche scientifique pour le développement en coopération (ORSTOM) à Adiopodoumé est maintenue et renouvelée par microbouturage. La vitrothèque sert de matériel végétal de base pour développer différents programmes de recherche.

Cette technique présente de sérieux avantages :

- taux de multiplication élevé; au laboratoire de Biotechnologie (ORSTOM Adiopodoumé), D. alata cv 'Florido' possède un taux de multiplication de 4 plants après n x 5 semaines, (2 000 000 en 1 an);
- faible encombrement des vitroplants ce qui permet de conserver une collection sur peu de surface;
 - indépendance vis-à-vis conditions climatiques externes.

De nombreuses espèces horticoles sont ainsi multipliées (Saintpaulia, Cymbidium, fraisier, rosier, geranium...).

TABLEAU 1 : SCHEMA RECAPITULANT LES DIFFERENTES TECHNIQUES DE CULTURE IN VITRO .



1.2.3.2. La culture de méristèmes

L'inconvénient principal de la multiplication végétative traditionnelle est de transmettre les maladies virales aux plants fils. C'est le cas notamment des ignames de Côte d'Ivoire chez lesquelles le mode de multiplication a contribué à l'expression des maladies virales. Les régions méristématiques ne comportant pas de virus, les plantes entières issues de culture de méristèmes sont également indemnes de virus. Un bon exemple d'assainissement est celui de la variété de pomme de terre Belle de Fontenay (RAJNCHAPEL-MESSANI et GUERCHE, 1985).

1.2.3.3. La culture d'haploïdes

Cette technique consiste à régénérer une plante entière par la culture in vitro de grains de pollen, (androgenèse) ou d'une cellule de sac embryonnaire (gynogenèse). Les plantes ainsi obtenues sont haploïdes et très souvent stériles. Elles sont des instruments de la sélection, leur intérêt est de faciliter l'étude des caractères, ceux-ci s'exprimant tous chez les plantes haploïdes, et de pouvoir donner des lignées pures homozygotes par doublement du stock chromosomique.

1.2.3.4. La callogenèse

La callogenèse est la néoformation d'un cal, tissu cellulaire indifférencié en division mitotique, in vitro à partir d'explants tels que des feuilles, des hypocotyles. Cette formation résulte de la levée des corrélations lors du prélèvement de l'explant et d'un effet stimulant des substances trophiques (sucres, azote...) ainsi que des régulateurs de croissance. Une auxine est souvent nécessaire à l'induction de la callogenèse.

Le stade cal est une étape importante en culture in vitro. Il offre de nombreuses possibilités telles que :

- constituer un matériel végétal indifférencié et en division, avantageusement utilisable pour obtenir des protoplastes (cellules sans paroi pectocellulosique). La principale difficulté en matière de protoplastes issus de tissus différenciés (feuilles en général) est d'arriver à provoquer la mitose. L'amélioration de l'igname est le programme central de recherche du laboratoire de Biotechnologie de l'ORSTOM d'Adiopodoumé. Il vise à produire des hybrides somatiques susceptibles de présenter des caractères agronomiques ou de résistances intéressants.

Le cal est également une étape dans la mise au point de suspensions cellulaires. Celles-ci sont recherchées sur des plantes médicinales afin de produire des métabolites secondaires pharmaceutiques;

- produire des massifs cellulaire à caractères méristématiques qui évolueront vers la néoformation de racines et de tiges. Le passage par un stade indifférencié poussé, nécessaire à l'organogenèse future, est source de variabilité. Les plantes régénérées pourront présenter des modifications morphologiques par rapport à la plante dont est extrait l'explant. Des traitements (rayons X, rayons 1) sont parfois appliqués pour provoquer ces mutations;

	VARIETES	CLONES		TOTAL
ESPECES	VARIETES	CECKES		ind.
D. alata	Namassou Blanc	OA 01		15
D. alata	Kinampay	OA 02		9
D. alata	Binugas	OA 03		10
D. alata	Dovokokore	OA 04		4
D. alata	Douoble forme plate	QA 05		10
D. alata	Vinoc	OA 06		6
D. alata	Goroto	OA 07		10
D. esculenta	Sea 20	OA 08		6
D. esculenta	Sea 32	OA 09		14
D. esculenta	Sea 33	OA 10		10
D. esculenta	Sea 18	OA 11		27
D. cayenensis	Gbangan	OA 12		31
D. alata	Nza Lengbe	OA 13		10
D. cayenensis	Gorogodo	OA 14		6
D. alata	Farm Lisbon	OA 15		10
D. alata	Brazo Fuerte	OA 16		18
D. cayenensis	Kpan	OA 17		7
D. cayenensis	Sp-douce	OA 18		32
D. esculenta	Sea 97	OA 19		43
D. cayenensis	Krengle	OA 20		46
D. alata	Florido	OA 21		43
-	-			43
D. cayenensis	Kingle	OA 22		51 7
D. alata	Suidié	OA 23		10
D. alata	Bodo	OA 24		11
D. alata	Tikamo	OA 25		10
D. alata	Ouodoublé	OA 26 OA 27		10
D. alata	Bété Bété	OA 27		5
D. alata	White Lisbon	OA 29		10
D. alata	Krodja	OA 30		8
D. alata	Forastero	OA 31		5
D. cayenensis	Kopola	OA 32		16
D. esculenta	Name De Pana Douoble	QA 33		3
D. alata D. alata	Namassou	QA 34		13
	Morado	OA 35		10
D. alata D. alata	Hawai Branching	QA 36		19
D. alata	Smooth statia	QA 37		5
D. hirtiflora	inc.	EA 01		4
D. cayenensis	Kpokpokpokpo	EA 02		1
D. cayenensis	Kangba Djeroué	EA 03		4
D. Cayenensis	Kangba Jaune	EA 04		
D. cayenensis	Sopere	EA 05		2 44
D. cayenensis	Lokpa	EA 06		1
D. Cayenensis	Krokropa	EA 07		9
D. praehensilis	inc.	EA 08	ı	18
D. dumetorum	variété cultivée	EA 09		6
D. dumetorum	variété sauvage	EA 10		20
D. bulbifera	inc.	EA 11		6
D. alata	X1	NC 01		5
D. alata	x2	NC 02		9

LISTE DES ESPECES ET DES VARIETES

ESPECES	VARIETES	CLONES	}	TOTAL
				ind.
D. alata	х3	NC 03		13
D. alata	X4	NC 04		16
D. alata	x5	NC 05		22
D. alata	x6	NC 06		23
D. alata	Brazo Fuerte	IB 01		10
D. alata	Brazo Fuerte	EA 12		14
D. alata	Hawai Branching	IB 02		2
D. cayenensis	Bakaganon	IB 04		5
D. cayenensis	Gada	IB 05		15
D. cayenensis	Kouba	IB 06		17
D. cayenensis	Makpawa	IB 07		4
D. cayenensis	Douba Yesirou	IB 08		5
D. cayenensis	Baniakpa	IB 09		5
D. cayenensis	Mississim	IB 12		3
D. alata	Florido	IB 11		23
D. cayenensis	Wacrou	IB 12		11
D. schimperiana	inc.	IB 13		9
D. bulbifera	inc.	IB 14		14
D. cayenensis	Krengle	IB 15		10
D. cayenensis	Gnan	EA 13		11
D. cayenensis	Kponan	EA 14		25
D. cayenensis	Kangba	EA 15		4
D. cayenensis	Kangba Djeroué	EA 16		2
D. bulbifera	variété cultivée	EA 17		26
D. bulbifera	variété sauvage	EA 18		19
D. dumetorum	variété sauvage	EA 19		3
D. dumetorum	variété cultivée	EA 20		25
D. esculenta	inc.	OA 39		21
D.alata	Florido	PR 01		9
D.alata	Forastero	PR 02		25
D.alata	Gemelos	PR 03		7
D.alata	Leone Globe	PR 04		13
D.alata	' Kinabayo	PR 05		12
D.alata	Binugas	PR 06		14
D.alata	Gunung	PR 07		10
D.alata	Moresby	PR 08		10
hybride	C6	IB 16		1
D. alata	Poc	IB 17		1
hybride	C11	IB 19		1
hybride	C4	IB 18		1
D. alata	C14	IB 20		2
hybride	C5	IB 21		5
D. alata	C13	IB 22		2
hybride	C1	IB 23		6
hybride	C40	IB 24		1 1
D. Bis. * sauv.	BNC9	IB 25		2
D. cayenensis	Morokourou	PB 01		16
D. cayenensis	Igname Guinée	PB 02 PB 03		7
D. cayenensis	Corossol	PB 03		15
D. cayenensis	Grosse Caille	IB 26-37	ĺ	11
D. pra. * Krengle	KP1 à KP11	NC 07		23
D. alata	х7	1 1007	1	

2.2. Les milieux de culture

Ils contiennent des éléments minéraux, des éléments organiques de l'eau bidistillée et de la gélose.

2.2.1. Les éléments minéraux

2.2.1.1. Les macroéléments

Il s'agit des éléments N, P, K, S, Mg, Ca. Nous avons utilisé essentiellement les macroéléments de MURASHIGE et SKOOG (MS, 1962) dont la composition est donnée au tableau 3. Ce milieu a été mis au point à partir de travaux portant sur la croissance de cals de tabac. Cette solution des macroéléments de MURASHIGE et SKOOG est riche et bien équilibrée ce qui en fait une des plus utilisées en culture in vitro. Elle est parfois diluée ou modifiée. Nous avons également utilisé une solution des macroéléments de MURASHIGE et SKOOG modifiée (MSM) qui est donnée au tableau 3.

2.2.1.2. Les oligoéléments

Ils comprennent les ions B⁴⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, I²⁻, Mo²⁺, Cu²⁺, Co²⁺, Fe²⁺ et sont apportés à des concentrations très faibles, inférieures à 1 mM. Les solutions d'oligoéléments utilisées sont celles de MURASHIGE et SKOOG modifiées (MSm et Oligo A) données au tableau 4.

La solution Oligo A ne contient pas d'iode, celui-ci est ajouté à la concentration de 0,87 mg/l lors de la préparation de milieux. Le fer est apporté séparément sous forme chélaté à raison de 27,8 mg/l afin d'en assurer une meilleure assimilation.

En pratique, des solutions mères de macroéléments et d'oligoéléments sont préparées à de fortes concentrations (MS x 10, MSM x 40, MSm x100, Oligo A x 1000) de telle sorte que quelques millilitres de solution mère suffisent à la fabrication d'un milieu.

2.2.2. Les éléments organiques

2.2.2.1. Les glucides

Nous avons utilisé le saccharose à des concentrations variant de 30 g/l à 50 g/l. Il sert de source carbonée.

2.2.2.2. Les vitamines

Certaines vitamines du groupe B semblent nécessaires au bon développement des cultures. La composition des vitamines mise au point par MOREL et WETMORE en 1951 (tableau 5) a été utilisée dans certains milieux. Pour d'autre, une solution de composition similaire, organic Addenda (tableau 5), a été employée.

