

CALLOGENESE ET NEOFORMATION CHEZ DEUX ESPECES DE
DIOSCOREA COMESTIBLES : *D. ALATA* ET *D. TRIFIDA*

(*Callus formation and neoformation with two edible
Dioscorea species : D. alata and D. trifida*)

A. FAUTRET, P. DUBLIN et P. CHAGVARDIEFF

IRAT/CIRAD
B.P. 5035
Avenue du Val de Montferrand
34032 MONTPELLIER CEDEX FRANCE

RESUME La création d'une diversité génétique est nécessaire pour l'amélioration variétale des ignames. La sélection par hybridation est limitée par l'irrégularité ou même l'absence de fructification des clones cultivés. La régénération de cals permettait de contourner les difficultés rencontrées soit directement par production de variants d'intérêt agronomique, soit en fournissant du matériel de base apte à régénérer dans un programme d'hybridation somatique. Le but de ce travail est d'obtenir les conditions optimales de régénération des cals chez *Dioscorea alata* et *D. trifida*. Divers types d'explants prélevés sur des vitroplants en collection ont été étudiés pour leur aptitude à la callogénèse et à la néoformation. On s'est orienté vers le pétiole de jeune feuille. Des milieux de callogénèse, d'entretien des cals et de néoformation de tige ont été mis au point sur *D. alata*. Chez *D. trifida* des milieux de callogénèse et d'entretien des cals ont été mis au point mais aucune néoformation de tige n'a été obtenue. Cependant le développement de l'appareil végétatif et des cals de *D. trifida* étant beaucoup plus lent que celui de *D. alata*, il est possible que les délais de néoformation soient également plus longs. L'étude cytologique des néoformations à partir de cal montre que leur origine est pluricellulaire.

SUMMARY

Creation of genetic diversity is necessary for varietal improvement of yams. Selection by breeding is limited by irregularity and even non fructification of cultivated clones. Plantlets regeneration from callus would permit to get around encountered difficulties, either directly by production of agronomic variants, or in furnishing basic material able to regenerate in a somatic breeding program. The purpose of this work is to obtain optima conditions for regeneration from callus of *Dioscorea alata* and *D. trifida*.

Different kind of explants from vitroplants in collection have been studied for callus and neoformation aptitud. We were conducted to choose young leaf petiole.

Media for callus initiation callus maintaining, and shoot neoformation were defined for *D. alata*. With *D. trifida* media for callus initiation and callus maintaining were defined, but no shoot neoformation was obtained.

Mainwhile vegetative apparatus and calli development of *D. trifida* are slower than those of *D. alata*, it is possible that the neoformation delays must be also longer. Cytological study of neoformations shows a pluri cellular origin.

INTRODUCTION

L'amélioration variétale des ignames comestibles est limité par la très faible fécondité de ces espèces. Chez *D. alata*, la stérilité est presque totale (J.S. JOS et K. VIJAYA BAI, 1980 - IITA Annual Report 1979 et 1980). Cependant, les ignames qui ont été sélectionnés au cours des siècles dans un type de culture traditionnel doivent être considérablement modifiées pour s'adapter aux exigences d'une agriculture moderne mécanisée. La culture de tissus peut permettre d'obtenir une variabilité génétique ou épigénétique sans faire intervenir la reproduction sexuée.

L'objectif de ce travail est la mise en évidence de la capacité d'organogenèse chez *D. alata* et *D. trifida*. Chez de nombreuses espèces, les plantes néoformées à partir de cal présentent des variations somaclonales ; chez le maïs, la canne à sucre, le riz, la Pomme de Terre, la tomate, etc..., on a recherché et obtenu des variants présentant un intérêt agronomique (LARKIN et SCOWCROFT, 1981 ; SHEPARD et al., 1980 ; BRANCHARD, 1984). On peut espérer voir apparaître les mêmes types de variants chez l'igname. Les caractères que l'on cherche à améliorer et qui, chez d'autres espèces, ont présenté des variations intéressantes, sont :

1) La résistance à l'antracnose ; l'antracnose due à *Colletotrichum gloesporioides* est une des principales maladies foliaires qui affecte l'igname et plus particulièrement *D. alata* (BAUDIN, 1976 ; WINCH et al., 1984). Le mode d'action des *Colletotrichum* chez l'igname n'a pas été étudié, mais certains *Colletotrichum*, tels *C. lagenarium* produisent des toxines.