TABLEAU 3 : COMPOSITION DES SOLUTIONS DE MACROELEMENTS DE MURASHIGE ET SKOOG (MS) ET DE MURASHIGE ET SKOOG MODIFIE (MSM)

	Macroéléments MS		Macroélén	nents MSM
	mg/l	mM	mg/l	<u>m</u> M
Nitrate d'ammonium				
NH4NO3	1650	20,6	650	8,12
Nitrate de potassium				
K NO3	1900	18,8	600	5,9
Sulfate de magnésium				
Mg SO4 7H2O	370	1,5	150	0,6
Chlorure de calcium		}		
CaCl2, 2 H2O	440	3	180	1,2
Phosphate de potassium		i		
K PO4 H2	170_	1,25	350_	2,6

TABLEAU 4 : COMPOSITION DES SOLUTIONS D' OLIGOELEMENTS DE MURASHIGE ET SKOOG MODIFIE (MSM, Oligo A)

	Oligoélém	ents MSm	Olig	0 A
	mg/l	uM	mg/l	υM
Sulfate de manganèse				
Mn SO4 H2O	18,9	84,7	18,9	84,7
Sulfate de zinc			}	• • • • • • • • • • • • • • • • • • •
Zn SO4 7H2O	10	34,8	10	34,8
Acide borique	1			31,0
H3 BO3	10	161,3	10	161,3
lodure de potassium				''''
KI	0,83	5		
Sulfate de cuivre			1	
Cu SO4	0,025	0,1	0,025	0,1
Molybdate de sodium	1	'	,,,,,	•, ·
Na2 MoO4	0,25	1	0,25	1
Bichromate de cobalt			,,,,,,	
Co Cl2 6H2O	0,25	1	0,025	0,1

TABLEAU 5 : COMPOSITION DES SOLUTIONS D'ORGANIC ADDENDA ET DES VITAMINES DE MOREL ET WETMORE.

	ORGANIC ADDENDA		VITAMI	NES
	mg/l	υM	mg/l	υM
Panthoténate de calcium	•	•	1	2,1
Myo Inositol	100	550	100	550
Biotine	0,05	0,2	1	0,04
Acide Nicotinique	5	40	- 1	8
Pyridoxine	0,5	2,5	1	5
Thlamine	0,5	1,5	1	3
Glycine	2	26		
Acide Folique	0,5	1		١.

2.2.2.3. Les acides aminés

Ils sont ajoutés quelquefois comme source d'azote organique d'appoint mais peuvent se révéler indispensables pour certaines cultures (protoplastes). La glutamine entre dans la composition de milieux de microbouturage(milieux B4, 401b - tableaux 7 et 8), mis au point au laboratoire.

2.2.3. Les régulateurs de croissance

2.2.3.1. Les auxines

Elles sont essentiellement ajoutées au milieu de culture pour induire la prolifération cellulaire. Nous avons utilisé l'acide 2,4-dichlorophenoxyacétique (2,4-D) pour les essais de callogenèse sur D. alata cv. Florido' et D. cayenensis cv. 'Krengle'.

A faibles doses, elles peuvent favoriser la rhizogenèse et la croissance cellulaire. A ce titre, des milieux de microbouturage (B4, E2, tableau 7 et 9) contiennent de l'acide naphtaline acétique (ANA) ou du 2,4-D.

2.2.3.2. Les cytokinines

En général, elles ont un effet stimulant sur le métabolisme et favorisent la caulogenèse. Elles sont souvent associées aux auxines bien qu'elles aient des effets antagonistes. Cependant, plus que la concentration de l'une ou de l'autre séparément, c'est l'équilibre des deux qui influencera fortement le devenir de l'explant.

La kinetine a été essayée au cours des expériences de callogenèse mais est également comprise à faibles doses dans des milieux de microbouturage.

2.2.4. Conditionnement des milieux

Le pH est ajusté à l'aide de quelques gouttes de HC1 0,5 N ou de Na0H à pH 5,8 pour les milieux de microbouturage et à pH 5,5 pour les milieux de callogenèse.

Le charbon actif est ajouté dans les milieux M50 et B4 (tableaux 6 et 7) afin d'adsorber les composés phénoliques. En effet, ces composés qui sont parfois libérés dans le milieu et dans lequel ils s'oxydent, sont des inhibiteurs des réactions métaboliques. Ils provoquent le brunissement du milieu et peuvent entraver la croissance des vitroplants.

La gélose est adjointe en dernier lieu dans tous les milieux à la concentration de 8 g/l pour le microbouturage et de 6,5 g/l pour la callogenèse. Le milieu est gélifié en le portant à ébullition.

Les milieux sont autoclavés à 120° pendant 30 mn. L'autoclave présente l'inconvénient de dégrader des composés organiques tels que les acides aminés. En ce qui concerne les vitamines, les produits de l'hydrolyse semblent toujours agir favorablement.

TABLEAU 6 : MILIEUX M50 - M51

H₂O qsp	1	1
MACRO MS (x10)	•) Dml
OLIGO A (x100)	10	ml
K I(x1000)	1:	ml
Fe EDTA (5,6mg/l)	51	ml
VITAMINES (x500)	2m1	
SACCHAROSE	50	Ͻg
GELOSE	6	g
	M51	M50
CHARBON	-	2g

TABLEAU 7 : MILIEU B4

H₂O qsp	11
MACRO MSM (x40)	25ml
OLIGO MSm (x1000)	1ml
ORGA. ADDENDA (x100)	10ml
Fe EDTA (5,6mg/l)	5ml
GLUTAMINE	200mg
SACCHAROSE	50 g
HYDROLYSAT CASEINE	1g
2,4 D (0,1mg/l)	10ml
B A P (0,1mg/l)	0,5ml
CHARBON	3g
GELOSE	8g

TABLEAU 8: MILIEU 401b

	H₂ O qsp	11
	MACRO MS (x10)	100ml
•	OLIGO A (x100)	10mi
	ORGA. ADDENDA (x100)	10mi
	Fe EDTA (5,6 mg/l)	5ml
	GLUTAMINE	200mg
	SACCHAROSE	1 30g
	GELOSE	8g

TABLEAU 9 : MILIEU E2

MACRO KNOP (x20)	50ml '
OLIGO A (x1000)	1ml
ORGA. ADDENDA (x100	0) 10ml
' Fe EDTA (5,6mg/l)	5ml
GLUTAMINE	100mg
SACCHAROSE	50 g
ANA (0,1 mg/l)	10ml
GELOSE	4 g

2.3. Techniques et conditions de culture

2.3.1. La micropropagation

Toutes les opérations se déroulent en conditions stériles. Pour cela, les manipulations s'effectuent sous hotte à flux laminaire, les instruments de travail sont régulièrement flambés à l'alcool, les boîtes de Petri sont passées au four Pasteur (140° pendant 12 heures) avant utilisation, la paillasse est nettoyée à l'alcool.

Les explants prélevés sur les vitroplants sont des boutures uninodales. Elles sont isolées et insérées verticalement dans le milieu gélosé.

Les types de flaconnage employés pour le microbouturage sont des tubes à essai ou des bocaux (f = 9 cm, h = 13 cm). Ils sont fermés à l'aide de bouchons ou de couvercles en verre ou en polycarbonate. Un film cellophane enroulé autour des bouchons évite les contaminations.

Les microboutures sont placées en chambre de culture thermostatée (27° + 2°) et à photopériode contrôlée (16 h de lumière pour 8 h d'obscurité).

2.3.2. Le sevrage

La vitrothèque du laboratoire constitue un "pool" génétique aux potentialités diverses. Notamment, grâce aux taux de multiplication élevés, la production, en grande quantité, de vitroplants serait possible dans des délais assez courts (6 mois). Ils pourraient, dans un avenir proche devenir un matériel commercialisable et remplacer les tubercules semences qui empiètent constamment sur la récolte. Dans cette optique, le passage des conditions aseptiques aux conditions in vivo a été expérimenté sur 4 espèces.

Les vitroplants D. alata ou 'Namassou Blanc' et D. dumetorum variété sauvage ont été sevrés après 9 semaines de culture in vitro tandis que D. cayenensis cv 'Kponan' et D. esculenta, cv 'Esculenta', l'ont été après 11 semaines.

Pour cela, les vitroplants sont soigneusement sortis des tubes et débarrassés du milieu de culture par rinçage à l'eau courante. Les plants sont ensuite repiqués en miniserre (48 x 33 cm2) dans un mélange de terre du Bandama et de parche de noix de coco stérilisé au four Pasteur (8h à 110°). Après arrosage, la miniserre est placée sous éclairage artificiel.

2.3.3. La callogenèse

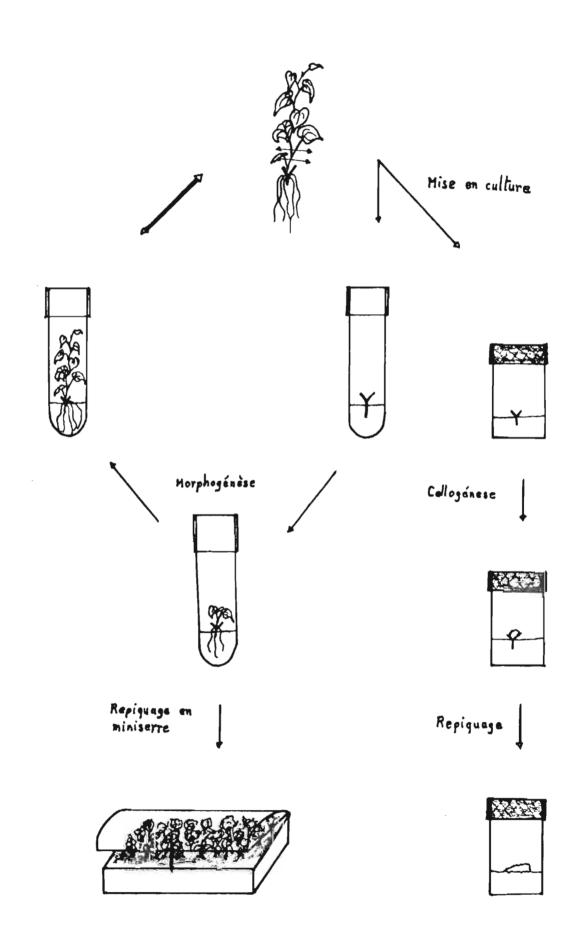
Les explants choisis pour induire la callogenèse sont des boutures uninodales d'un centimètre environ.

M51 a été pris comme milieu de base. Des régulateurs de croissance sont additionnés à des concentrations variables.

Les contenants sont des piluliers et des bocaux fermés hermétiquement par des bouchons vissables.

Des modalités différentes ont été suivies selon l'espèce mise en culture.

Schéma géneral de travail



2.3.3.1. D. alata cv. 'Florido'

Comme pour un microbouturage, les explants ont été insérés verticalement dans le milieu gélosé contenu dans des piluliers.

Une gamme de concentration en 2,4 D a été testée (6 mg/l, 12 mg/l, 15 mg/l) en association avec de la kinétine à 1 mg/l. Un fixateur des phénols (polyvinylpyrrolidone PVP) a été facultativement additionné au milieu de culture à raison de 0,5 % et 2 %.

Les piluliers ont été placés pour moitié à l'obscurité dans une enceinte thermostatée et pour l'autre moitié en chambre de culture.

Après 10 semaines, les explants présentant un cal sont repiqués sur le milieu d'entretien ME (ME = M.51 + 2 mg/l de 2,4D + 0,5 mg/l de kinétine).

2.3.3.2. D. cayenensis cv 'Krengle'

Les bocaux ont servi de contenant pour cette expérience. Les explants sont insérés dans le milieu gélosé à raison de 8 par bocal.

Trois concentrations en 2,4 D ont été essayées (4 mg/l, 6 mg/l, 8 mg/l) associées à 1 mg/l de kinétine.

Cet essai s'est déroulé en chambre de culture; les cals apparus après 6 semaines sont repiqués sur le milieu d'entretien ME.

2.4. Méthode d'analyse des résultats

2.4.1. La croissance des vitroplants

Elle sera mesurée par le nombre moyen de feuilles à des intervalles de temps réguliers. Les effectifs des différents clones varient selon les expériences entre 25 et 40 individus.

Les résultats seront donnés sous forme de courbes avec le nombre de jours après la mise en culture en abscisse et le nombre moyen de feuilles en ordonné. Les intervalles de confiance seront calculés au seuil 5 % afin de comparer les différentes courbes. L'intervalle de confiance Ic est donné par la formule :

 $Ic = 1,96 \times s / \sqrt{E}$

s = Ecart type

E = Effectif

2.4.2. La callogenèse

Elle sera quantifiée au moyen de pourcentages de cals obtenus par rapport à la population ensemencée.

3. RESULTATS

- 3.1. Analyse de la morphogenèse in vitro chez 4 ignames microbouturées
 - 3.1.1. Morphologie du développement
 - 3.1.1.1. Description

Après la mise en culture sur le milieu gélosé, la première manifestation est l'apparition d'une prolifération tissulaire de couleur blanchâtre à la base du nœud. Cette protubérance axillaire est à l'origine de la caulogenèse et de la rhizogenèse chez l'Igname. En effet, au sommet du gonflement se trouve un bourgeon se terminant par une ou deux pointes qui sont les feuilles écailleuses. Ces dernières s'écartent pour laisser sortir la tige feuillée. A la base de la protubérance apparaît des pointements racinaires qui se développent rapidement. Le vitroplant poursuit son développement par l'intermédiaire de l'apex qui met en place les feuilles et les noeuds tandis que le système racinaire se renforce.

Cette réaction, commune aux ignames microbouturées, peut sensiblement varier d'une espèce à l'autre.

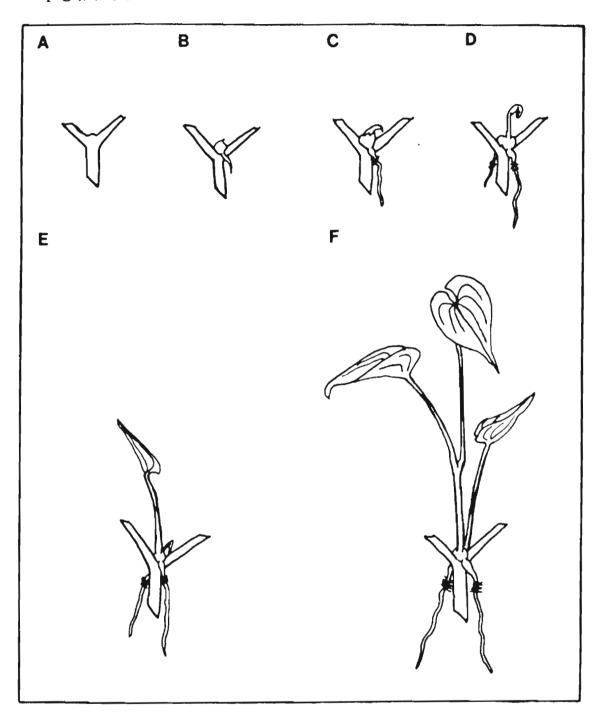
Pour D. alata cv. 'Florido' mis en culture sur 401b, l'enracinement est très rapide, comme le développement de l'appareil aérien. Le méristème caulinaire donne naissance à un axe feuillé sur lequel apparaît l'apex, qui amorce une nouvelle tige feuillée (Planche 1). L'architecture se met ainsi en place, les feuilles sont alternes, les ramifications nombreuses (4 en 5 semaines). Les racines sont nombreuses et fines.

La mise en culture de *D. alata* cv. 'Florido' s'accompagne d'une forte phénolisation : oxydation des phénols, libérés par l'explant, qui se matérialise par un brunissement du milieu.

Le développement de *D. cayenensis* cv 'Kponan' sur 401b est similaire. Il présente la même architecture. La rhizogenèse et la caulogenèse sont cependant beaucoup plus lentes. Les racines sont nombreuses mais pénètrent difficilement la gélose. On observe parfois un soulèvement de l'explant sous la poussée racinaire! Les tiges sont anthocyanées et les feuilles petites; 1 cm² en moyenne (Planche 2).

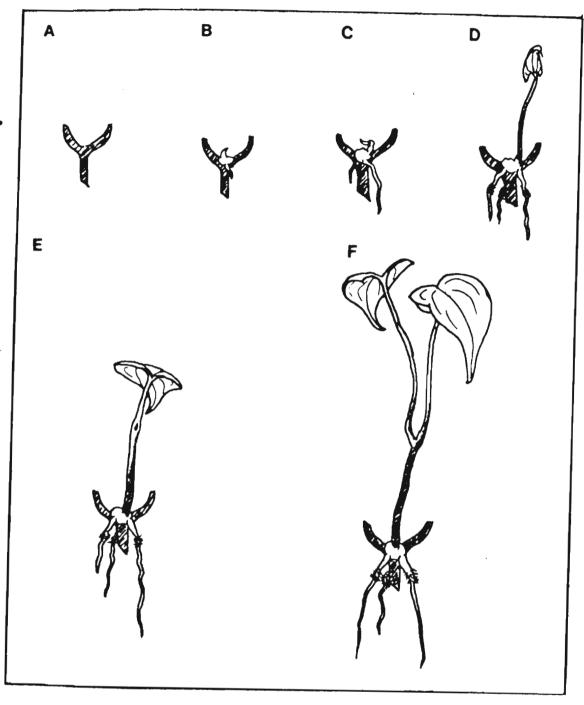
D. esculenta cv 'Sea 97' cultivé sur 401b, se caractérise par une faible rhizogenèse. Il n'existe souvent qu'une seule racine ramifiée et trapue. L'appareil aérien présente une architecture en rosette du fait de la petitesse des entre-noeuds. Les feuilles sont parfois nombreuses mais réduites; 0,5 cm² (planche 3).

La mise en culture de D. dumetorum variété sauvage sur 401b provoque un brunissement du milieu dû à l'oxydation des composés phénoliques. La rhizogenèse est cependant bonne. Les racines sont précoces et longues. L'appareil aérien est vigoureux; plusieurs tiges feuillées démarrent de la protubérance axillaire et donnent un aspect en touffe du vitroplant. L'élongation domine fortement, les entre-noeuds sont très grands, les ramifications réduites (1er noeud à 45 jours). Les feuilles sont trilobées, poilues comme la tige et assez grandes (planche 4).



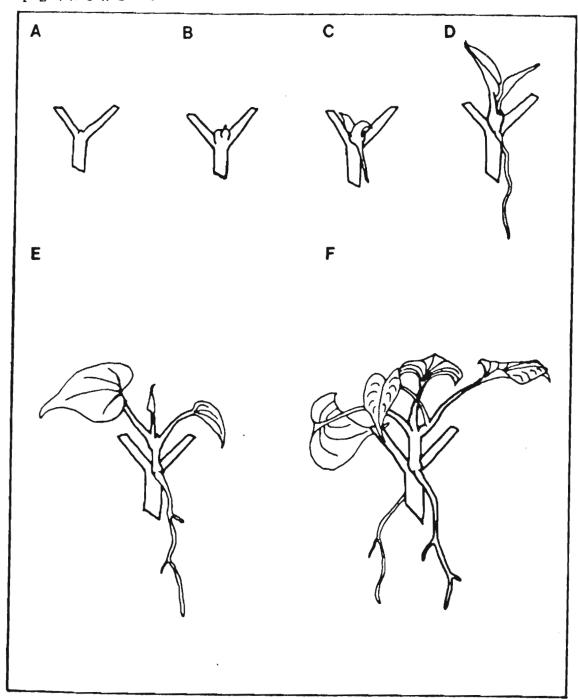
Premiers stades de développement de D. *alata* cv 'Florido' , cultivé *in vitra* et issu de microbouturage.

- A: to Explant.
- B: to+5j. Gonflement axillaire, feuilles écailleuses, émergence d'une racine.
- C: to+7j. Protubérance axillaire , sortie de la tige , allongement racinaire.
- D: to+9j. Développement de l'axe feuillé , formation d'une nouvelle racine.
- E: to+11j. Croissance de l'axe et des racines , première feuille épanouie , deuxième feuille fermée.
- F: to+20j. Apparition du premier noeud , feuille alterne allongement racinaire.



Premiers stades de développement de D. cayenensis cy 'Kponan', cultivé in vitro et issu de microbouturage.

- A. to Explant.
- B: to+7j. Gonflement axillaire , feuilles écailleuses , émergence d'une racine.
- C: to+12j. Protubérance axillaire , sortie de la tige feuillée, formation de la deuxième racine.
- D: to+17j. Développement de l'axe anthocyané et de la première feuille , formation d'une nouvelle racine.
- E: to+24j. Apparition du premier noeud , première feuille épanouie , allongement racinaire.
- F: to+40j. Développement de l'axe anthocyané, mise en place de la deuxième feuille, renforcement racinaire.



Premiers stades de développement de D. esculenta cv' SEA 97', cultivé in vitro et issu de microbouturage.

A: to Explant.

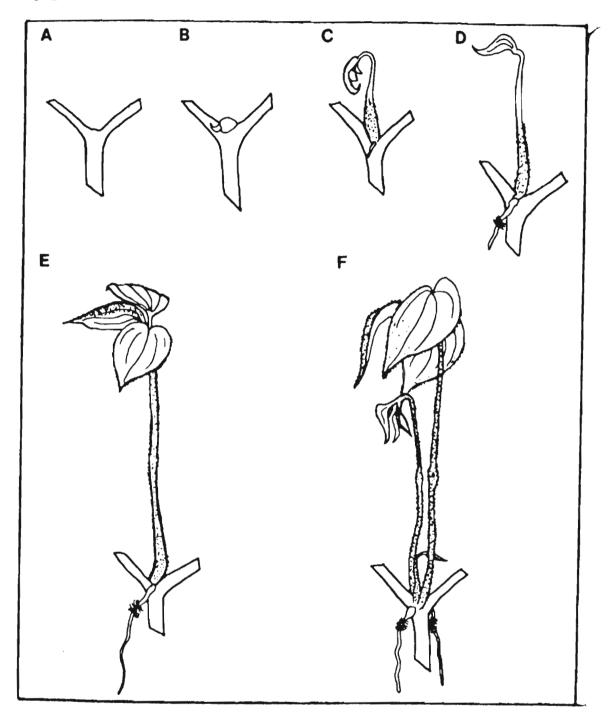
B: to+14j. Gonflement axillaire, feuilles écailleuses.

C: to+21j. Apparition de la première racine et des premières feuilles.