2) L'architecture de la plante ; c'est une liane qui doit être tuteurée. Le tuteurage est couteux et gêne la mécanisation des sarclages et de la récolte ; son absence aggrave l'antracnose et réduit les rendements (IITA Annual Report 1980). Il serait possible d'obtenir des variants à port plus compact.

3) Adaptation des tubercules à la mécanisation ; les tubercules d'igname présentent une grande hétérogénéité en taille et en forme. De plus, ils sont cassants et ont un épiderme fragile (VANDEVENNE et TOURTZEVITCH, 1977). On recherche des tubercules plus homogènes et moins fragiles.

4) Restauration de l'aptitude à la floraison : la plupart des ignames sont florifères et se reproduisent par graine. Il n'y a que quelques espèces alimentaires qui présentent des problèmes de fructification dans le genre *Dioscorea*. La perte de fertilité chez les espèces comestibles serait une conséquence de la domestication (COURSEY, 1976). Or des cycles successifs de callogenèse et régénération entraînent un rajeunissement de la plante et une régression vers des mécanismes ancestraux ou sauvages. On peut donc espérer atteindre un seuil où réapparaîtrait la floraison (DEMARLY, communication personnelle).

MATERIEL ET METHODES

Les explants ont été prélevés sur des vitroplants de *Dioscorea alata* cvs Brazo Fuerte et Florido et *D. trifida* cvs Moengo V et INRA 5.20, maintenus en tube à 25° avec une photopériode de 12 heures.

La callogenèse et l'entretien des cals ont lieu en petites boîtes de pétri placées à 27° à l'obscurité. La callogenèse dure 30 à 40 jours. Les cals sont ensuite repiqués tous les 30 jours.

Les régénérations ont lieu en petites boîtes de pétri à 27° mais à la lumière pour éviter l'étiollement des pousses néoformées. La lumière est fournie par des tubes néons blancs. La photopériode est de 12 heures, l'intensité lumineuse de 20 E.m s. Les explants en régénération sont repiqués tous les 60 jours.

Le pourcentage de néoformation qui est évalué dans ces expériences correspond au nombre de cals ayant donné au moins une tige. Ces tiges sont coupées et transplantées en tube sur un milieu de microbouturage où elles se développent et s'enracinent. Les cals qui ont commencé à produire une tige continuent à en produire d'autres après ablation de la première pousse.

Pour l'initiation, l'entretien et la régénération des cals, nous avons employé un milieu de base (MB) constitué des macroéléments et des microéléments de Murashige et Skoog (MURASHIGE et SKOOG, 1962), de 0,1 mM de Fer EDTA, des vitamines de Morel (MOREL, 1948) et de différentes concentrations d'hormones et de sucre. Pour le microbouturage des vitroplants, nous utilisons le même milieu de base avec 50 g/l de saccharose. Le milieu est solidifié avec HCl ou NaOH avant autoclavage. Les milieux sont autoclavés 20 minutes à 110°.

Chaque expérience contient 25 explants par traitement et 2 répétitions. Afin de préciser le milieu optimal de callogenèse, nous avons employé un plan centré composé qui permet d'étudier plusieurs facteurs à la fois, en limitant le nombre de combinaisons à tester par rapport à un plan factoriel complet (BOX et WILSON, 1951 ; SAUVAIRE et GALZY, 1980).

RESULTATS

Choix de l'explant initial

Nous avons testé différents explants prélevés sur des vitroplants : noeuds, rondelles de bulbilles entières et de bulbilles débarrassées de la couche méristématique sous-épidermique, racine, entrenoeuds et divers fragments de feuilles (limbe sans le départ des nervures - départ des nervures et pulvinus distal - fragment de pétiole entre les deux pulvinus - pulvinus proximal). Ces explants ont été placés 30 jours sur milieu de callogenèse (MB + 2,4D 5 mg/l + Kin 1 mg/l + sacch. 40 g/l) puis transféré sur milieu d'organogénèse (MB + 2,4D 5 mg/l + Kin 1 mg/l + sacch. 40 g/l) puis transféré sur milieu d'organogénèse (MB + AIB 0,5 mg/l + BAP 2 mg/l + sacch. 30 g/l).

Les explants qui donnent les meilleurs pourcentages de callogenèse et d'organogénèse ultérieure sont les noeuds et les microbulbilles (Tableau 1). Ces explants contiennent des méristèmes. Même les microbulbilles débarrassées de la partie corticale peuvent contenir des flots méristématiques diffus. Ces résultats rejoignent les données de la littérature où les explants retenus pour la callogenèse et l'organogénèse ultérieure ont été les tubercules (SINGH, 1978 ; KOUASSI et al., 1984), les bulbilles (ASOKAN et al., 1983), les noeuds (DATTA, 1981), les embryons et les fragments de plantules en germination (AMMIRATO, 1984 ; GREWAL et ATAL, 1975 ; MASCARENHAS et al., 1976). Parmi les explants sans méristèmes qui ont donné des néoformations après callogenèse, nous avons trouvé le pulvinus proximal et l'ensemble pulvinus distal et départ des nervures. Nous avons écarté le pulvinus proximal qui est situé au-dessous du méristème axillaire et qui pourrait contenir des prolongements méristématiques.

Nous avons donc choisi pour cette étude l'ensemble pulvinus distal + fragment de limbe contenant le départ des nervures. Cet explant ne contient ni méristème primaire ni méristème secondaire (ESPIAND, 1983). Une étude cytologique montre que le cal se développe à partir des cellules accompagnatrices des vaisseaux. Nous avons appelé cet explant pétiole P1 lorsqu'il s'agissait de la feuille terminale et pétiole P2 lorsqu'il s'agissait de la feuille subterminale. Les résultats (Tableau 1) ne montrent pas de différence significative entre la feuille terminale et la feuille subterminale.

TABLEAU 1 / APTITUDE A LA CALLOGENESE ET A LA NEOFORMATION DE DIVERS EXPLANTS
PRELEVES SUR DES VITROPLANTS DE DIOSCOREA ALATA CV BRAZO FUERTE.

| Explant | Niveau de prélèvement sur le vitroplant | % de callogenèse sur milieu MB + 2,4D5 + Kin1 + sac40 | % de cal ayant formé une tige sur le milieu MB + AIB 0,5 + BAP2 + sac 30 après 90 jours |
|------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| Limbe sans le départ des nervures | feuille terminale | 90 % | 0 % |
| | subterminale | 96 % | 0 % |
| Départ des nervures | Feuille terminale | 84 % | 4 % |
| | subterminale | 78 % | 4 % |
| Fragment de pétiole entre les 2 pulvinus | Feuille terminale | 10 % | 0 % |
| | subterminale | 2 % | 0 % |
| Pulvinus proximal | Feuille terminale | 94 % | 4 % |
| | subterminale | 92 % | 6 % |
| Entrenoead | terminal | 24 % | 0 % |
| | subterminal | 14 % | 0 % |
| Racine | | 5 % | 0 % |
| Microbulbilles non épluchées | | 86 % | 34 % |
| Microbulbilles dont le cortex a été ôté | | 90 % | 16 % |
| Noeuds | terminal | 86 % | 50 % |
| | subterminal | 84 % | 46 % |

TABLEAU II / INFLUENCE DE DIVERSES AUXINES SUR LE % DE CALLOGENESE DE PETIOLE P1 DE D. ALATA (APRES 30 JOURS) ET DE D. TRIFIDA CV MOENGO V ET INRA 5.20 (APRES 50 JOURS) ET SUR LE % DE NEOFORMATION APRES 5 MOIS.