D: to+28j. Sortie de la tige feuillée, allongement racinaire.

E: to+40j. Apparition du premier noeud et d'une nouvelle feuille.

F: to+56j. Développement foliaire en rosette, allongement et ramification racinaire.



Premiers stades de développement de D. dumetorum , cultivé *in vitro* et issu de microbouturage.

A: to Explant.

B: to+7j. Gonflement axillaire, feuilles écailleuses.

C: to+14j. Mise en place de l'axe feuillé, émergence d'une racine.

D: to+21j. Développement de l'axe principal, première feuille non épanouie.

E: to+28j. Allongement de l'axe principal , première feuille trilobée épanouie.

F: to+42j. Apparition du premier noeud, formation de deux autres tiges feuillées, prolifération racinaire.

3.1.1.2. Discussion

Les microboutures nodales sont des organes de multiplication végétative qui font intervenir des bourgeons préformés. Leurs fonctionnement artificiels lors de la mise en culture in vitro créent des sites de néoformation. Les parties proméristématiques entrent en action après la rupture des corrélations et des inhibitions existant dans la plante entière et donnent naissance à une prolifération tissulaire. Cette protubérance axillaire s'avère le passage obligatoire de toute germination d'organe végétatif chez l'Igname (DEGRAS, 1982). Elle est l'équivalent du primary nodal complex (FERGUSSON, 1973) qui dérive de l'hypocotyle après germination et du prétubercule, organe de liaison entre le tubercule mère et le tubercule fils. Elle comprend d'après DEGRAS, 1982:

- un apex organisé au milieu d'ébauche;
- un massif hypertrophié et vascularisé;
- des ébauches et des pointements de racines.

Les conditions écologiques particulières de la culture *in vitro* peuvent entraîner des modifications du comportement morphogénétique.

- a) Sur le plan morphologique, cela se traduit chez l'igname, comme chez de nombreuses plantes cultivées in vitro telles que la vigne (NOZERAN et BANCILHON, 1972), les citrus (BOUZID, 1975), la pomme de terre (GRENAN, 1976), par une miniaturisation et un rajeunissement. On peut le remarquer, outre par la réduction de taille des divers organes, par la phyllotaxie particulière des ignames in vitro. Les feuilles sont uniquement alternes. D'autre part, l'étude menée par ESPIAND en 1983 sur l'anatomie des ignames cultivées in vitro, apporte la preuve d'une diminution du nombre des faisceaux conducteurs ainsi que du nombre de cellules du tissu médulaire chez D. alata cv Tahiti'. Plusieurs facteurs pourraient être à l'origine de ces phénomènes d'après NOZERAN et coll. 1977:
 - les conditions écologiques ;
 - la diapause liée à l'implantation in vitro;
 - la réduction de la taille du territoire assurant la nouvelle morphogenèse.
- b) Sur le plan physiologique, certaines modifications sont remarquables. Notamment, la capacité d'enracinement est beaucoup plus grande in vitro qu'in vivo. L'enracinement de boutures classiques s'observe en serre au bout d'une quinzaine de jours chez D. cayenensis cv 'Krengle' (BUFFARD-MOREL et TOURE, 1980) tandis qu'il s'observe après 5 jours seulement in vitro. Pour D. alata, l'apparition des racines est encore plus précoce; dans les deux jours qui suivent le microbouturage, deux racines adventives apparaissent en situation opposée.

Les qualités naturelles de multiplication végétative des ignames s'expriment pleinement in vitro sur des milieux sans régulateur de croissance. Les coefficients de multiplication permettent d'obtenir entre 1.000.000 et 2.000.000 de vitroplants selon l'espèce en un an.

3.1.2. Comparaison de la cinétique de croissance de 4 ignames microbouturées sur M50

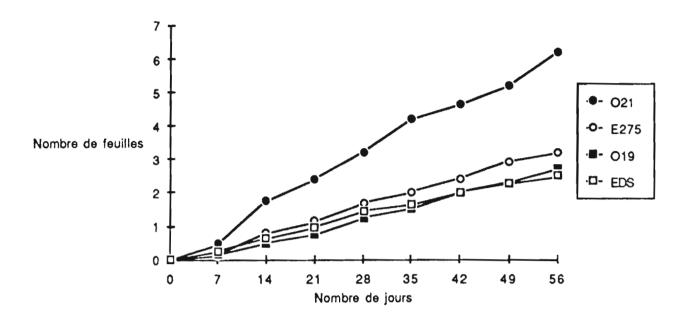
Les graphiques 1 et 2 représentant la croissance in vitro des espèces alata cv 'Florido' (clone 021), cayenensis cv 'Kponan' (clone E275), esculenta cv 'Sea 97' (clone 019), et dumetorum (clone EDS), font apparaître différents éléments:

- a) La croissance des ignames in vitro est linéaire quelle que soit l'espèce. En effet, les courbes d'évolution du nombre de feuilles au cours du temps se confondent avec des droites. Les coefficients directeurs de ces droites représentent donc la vitesse moyenne de mise en place des feuilles et des noeuds (plastochronie) et permettent de comparer le développement des différentes espèces.
- b) La différence de croissance entre le clone 021 et les autres est nette. La vitesse d'émission foliaire est de 0,8 feuille par semaine pour le clone 021 alors qu'elle est comprise entre 0,3 et 0,4 seulement pour les trois autres (La différence de production en un an est égale 4^{15,2} 2^{15,2}) La rapidité de l'organogenèse est une qualité générale des alata, elles répondent le mieux aux conditions in vitro.
- c) L'espèce cayenensis qui possède la même architecture que l'espèce alata, a une vitesse de croissance souvent réduite de moitié par rapport à cette dernière.
- d) Les clones 019 et EDS sont ceux qui produisent le moins de pousses feuillées. Il faut attendre 42 jours pour obtenir 2 feuilles! La caulogenèse est toujours en avance sur la rhizogenèse chez les esculenta mais elle produit des feuilles souvent petites. Malgré un démarrage difficile (rhizogenèse tardive), le clone 019 rattrape le niveau d'EDS après 6 semaines (graphique 1). Sa production foliaire sera ensuite toujours supérieure avec 0,35 feuille par semaine tandis que le clone EDS produit 0,3 feuille par semaine en moyenne.

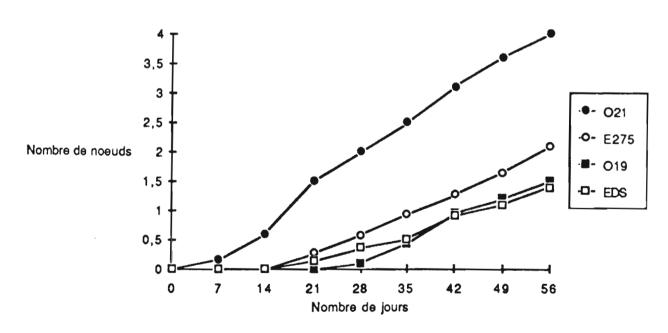
Les espèces alata et dumetorum, toutes deux sujettes à la phénolisation, ont le meilleur comportement in vitro; la rhizogenèse et la caulogenèse sont rapides. La vigueur des dumetorum s'exprime par leur hauteur même s'ils présentent un nombre de feuilles réduit tandis que les alata ont un développement foliaire fourni.

Des problèmes de lenteur de croissance sont apparus sur les espèces cayenensis et esculenta. Leurs qualités de multiplication végétative sont moindres ce qui se traduit par une rhizogenèse et une caulogenèse difficiles, et par une plastochronie assez lente. Le milieu M50, sur lequel a été menée cette expérience pourrait ne pas convenir à ces deux espèces et limiter leur développement.

GRAPHIQUE 1:COURBES DE CROISSANCE DES CLONES O21,E275,O19,EDS SUR M50



GRAPHIQUE 2:COURBES DE CROISSANCE DES CLONES O21,E275,O19,EDS SUR M50



3.1.3. Influence du milieu

3.1.3.1. Relation entre l'appareil aérien et l'appareil racinaire

D. alata cv 'Florido', D. cayenensis cv 'Kponan', D. esculenta cv 'Sea 97', D. dumetorum ont été mis en culture sur un même milieu M50 et placés dans les mêmes conditions. Cependant, pour des raisons épigéniques (modification de l'expression du génome), des différences de maturation sont apparues au sein d'une même population. On peut ainsi remarquer que parmi l'effectif mis en culture, les vitroplants présentant le meilleur développement sont ceux qui ont la plus grande surface racinaire. Outre les facteurs génétiques qui régissent l'organogenèse et la morphogenèse, des facteurs trophiques interviennent dans la croissance des vitroplants.

Les courbes de corrélation entre la longueur racinaire et le nombre de feuilles (graphiques 3, 4, 5, 6) mettent en évidence le rôle des facteurs nutritionnels. En effet, la croissance des parties aériennes est fortement tributaire de l'enracinement des vitroplants et par cela de la quantité d'éléments nutritifs disponibles aux racines. Les coefficients de corrélation qui sont compris entre 0,8 et 0,9 font preuve de la relation étroite qui existe entre l'appareil aérien et racinaire.

D'autres enseignements peuvent être tirés de ces courbes :

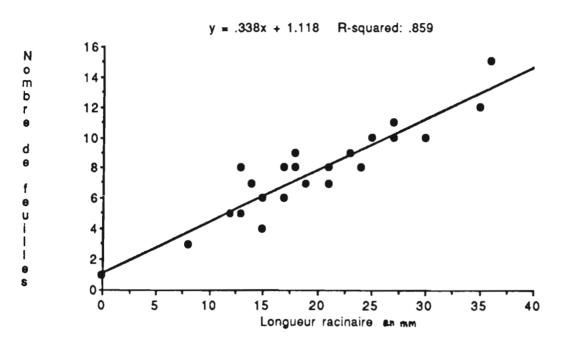
- a) La caulogenèse est en avance sur la rhizogenèse pour toutes les espèces. Cela se dénote sur les courbes par une ordonnée plus ou moins proche de 1 en 0. Cela peut expliquer la petitesse des feuilles des esculenta chez lesquelles la rhizogenèse tardive limite le développement caulinaire qui ne repose, au départ que sur les échanges entre l'explant et le milieu.
- b) La valeur du coefficient directeur des courbes de corrélation reflète l'importance de l'appareil racinaire par rapport à ceux de l'appareil aérien. Plus la pente de la droite est faible plus le système racinaire est bien établit. Ainsi, les clones EDS et 021 pour lesquels les coefficients sont respectivement de 0,16 et 0,33, produisent un réseau racinaire fourni. Cela explique leur vigueur in vitro et confirme le fait qu'ils répondent le mieux à la culture in vitro.

La corrélation existant entre la longueur racinaire et le nombre de feuilles laisse supposer que l'influence du milieu sur la cinétique de la morphogenèse peut être assez grande.

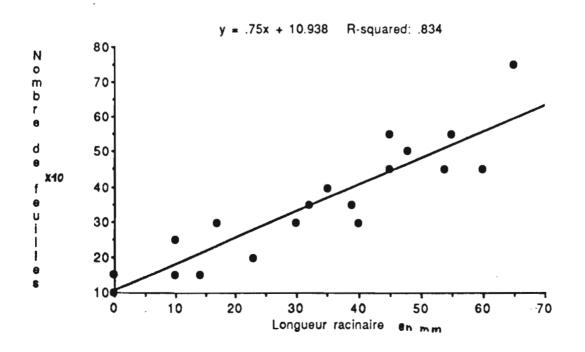
3.1.3.2. Comparaison de la croissance de 2 ignames microbouturées sur M50 et 401b.

M50 (tableau 6) et 401b (tableau 8) sont deux milieux couramment utilisés pour le maintien de la vitrothèque d'igname. Il semble donc intéressant de comparer l'effet de ces deux milieux sur la croissance. D. alata cv 'Namassou Blanc' (clone 01) et D. cayenensis cv 'Kponan' (clone E275) ont été mis en culture en tube parallèlement sur M50 et 401b. Ces deux milieux diffèrent par la composition et la concentration des composés organiques et par la présence ou l'absence de charbon actif.

GRAPHIQUE 3 : COURBES DE CORRELATION ENTRE LA LONGUEUR PACINAIRE ET LE NOMBRE DE FEUILLES CHEZ D. ALATA CV 'FLORIDO'.



GRAPHIQUE 4 : COURBES DE CORRELATION ENTRE LA LONGUEUR RACINAIRE ET LE NOMBRE DE FEUILLES CHEZ D. ESCULENTA CV 'SEA 97'.



Simple - Y: Nombre de feuilles X: Longueur racinaire

DF:	R-squared:	Std. Err.:	Coef. Var.:	
19	.737	10.991	25.862	7

Beta Coefficient Table

Parameter:	Value:	Std. Err.:	Variance:	T-Value:	
INTERCEPT	17.168	4.33	18.749	3.965	
SLOPE	1.723	.243	.059	7.106	\Box

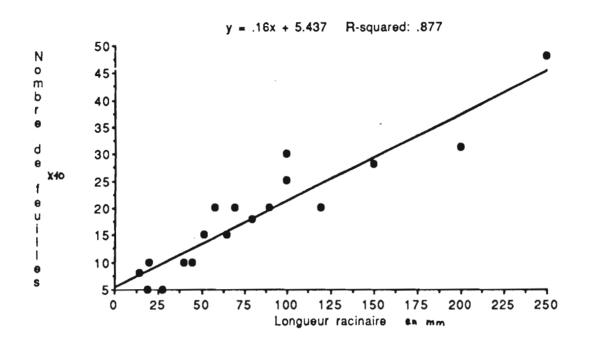
Analysis of Variance Table

Source	DF:	Sum Squares:	Mean Square:	F-test:
REGRESSION	1	6100.477	6100.477	50.498
RESIDUAL	18	2174.523	120.807	p ≤ .0001
TOTAL	19	8275		

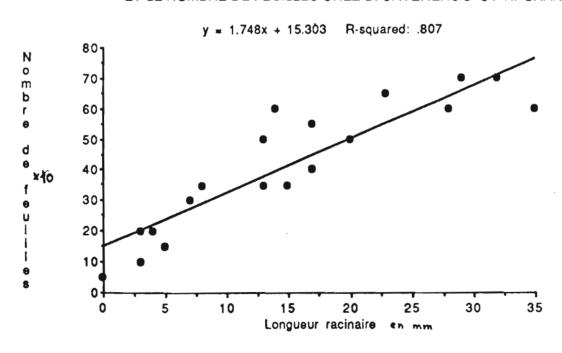
Residual Information Table

SS[e(i)-e(i-1)]:	e ≥ 0:	e < 0:	DW test:
3563.224	9	11	1.639

GRAPHIQUE 5 : COURBES DE CORRELATION ENTRE LA LONGUEUR RACINAIRE ET LE NOMBRE DE FEUILLES CHEZ D. DUMETODUM.



GRAPHIQUE 6 : COURBES DE CORRELATION ENTRE LA LONGUEUR RACINAIRE ET LE NOMBRE DE FEUILLES CHEZ D. CAYENENSIS CV 'KPONAN'.



Les graphiques 7 et 8 représentent la croissance comparée des clones 01 et E275 sur ces deux milieux. Il ne ressort, à la vue de ces graphiques, aucune différence significative de croissance. Les intervalles de confiance se recoupent, les deux populations ne sont pas vraiment distincts. On peut cependant noter la constante supériorité de la courbe M50 sur celle de 401b. Cette tendance peut s'expliquer par la dose de sucre qui est de 5% pour M50 et de 3% pour 401b ou par l'action adsorbante du charbon. Cette dernière est à nuancer car les clones 01 et E275 n'ont pas été sujets à une phénolisation prononcée.

Nous avons poursuivi en menant l'étude sur un seul clone et en élargissant l'essai à deux autres milieux.

3.1.3.3. Comparaison de la croissance de *D. alata* cv 'Florido' microbouture en bocaux sur M50, 401b, B4 et E2.

Dans le but de mettre en évidence l'effet du milieu, nous avons choisi un clone à croissance rapide et sujet à la phénolisation (021) et l'avons mis en culture en bocaux sur M50, 401b, B4 et E2.

Le graphique 9 représente l'évolution du nombre de feuilles du clone 021 au cours du temps sur les 4 milieux précités. On peut constater les différences de croissance du clone 021 suivant le milieu de culture.

Le milieu M50 assure une croissance plus rapide que les trois autres. La richesse et l'équilibre des macroéléments MS ainsi que la dose de sucre conviennent parfaitement au développement du clone 021. La plus grande amplitude s'observe après 30 jours entre M50 et E2, elle atteind 2 feuilles. Le coefficient de multiplication est réduit d'autant après 5 semaines de culture *in vitro*. Cela ne va pas sans conséquence sur la production annuelle de vitroplants, car au lieu de 2.000.000 de vitroplants, on en obtiendrait seulement 1500 sur E2.

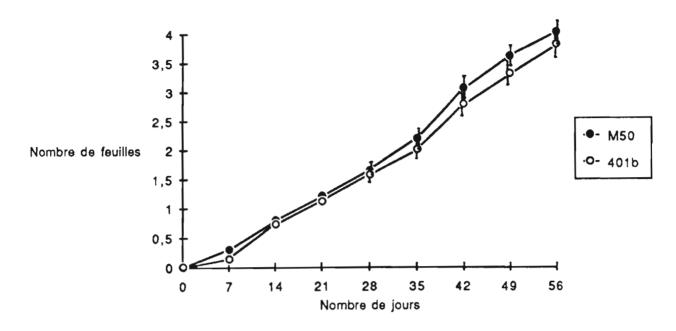
La faiblesse du milieu E2 (tableau 9) se situe dans les macroéléments de KNOP qui sont pauvres comparé aux macroéléments de MURASHIGE et SKOOG. La présence d'ANA à la concentration de 1 mg/l a un effet stimulant sur la rhizogenèse. Les vitroplants présentent de longues racines, anormalement développées et ramifiées mais cela ne suffit pas à améliorer la plastochronie.

La dose de sucre est pour une grande part responsable du léger retard de croissance enregistré sur 401b par rapport à M50. Son rôle est important car il fournit à la plante des restes de glucose et fructose qui entrent dans la constitution des parois cellulaires mais qui sont également les composés initiaux de la glycolyse. Le charbon qui agit en fixant les composés phénoliques contribue au meilleur développement du vitroplant sur M50.

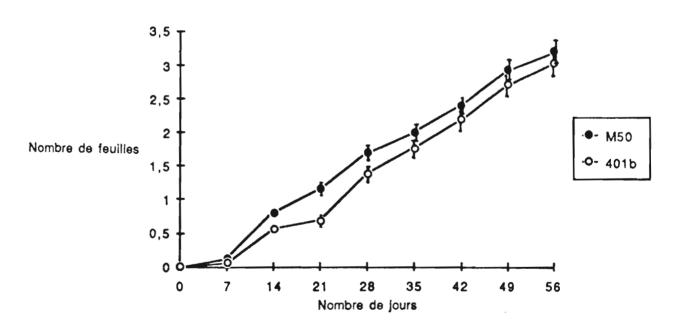
Le milieu B4 (tableau 7) ne semble pas particulièrement favorable à la croissance accélérée du clone 021. Malgré la présence de charbon, de nombreux composés organiques, et de régulateurs de croissance, il est moins performant que M50 et 401b. Deux raisons principales peuvent l'expliquer:

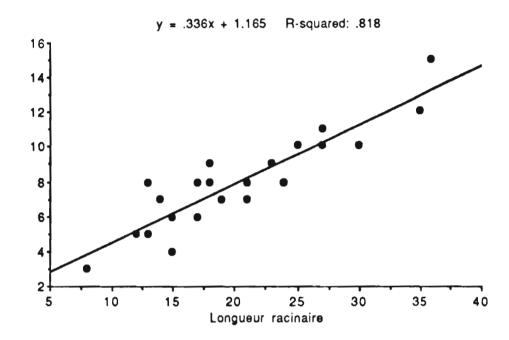
- l'action fortement atténuée du 2,4-D par la présence de charbon. En effet, celui-ci adsorbe tous les composés cycliques et le 2,4-D n'y échappe pas. On estime qu'il est piégé à 90 %;

GRAPHIQUE 7 : COURBES DE CROISSANCE DU CLONE O1 SUR M50 ET 401b



GRAPHIQUE 8 : COURBES DE CROISSANCE DU CLONE E275 SUR M50 ET 401b





ZOEbr

đ

- le déficit en azote des macroéléments de MURASHIGE et SKOOG modifié (MSM tableau 3). La concentration d'azote totale passe de 60 mM pour le MS à 22 mM pour le MSM. Cette forte baisse est à l'origine des différences de croissance enregistrées sur M50 et B4.

3.1.3.4. Conclusion

Le laboratoire de Biotechnologie à l'ORSTOM d'Adiopodoumé cherche à mettre au point deux ou trois milieux de microbouturage convenant à toutes les espèces. Dans ce but nous avons testé 4 milieux sur D. alata cv 'Florido' et montré que le milieu M50 de composition relativement simple (sans phytohormones) est le plus performant pour cette espèce. Les qualités de multiplication végétative dont fait preuve les alata ne se retrouvent pas chez les esculenta et les cayenensis. Des milieux particuliers à ces espèces restent à mettre au point. Il serait intéressant d'additionner aux milieux M51 et 401b des régulateurs de croissance afin de trouver un équilibre auxine/cytokinine stimulant la rhizogenèse et la caulogenèse. Une gibberelline pourrait également être ajoutée dans le cas des esculenta qui présentent des entre-

3.1.4. Influence du contenant

Nous avons mis en culture deux alata cv 'Florido' (021) et cv 'Forestero' (P2), une esculenta cv 'Sea 97' (019) et une dumetorum (EB4) parallèlement en tube et en bocaux. Le milieu M5O a été choisi pour cette expérience. Les bocaux contiennent 9 explants.