| ESPECE | D. alata | | D. trifida | |
|------------------------------------------------------|--------------|-------------|------------|-----------|
| | Brazo Fuerte | | Moengo V | INRA 5.20 |
| 2,4D 10 ⁻⁵ M kin 5.10 ⁻⁶ M | Cal Reg | 68 % 4 % | 40 % 0 | 35 % 0 |
| 2,4D 10 ⁻⁵ M BAP 5.10 ⁻⁶ M | Cal Reg | 40 % 0 | 40 % 0 | 35 % 0 |
| 3,4D 10 ⁻⁵ M kin 5.10 ⁻⁶ M | Cal Reg | 36 % 0 | 8 % 0 | 4 % 0 |
| 3,4D 10 ⁻⁵ M BAP 5.10 ⁻⁶ M | Cal Reg | 8 % 0 | 10 % 0 | 4 % 0 |
| Pi 10 ⁻⁵ M Kin 5.10 ⁻⁶ M | Cal Reg | 64 % 0 | 35 % 0 | 35 % 0 |
| Pi 10 ⁻⁵ BAP 5.10 ⁻⁶ M | Cal Reg | 24 % 0 | 25 % 0 | 20 % 0 |
| a 2,4,5T 10 ⁻⁵ M kin 5.10 ⁻⁶ M | Cal Reg | 80 % 6 % | 10 % 0 | 10 % 0 |
| a 2,4,5T 10 ⁻⁵ M BAP 5.10 ⁻⁶ M | Cal Reg | 16 % 0 | 10 % 0 | 10 % 0 |
| MCPA 10 ⁻⁵ M kin 5.10 ⁻⁶ M | Cal Reg | 84 % 0 | 30 % 0 | 35 % 0 |
| MCPA 10 ⁻⁵ M BAP 5.10 ⁻⁶ M | Cal Reg | 20 % 0 | 35 % 0 | 30 % 0 |
| ANA 10 ⁻⁵ M kin 5.10 ⁻⁶ M | Cal Reg | 24 % 2 % | 15 % 0 | 10 % 0 |
| ANA 10 ⁻⁵ M BAP 5.10 ⁻⁶ M | Cal Reg | 16 % 2 % | 25 % 0 | 10 % 0 |

Choix du type d'auxine et de cytokinine pour la callogenèse

Nous avons recherché un milieu qui permette la callogenèse sans inhiber totalement les possibilités de néoformations ultérieures. Nous avons testé sur le milieu de base additionné de 40 g/l de saccharose diverses auxines à la concentration de 10 M en association avec la kinétine (Kn) ou la 6 Benzyl aminopurine (BAP) à la concentration de 5.10 M. Les auxines testées sont l'acide 2,4 dichlorophenoxyacétique (2,4D), l'acide 3,4 dichlorophenoxyacétique (3,4D), l'acide 2,4,5 trichlorophénoxypropionique (2,4,5 T), l'acide naphthalène acétique (ANA), l'acide 4-amino 3,5,6 trichloropicolinique (picloram). Les cals ainsi formés ont été placés sur un milieu de différenciation (MB + 30 g/l de saccharose + 0,5 mg/l d'AIB + 2 mg/l de BAP).

Chez *D. alata* cv Brazo Fuerte, le pourcentage de callogenèse est significativement plus élevé en présence de kinétine qu'en présence de BAP (Tableau 2). Les auxines les plus efficaces pour la callogenèse sont le 2,4D, l' 2,4,5T, le MCPA et le picloram. Le 2,4D et l' 2,4,5T assurent une bonne callogenèse sans inhiber totalement les possibilités de néoformation. Le picloram produit des cals volumineux qui continuent à se développer sur un milieu d'organogénèse.

Chez *D. trifida* aucune néoformation de tige n'a été observée. Environ 10 pour cent des cals ont formé des racines sur milieu d'organogénèse. Les auxines les plus efficaces pour la callogenèse sont le picloram, le 2,4D et l' 2,4,5T. Il ne semble pas y avoir de différence significative entre les deux cytokinines.

Afin de préciser l'action des différentes auxines sur la callogenèse, nous avons étudié sur *D. alata* cv Brazo Fuerte une gamme de concentration (de 0 à 9 mg/l) de 2,4D, d'ANA et d' 2,4,5T en association avec 1 mg/l de kinétine et 40 mg/l de saccharose. Les résultats (figure 1) montrent que le meilleur pourcentage de callogenèse est obtenu avec le 2,4D (à partir de 3 mg/l). Nous avons donc choisi d'utiliser cette auxine pour la callogenèse et l'entretien des cals.

Choix d'un milieu optimal pour la callogenèse

Nous avons testé différentes concentrations de 2,4D, de kinétine et de sucre sur *D. alata* cv Brazo Fuerte. Afin de préciser les interactions entre les différents facteurs de croissance, nous avons analysé ceux-ci selon un plan centré composé. Les résultats sont donnés dans les figures 2, 3, 4, 5. Le milieu optimum pour la callogenèse est le milieu de base additionné de 40 g/l de saccharose, 5 mg/l de 2,4D et 1 mg/l de kinétine. Les doses utilisées pour induire la callogenèse sur divers organes chez les autres *Dioscoreae*

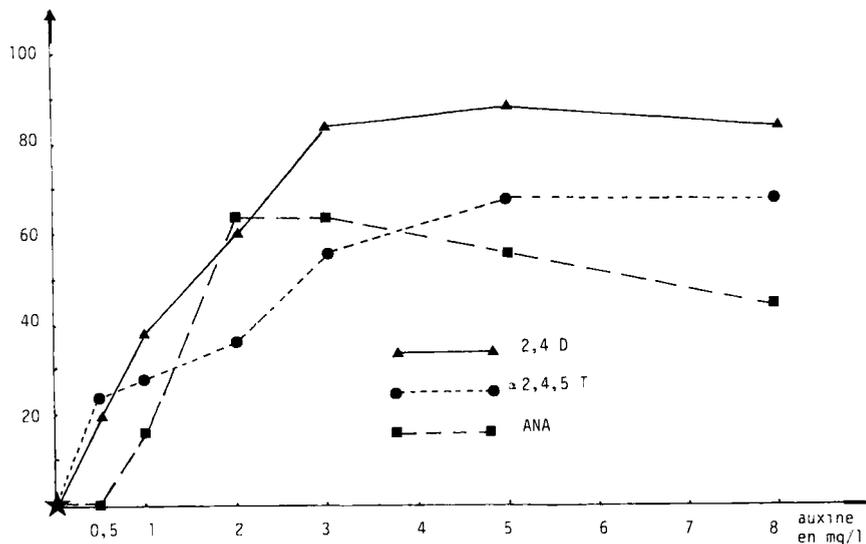


Figure 1 : Influence de la concentration en différentes auxines sur le % de callogénèse de pétiole P1 de *Dioscorea alata*.

Des explants P1 de *D. alata* cultivar Brazo Fuerte ont été placés sur le milieu MB + sac 40 g/l + Kin 1 mg/l + 2,4-ANA ou 2,4,5-T 0 à 8 mg/l. Les pourcentages portés dans la figure correspondent à la moyenne de 2 répétitions de 25 explants par traitement.

% de callogénèse à 28 jours

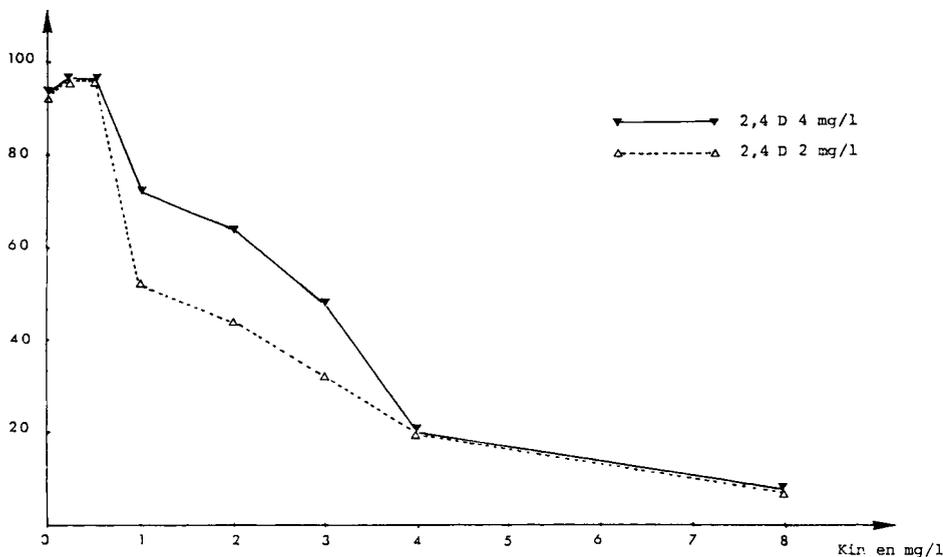


Figure 2 : Influence de la concentration en Kinétine sur le % de callogénèse de pétiole P1 de *Dioscorea alata*.