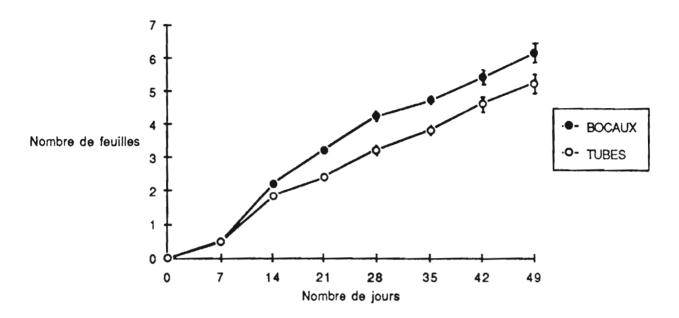
Les graphiques 10 et 11, représentant l'évolution du nombre de feuilles des clones 021 et P2 au cours du temps, font apparaître une différence marquée de la croissance selon la forme du contenant.

Les vitroplants cultivés en tubes accusent un retard de croissance d'une feuille en moyenne sur ceux cultivés en bocaux. Cette différence se met en place dans les 4 premières semaines et reste ensuite constante. A cela s'ajoute une autre constatation; les feuilles sont toujours beaucoup plus grandes en bocaux. La surface foliaire moyenne est de 6 cm² environ chez le cv 'Florido' en bocaux alors qu'elle est de 3 cm² seulement en tubes.

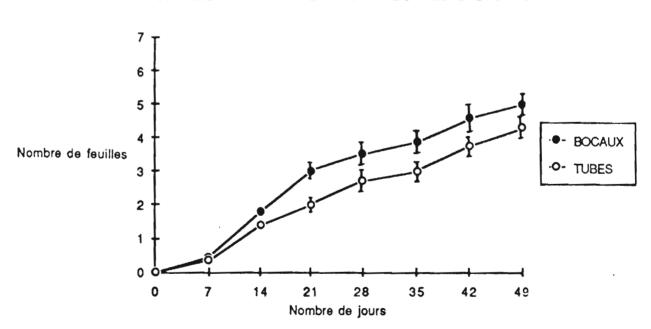
Il est donc indéniable qu'un effet d'encombrement stérique intervient avec l'emploi de tubes pour le microbouturage des alata. Celui-ci explique la diminution des surfaces des limbes foliaires et du nombre de feuilles. Le diamètre réduit des tubes à essai (diam. 2,6 cm) est un obstacle au développement, il provoque une compétition des feuilles pour l'espace et la lumière qui nuit à leur épanouissement.

Il faut également noter que les bocaux bénéficient d'un effet serre (CHASSERIAUX, 1986). Le verre et les matières plastiques absorbent une partie du rayonnement ce qui rehausse la température à l'intérieur des bocaux. La vitesse de croissance élevée en bocaux est attribuée à cet effet serre qui agit en activant la vitesse des réactions métaboliques.

GRAPHIQUE 10: COURBES DE CROISSANCE DU CLONE 021 SUR M50



GRAPHIQUE 11: COURBES DE CROISSANCE DU CLONE P2 SUR M50



Les graphiques 12 et 13, représentant les courbes de croissance des clones 019 et EB4, montrent que la différence de croissance est plus nuancée pour les espèces esculenta et dumetorum

Les vitesses de croissance en tube et en bocaux ne différent pas énormément chez les *esculenta*. Les intervalles de confiance se recoupent par endroits mais il existe une réelle tendance à l'accélération de la croissance en bocaux. La lenteur de croissance des *esculenta* ne permet pas de la mettre en évidence de manière significative.

Le clone EB4 présente un nombre de feuilles d'abord égal en tubes et en bocaux puis toujours supérieur en bocaux. Cette différence apparaît et s'amplifie progressivement au cours du temps, sans jamais excéder une feuille. Cependant, le nombre moyen de feuilles du clone EB4 est de 2,8 à 49 jours tandis qu'il est de 6 à la même date par le clone 021. La différence de croissance représente alors en population 21 % de l'émission foliaire chez D. dumetorum et 15 % chez D. alata cv 'Florido'. L'effet serre a joué un rôle qu'il faudra prendre en compte dans une optique de multiplication végétative accélérée à un stade préindustriel.

Nous avons travaillé avec en moyenne 9 vitroplants par bocal. Le facteur densité n'est pas à négliger car des expériences préliminaires ont montré que l'effet du contenant s'estompait quand la densité augmentait. Ainsi, le développement à la densité de 15 explants par bocal est équivalent au développement en tubes chez D. alata cv 'Brazo Fuerté'.

3.1.5. Conclusion

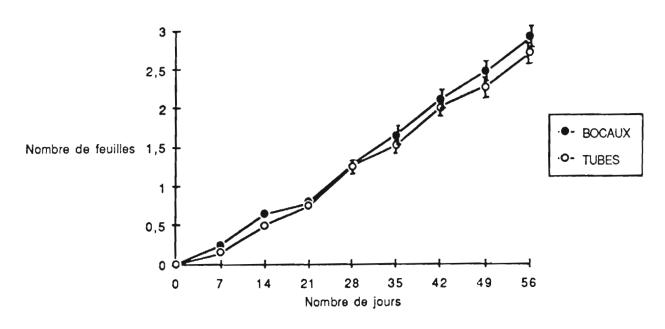
Nous venons de voire combien le choix d'un milieu et d'un contenant détermine la réussite en culture in vitro. Il est primordiale dans le cadre d'une production soutenue. Ce choix est au point pour l'espèce alata avec l'emploi du milieu M50 et des bocaux. Le microbouturage ainsi maîtrisé, permet d'alimenter le programme protoplaste qui s'appuie sur le matériel végétal produit.

Il semble que le milieu M50 convienne également très bien aux dumetorum dont la hauteur excessive pose cependant un problème de contenant. La première feuille atteint le sommet du tube après 45 jours alors que le vitroplant possède tout juste un nœud. Des produits nanifiants, antagonistes des gibbérellines, qui freinent l'élongation des entre-nœuds tels que l'acimydal ou le chlorure de chlorocholine pourraient être essayés afin d'augmenter leur taux de multiplication.

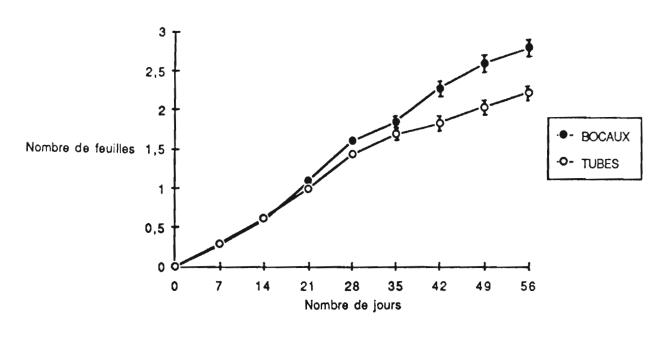
En ce qui concerne les espèces cayenensis et esculenta, peu de travaux en culture in vitro ont été faits. Des milieux plus appropriés à ces espèces devraient améliorer leur comportement in vitro.

La meilleure connaissance de la morphogenèse et de la cinétique de croissance des ignames in vitro est un instrument indispensable à la gestion de la vitrothèque. Elle permet de faire des prévisions à court terme et d'adapter les milieux et les contenants aux particularités de chaque espèce.

GRAPHIQUE 12 : COURBES DE CROISSANCE DU CLONE O19 SUR M50



GRAPHIQUE 13: COURBES DE CROISSANCE DU CLONE EB4 SUR M50



3.2. Le sevrage

3.2.1. Introduction

Le sevrage est le passage des conditions aseptiques de la culture in vitro aux conditions naturelles de culture des ignames. Ce passage doit se faire par étapes en prenant de multiples précautions afin de ne pas risquer de perdre les plants fragilisés par la culture in vitro.

Dans le cadre d'une production de vitroplants envisagée par le laboratoire à moyen terme, nous avons expérimenté le sevrage de 4 espèces : D. alata cv 'Namassou Blanc', D. dumetorum, D. cayenensis cv. 'Kponan', D. esculenta. Les espèces alata et dumetorum ont été sevrées après 9 semaines de culture in vitro. Elles présentaient alors un développement jugé suffisant pour les repiquer en miniserre. La faiblesse du système racinaire nous a obligé d'attendre deux semaines supplémentaires pour les variétés esculenta.

3.2.2. Résultats et discussion

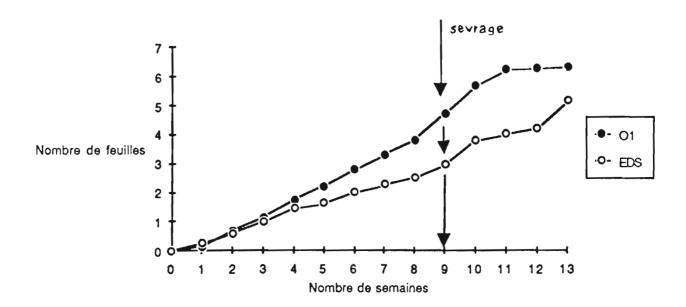
3.2.2.1. Acclimatation et reprise

Nous avons obtenu 100% de reprise chez les alata, dumetorum et cayenensis et avons perdu un plant chez les esculenta. Le sevrage est donc réussit et ne semble pas poser de problèmes majeurs. L'atmosphère saturée en vapeur d'eau des miniserres est proche de celle des tubes in vitro et a permis une bonne acclimatation progressive des plants. La miniserre a été ensuite entrouverte une semaine après le repiquage. Le couvercle a été supprimé deux semaines plus tard. La terre du Bandama mélangé au parche de noix de coco convient très bien aux vitroplants repiqués. La stérilisation a évité toutes attaques prématurées de microorganismes. Le parche de noix de coco en allégeant et en aérant la terre a joué un rôle important en raison de la fréquence des arrosages et de la forte humidité du sol. Les 4 espèces ont fait preuve d'une grande vivacité et d'une grande capacité d'adaptation. Certains vitroplants des espèces esculenta et cayenensis ne présentaient au repiquage qu'une ou deux faibles racines. C'est la raison pour laquelle nous avons perdu un plant de l'espèce esculenta. Pour plus de sécurité et de facilité, il faudrait à l'avenir attendre une quinzaine de semaines pour les espèces esculenta et cayenensis à moins d'améliorer leurs organogenèse in vitro et une dizaine de semaines pour les espèces alata et dumetorum.

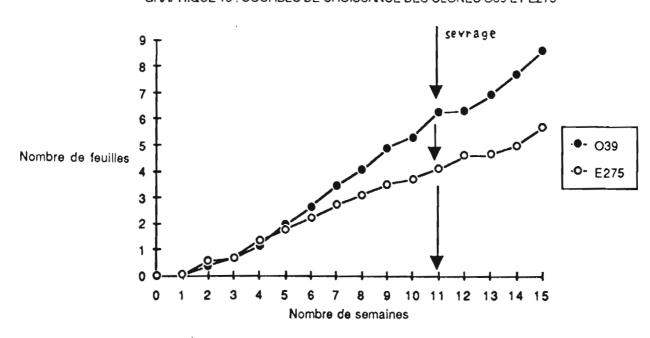
3.2.2.2. Croissance après repiquage

Les graphiques 14 et 15 représente l'évolution du nombre de feuilles des clones 01, EDS, 039, E275 au cours du temps, avant et après le sevrage. On retrouve la croissance linéaire des 4 espèces pendant la période in vitro. La plastochronie est alors de 0,5 et 0,34 feuille par semaine pour les clones 01 et EDS. Elle est de 0,6 et 0,4 feuille par semaine pour les clones 039 et E275.

GRAPHIQUE 14: COURBES DE CROISSANCE DES CLONES O1 ET EDS



GRAPHIQUE 15: COURBES DE CROISSANCE DES CLONES 039 ET E275



On remarque l'irrégularité des courbes qui apparait immédiatement après le sevrage. L'acclimatation en miniserre est marquée dans les premiers temps par une phase de latence qui est plus ou moins accentuée selon les clones. Cette phase n'apparait pas exactement au même moment pour tous les clones, elle est immédiate dans le cas de D. esculenta cv. 'Sea 97' tandis qu'elle se manifeste une semaine après le passage en miniserre chez D. dumetorum et D. cayenensis cv. "Kponan". La durée de cette phase varie de une à deux semaines et rend peut être compte de la faculté d'acclimatation des différents clones.

On peut supposer que cette période correspond à un remaniement des équilibres physiologiques engendrés par les nouvelles conditions écologiques. En particulier, la photosynthèse ralentie *in vitro* par la présence de sucre dans le milieu, doit se rééquilibrer et fournir tous les substrats carbonés dont la plante a besoin. D'autre part, le système racinaire accoutumé au milieu gélosé n'est pas capable d'absorber immédiatement les éléments minéraux disponibles dans la terre. Le développement est par conséquent freiné pendant cette période de remaniement ce qui crée la phase de latence.

A la suite de cette phase, l'émission foliaire reprend de manière plus intensive. En effet, la plastochronie passe de 0,34 in vitro à une feuille par semaine en miniserre pour le clone EDS, de 0,6 à 0,8 feuille par semaine pour le clone 039 et de 0,4 à 0,5 feuille par semaine pour le clone E275 (graphiques 14 et 15). Les conditions naturelles de culture permettent à la plante d'exprimer pleinement sa capacité morphologique. En ce qui concerne le clone 01, l'interprétation des courbes est faussée car les plants sont atteints d'une virose qui entrave fortement leur développement.

3.3. La callogenèse

3.3.1. Introduction

Nous avons testé deux espèces en vue d'obtenir des proliférations tissulaires d'igname. Les cals qui sont constitués de cellules indifférenciées en divisions mitotiques, seraient particulièrement intéressant pour le programme que développe le laboratoire. En effet, les cals permettent de mettre en place des suspensions cellulaires qui seraient un matériel végétal idéal pour obtenir des protoplastes.

Des travaux ont déjà été effectués sur la callogenèse d'igname à partir de tubercules chez D. deltoïdea (ABROSHNIKOVA et al., 1971, CHATURVEDI et CHOWDURY, 1980), d'hypocotyles chez D. detloïdea (GREWAL et ATAL, 1976), à partir de noeuds chez D. composita (OATEGA-PACHECO, 1970). En nous appuyant sur ces travaux, nous avons essayé plusieurs milieux pour induire la callogenèse.

3.3.2. Les milieux de callogenèse

M51 a été pris comme milieu de base auquel des régulateurs de croissance ont été ajoutés. Pour D. alata cv 'Florido', trois concentrations en 2,4-D ont été testées: 6 mg/l, 12 mg/l, 15 mg/l tandis que la kinétine reste à 1 mg/l. Pour D. cayenensis cv 'Krenglé', le 2,4-D a été utilisé plus modérément avec 4 mg/l et 8 mg/l en association avec 1 mg/l de kinétine. Nous avons ajouté aux milieux de callogenèse de D. alata cv 'Florido' un fixateur des phénols: le polyvinylpyrrolidone (PVP) à la concentration de 0%, 0,5%, 2%.

3.3.3. Résultats

3.3.3.1. D. alata cv. 'Florido'

Les milieux contenant 12 mg/l et 15 mg/l de 2,4-D n'ont donné aucun cal. La dose trop élevée de 2,4-D qui est une auxine forte a été toxique. La callogenèse difficile à obtenir sur des monocotylédones et notamment sur l'igname justifiait ces essais de concentration.

Seul le milieu M51 additionné de 6 mg/l de 2,4-D et 1 mg/l de kinétine a donné des résultats. Vingt à trente jours après l'ensemencement, le cal se développe à partir du gonflement axillaire que l'on observe lors d'un microbouturage tandis que l'extrémité sectionnée de l'explant inséré dans le milieu rejette des composés phénoliques qui s'oxydent et brunissent le milieu. Le tableau 10 présente les résultats obtenus sur ce milieu deux mois après ensemencement. Nous avons uniquement compté les cals susceptibles d'être repiqués et avons obtenu 47 % de callogenèse. Ce résultat a été obtenu indifféremment à l'obscurité et à la lumière signifiant que le rôle de cette dernière dans l'induction du phénomène n'est pas primordiale. Par ailleurs, que ce soit à la lumière ou à l'obscurité, les cals d'ignames sont de couleur blanchâtre. Des cals chlorophyliens n'ont jamais été obtenus.

L'influence du PVP est difficilement interprétable mais il ne semble pas avoir un effet vraiment marqué. On peut cependant noter que la phénolisation toujours existante chez les alata est localisée en présence de PVP. On observe une tache noire se répartissant autour de l'explant tandis que les composés phénoliques oxydés diffusent dans tout le milieu en l'absence de PVP.

La phénolisation est l'obstacle principale à la formation des cals chez D. alata cv. 'Florido'. Tous les milieux se sont noircis du fait de la libération de composés phénoliques qui s'oxydent en contact de la polyphénol oxydase présente dans le cytoplasme, inhibant ainsi toute prolifération cellulaire. La moitié des explants n'ont pu évoluer, ils se sont nécrosés. Les cals que nous avons obtenus sont difficilement exploitables, ils sont souvent petits et nécrosés. Les meilleurs sont noduleux, non friables et par conséquent difficiles à passer en suspension.

3.3.3.2. D. cayenensis cv 'Krenglé'

Nous avons voulu prendre un matériel végétal moins sujet à la phénolisation et encore inexpérimenté.

Le tableau 11 récapitule les résultats obtenus un mois après ensemencement. Le milieu contenant 6 mg/l de 2,4-D donne le meilleur pourcentage mais les milieux avec 4 mg/l et 8 mg/l sont néanmoins très proches. Les cals se sont développés à partir de la base du noeud et sont également blanchâtres. Il existe des cals de couleur rose chez les variétés comportant une forte pigmentation anthocyanée telle que D. alata cv 'Brazo Fuerté'. Autour de l'explant et sur le contour des cals se produit une légère phénolisation. L'observation a été réalisée un mois après ensemencement ce qui est un peu tôt pour prévoir l'évolution définitive des cals.

3.3.4. Conclusion - Discussion

Les screenings réalisés pour la détermination de milieux de callogenèse laissent penser que ces derniers sont plus ou moins au point. Avec des concentrations comprises entre 4 mg/l et 8 mg/l, nous avons obtenu des cals. Nos résultats sont cependant inférieurs à ceux obtenus sur D. alata cv 'Brazo Fuerté' et cv 'Florido' par FAUTRET en 1985. Ses travaux ne font pas mention de gros problèmes de phénolisation ce qui expliquerait la différence des réponses.

Des antioxydants du type acide ascorbique et acide citrique ont été essayés sans succès. Nous pensons néanmoins que la callogenèse peut être fortement améliorée en portant une plus grande attention à la qualité de l'explant.

Les proliférations tissulaires obtenues à partir de nœuds ont pour origine les bourgeons préformés présents dans cet organe à ce niveau ou l'apex dans le cas des derniers nœuds. Les massifs proméristématiques maintenus sous la dominance apicale chez les vitroplants entiers, entrent en division mitotique anarchique, sous l'effet du 2,4-D et de la levée des corrélations et inhibitions. Les forces de corrélation varient suivant le niveau du nœud dans le vitroplant et modifient la réactivité de l'explant. Cela s'est confirmé ultérieurement dans des expériences menées sur D. alata cv 'Florido'. Des nœuds ont été ensemencés en tenant compte de leur niveau de prélèvement sur le vitroplant. Il s'est avéré que les noeuds supérieurs étaient moins sujet à la phénolisation. Il pourrait exister un gradient décroissant des phénols dans la plante de la base vers le sommet. Cette hypothèse demande à être vérifiée sur un nombre significatif de vitroplants. Car les noeuds supérieurs, libérant moins de phénols, seraient plus à même de développer un cal, d'autant plus qu'ils sont également les derniers formés, donc les plus jeunes. La plus grande réactivité des matériaux végétaux juvéniles a souvent été démontrée en culture in vitro (NOZERAN 1977, MARGARA 1982, TARDIEU 1984).

TABLEAU 10 : APTITUDE A LA CALLOGENESE CHEZ D. alata cv FLORIDO

CONDITIONS DE CULTURE	MILIEUX (M51 + 2,4D 6mg/l +Kinétine 1mg/l)	EFFECTIF MIS EN CULTURE	NOMBRE DE CALS	% DE CALLOGENESE
LUMIERE	PVP 0%	7	2	
	PVP 0,5%	7	4	
	PVP 2%	7	4	
	TOTAL	21	10	47%
OBSCURITE	PVP 0%	7	4	
	PVP 0.5%	7	2	
	PVP 2%	7	4	
	TOTAL	21	10	47%

TABLEAU 11: APTITUDE A LA CALLOGENESE CHEZ D. cayenensis cv "KINGLE"

CONDITIONS DE CULTURE	MILIEUX (M51)	EFFECTIF	CALS	% DE CALS
LUMIERE	2,4 D 4 mg/l Kinétine 1 mg/l	16	8	50%
	2.4 D 6 mg/l Kinétine 1 mg/l	16	9	56%
	2,4 D 8mg/l Kinétine 1mg/l	19	8	47%

D'après MURASHIGE 1974, les caractéristiques de l'explant initial qui influencera ses capacités de callogenèse sont :

- l'espèce et le génotype de la plante mère

- l'âge et la position de l'organe sur la plante mère

-la nature de l'organe dont il est issu

- la taille de l'explant

- la préparation de la plante mère.

Nous venons de voir comment l'âge et la position de l'explant qui est dans notre étude le nœud pourraient modifier la réponse dans le sens d'une meilleure callogenèse.

En ce qui concerne la nature de l'organe, nous avons choisi arbitrairement le nœud car il nous semblait l'explant le plus susceptible de donner un cal, du fait qu'il contient des régions proméristématiques. MALAURIE et TARDIEU ont expérimenté divers explants qui se sont révélés "compétents": microtubercules, fragments de tiges, feuilles coupées transversalement. Les rondelles de microtubercules ont donné des cals qui se développent en périphérie peut-être à partir des tissus cambiaux responsables de la croissance en épaisseur du tubercule. Les fragments de tige comme les feuilles ont donné des cals blancs, friables. Toutes ces expériences ont été isolées et demandent à être lancées à grande échelle pour une étude

Dans le cas des noeuds, la taille de l'explant qui est d'un centimètre environ, semble bonne. Nous avons essayé de réduire la taille des explants en pensant augmenter l'influence du milieu sur les équilibres endogènes des noeuds et favoriser ainsi la callogenèse. La dimension trop réduite des nœuds n'a pas permit leur survie sur un milieu de callogenèse, ceux-ci se sont nécrosés dans un bain de phénol!

Quand au génotype, nous nous sommes penchés sur deux espèces d'origine différente. Les alata, originaires d'Asie, ont fait l'objet de nombreuses études tant morphogènes que callogènes, qui nous ont servis de base pour notre travail. L'espèce cayenensis, typiquement africaine, a très rarement été étudiée in vitro mais présente cependant des potentialités de callogenèse au moins équivalente à l'espèce alata.

De nombreuses possibilités sont offertes tant au niveau de l'explant que des espèces maintenues en vitrothèque, qui sont variées et d'origines diverses.

CONCLUSION GENERALE

La culture de l'igname se heurte à l'heure actuelle à de nombreuses difficultés tant agronomiques que phytosanitaires.

- La sélection par hybridation classique chez l'igname comestible est très limitée à cause de la déficience de leur appareil reproducteur. Le développement d'un programme d'amélioration génétique risque d'être confronté à de nombreux problèmes.
- Le besoin en main d'œuvre est énorme tout au long de l'année car il faut assurer la confection des buttes, le tuteurage de la parcelle, le désherbage régulier, et la récolte.
- L'emploi du tubercule comme organe de multiplication végétative nécessite qu'une partie de la récolte soit réservée à cet effet.
- L'hétérogénéité des tubercules au sein même d'une variété entrave toute mécanisation de la récolte et nuit à l'expansion de la culture qui reste localisée sur de petites parcelles entretenues familialement.
- Les maladies cryptogamiques comme l'antrachnose commence à se répandre et à occasionner des pertes. Plus graves encore, certaines ignames présentent des signes de viroses qu'il est impossible de combattre. Le tubercule semence transmettra obligatoirement la maladie. Ces viroses réduisent fortement la production annuelle.

La culture de tissus pourrait permettre d'échapper à ces contraintes. Un programme d'amélioration génétique a été lancé au laboratoire en vue d'obtenir des hybrides somatiques intra ou interspécifiques. Mais avant de pouvoir envisager une telle possibilité, il est nécessaire de maîtriser les différentes voies qui fournissent le matériel végétal nécessaire à l'obtention de protoplastes. C'est pourquoi, l'étude de la morphogenèse et de la callogenèse in vitro a retenu notre attention.

La morphogenèse des ignames in vitro apparaît donc très variable selon les espèces. L'espèce alata se démarque des autres par la rapidité de son organogenèse et sa plastochronie élevée. Les cayenensis ont une réponse plus irrégulière selon les cultivars mais possèdent une vitesse de croissance relativement lente. L'organogenèse semble difficile. Les esculenta se caractérisent par une architecture en rosette avec des entre-nœuds courts. La rhizogenèse est généralement tardive. L'espèce dumetorum se reconnait facilement par son aspect en touffe, ses feuilles trilobées et ses entre-nœuds exagérément longs.

Les essais de callogenèse sur D. alata cv. 'Florido' et D. cayenensis cv 'Krengle' n'ont pas été concluants. Ils demandent à être poursuivis et approfondis afin de régler les problèmes de phénolisation que nous avons rencontrés. Différentes approches sont possibles dans la mise au point de la callogenèse. En effet il faudra jouer sur la nature de l'organe ensemencée, son stade physiologique, son passé. Notamment, le nombre des repiquages qui augmentera au fur et à mesure de l'avancement des travaux, pourrait accroître la juvénilité du matériel et donc sa réponse aux conditions de culture.

D'autres voies de recherche sur l'igname présentent un intérêt certain et devront être exploitées :

- la production de semences artificielles in vitro par l'intermédiaire des bulbilles ou des embryons somatiques;
- la culture de méristèmes afin d'assainir les variétés cultivées virosées.

BIBLIOGRAPHIE

- ABROSHNIKOVA et al., 1971.- Kyltura tkanei D. deltoidea hak produtsentor steroidnyha saponidy senikov rastitelyne resersy, 7 (4): 517-524.
- BOUZID, 1975.- Quelques traits du comportement des boutures de Citrus en culture in vitro C.R. Acad. Sc. Paris, 280, Série D, 1689-1692.
- BUFFARD-MOREL et TOURE, 1980.- Multiplication végétative par bouturage de cultivars appartenant au complexe Dioscorea cayenensis, D. rotundata.

 Ann. Univer. Abidjan. Série C. Tome XVI: 285-249.
- BURKILL, 1960.- The organography and evolution of Dioscoreaceae, the family of yams.

 J. Linn. Soc. Bot. 56 (367): 419-412.
- CHASSERIAUX, 1986.- Contribution à l'étude du microclimat à l'intérieur des bocaux de culture *in vitro*. P.H.M.. Revue Horticole, n° 268 : 29-32.
- CHATURVEDI et CHOWDURY, 1980.- Effect of growth hormones and some nitrogen source on diosgenin biosynthesis by tuber callus of *D. deltoidea*.

 Indian J. exp. biol. 18 (99): 913-915.
- DEGRAS, 1982.- Igname. La reproduction végétative de l'igname : données fondamentales et applications récentes.

 Ed. by MIEGE et LYONGA, Colorado Press. Oxford : 60-87.
- ESPIAND, 1983.- Conséquences de la culture in vitro sur la morphogénèse de boutures nodales de l'igname (Dioscorea alata cv 'Tahiti').

 Thèse de 3ème cycle à l'Univer. Paris XI, Centre d'Orsay.

- FAUTRET, 1985.- Callogenèse et néoformation chez deux espèces d'ignames comestibles *Dioscorea alata* et *D. trifida*.

 Thèse de 3ème cycle à l'Univer. Sc. et Tech. du Languedoc.

 Montpellier II.
- FERGUSSON, 1973.- Tuber development in yams; physiological and agronomic implication. 3nd Int. Symp. Trop. Root Crops. Ibadan, Nigeria.
- GAUTHERET, 1939.- Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie de tissus de tubercule de carotte.

 C.R. Acad. Sc. 208: 118-120.
- GRENAN, 1976.- Analyse des phénomènes morphogénétiques posés par la multiplication végétative in vitro de la pomme de terre : Solanum tuberosum L. var. B.F. 15

 Thèse de 3ème cycle, Univer. Paris Sud, Centre d'Orsay.
- GREWAL & ATAL, 1976.- Plantlet formation in callus culture of *Dioscorea* deltoidea
 Indian J. exp. biol. 14 (3): 252-253.
- KAUL & STABA, 1967.- Dioscorea deltoidea Wall tissue cultures: I. Production and isolation of diosgenin. Lloydia; 30: 285.
- KAUL & STABA, 1969.- Dioscorea tissue cultures: III. Influence of various factors on diosgenin production by *Dioscorea deltoidea* callus and suspension cells.

 Lloydia, 32: 347-359.
- MARGARA, 1982.- Base de la multiplication végétative. INRA Versailles.
- MOREL & WETMORE, 1950.1-a- Tissue culture of Monocotyledones. Amer. J. Bot. 38: 138-140.
- MURASHIGE et SKOOG, 1962.- A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant., 15: 473-497.
- NOBECOURT, 1939.- Sur la perennité et l'augmentation du volume des cultures de tissus végétaux.

 C.R. Soc. Biol. 130: 1270-1271.
- NOZERAN & BANCILHON, 1972.- Les cultures in vitro en tant que technique pour l'approche des problèmes posés par l'amélioration des plantes.

 Ann. Amél. Plantes, 22: 167-185.
- NOZERAN et coll., 1978.- Polymorphisme des individus issus de multiplication végétative des végétaux supérieurs, avec conservation du potentiel génétique.

 Physiol. Végét. 16 (2): 179-194.

- ORTEGA -PACHECO, 1970.- Cultivo de tejidos obtienidos a partir del tuberculo de D. composita.

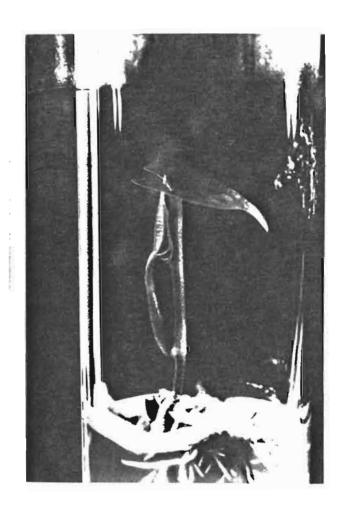
 In: Primer simp. Inter. sobre Dioscorea, Mexico, 5373.
- RAJNCHAPEL-MESSAI & GUERCHE, 1985.- Methodes in vitro et productions végétales.

 Biofutur, oct. 85, n° 39.
- RAO, 1969.- Tissue culture from bulbils of *Dioscorea sensibarensis*. Can. J. Bot. 47: 565-566.
- SADIK, 1976.- Proceeding of the fourth symposium of international Society for tropical root crops.

 IDRC 80. Edt. J. Cook, R. MacIntyre, M. Graham. 20-45.
- TARDIEU, 1984.- Régénération de blé (Triticum aestivum L.) à partir d'embryons cultivés in vitro. Influence du stade de développement et de l'état physiologique de l'embryon.

 D.E.A. de Biologie et Physiologie Végétale, Univ. Pierre et Marie CURIE, Paris VI.
- WHITE, 1939.- Potentially unlimited growth of excissed plants callus in artificial nutrient.

 Amer. J. Bot. 26: 59-64.



Microbouture de *Dioscorea alata* CV "FLORIDO"



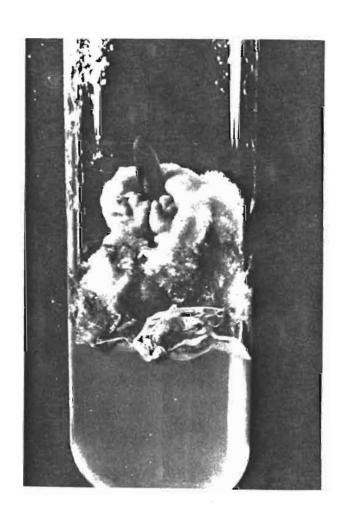
Rhizogenèse à la mise en culture sur bouture nodale (*D. alata*)



Dioscorea cayenensis-rotundata

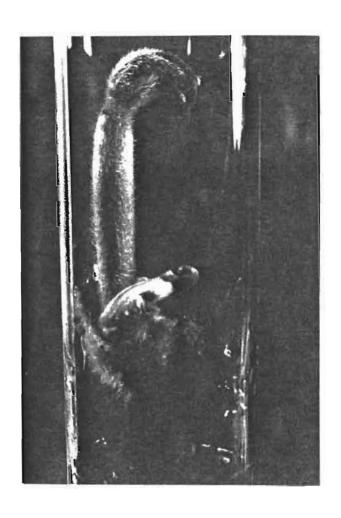
CV "KPONAN"

Développement à la mise en culture sur bouture nodale



Caulogenèse bloquée par un gonflement de la feuille écaille (*D. cayenensis-rotundata*)

Développement à la mise en culture sur bouture nodale



Dioscorea dumetorum

Développement à la mise en culture sur bouture nodale



Microbouture de *Dioscorea esculenta*CV "SEA 97"



Callogenèse spontanée sur noeud (*D. esculenta*)



Callogenèse spontanée sur feuille (*D. esculenta*)