Les explants P1 du cultivar Brazo Fuerte de *D. alata* ont été placés sur le milieu MB + sac 30 g/l additionné des diverses combinaisons d'auxine et de cytokinine mentionnées sur les figures 7 et 8. Les pourcentages correspondent à 2 répétitions de 25 explants par traitement.

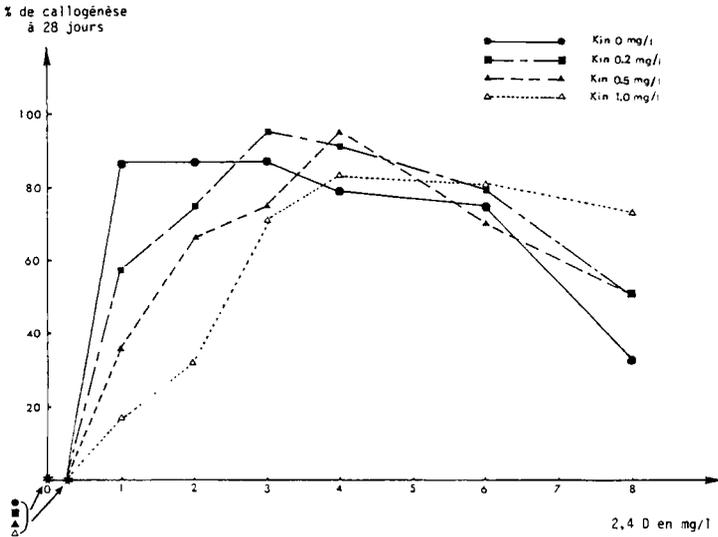


Figure 3 : Influence de la concentration en 2,4 D et en Kinetine sur le % de callogénèse de pétiole P2 de *Dioscorea alata*.

Les explants P1 du cultivar Brazo Fuerte de *D. alata* ont été placés sur le milieu MB + sac 30 g/l additionné des diverses combinaisons d'auxine et de cytokinine mentionnées sur les figures 7 et 9. Les pourcentages correspondent à 2 répétitions de 25 explants par traitement.

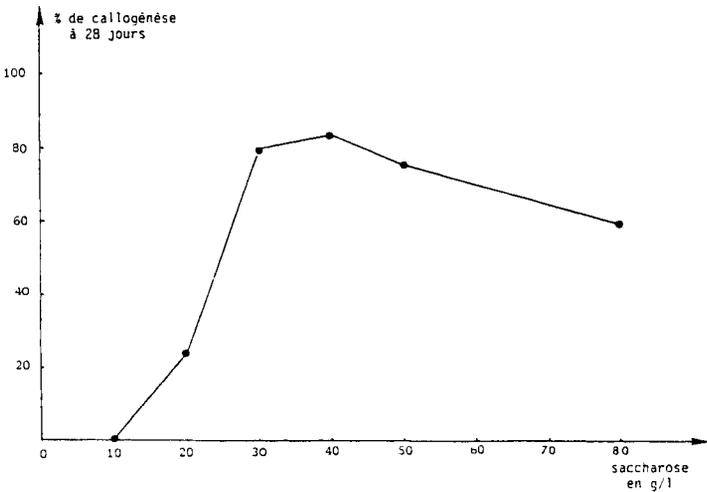


Figure 4 : Influence de la concentration en sucre sur le % de callogénèse de pétiole P1 de *Dioscorea alata*.

Des explants P1 du cultivar Brazo Fuerte de *D. alata* ont été placés sur le milieu MB + sac 2,4-D 4 mg/l + kin 1 mg/l + sac (10 - 20 - 30 - 40 - 50 - 80 g/l). Les pourcentages indiqués sur la figure correspondent à la moyenne de 2 répétitions de 25 explants par traitement.

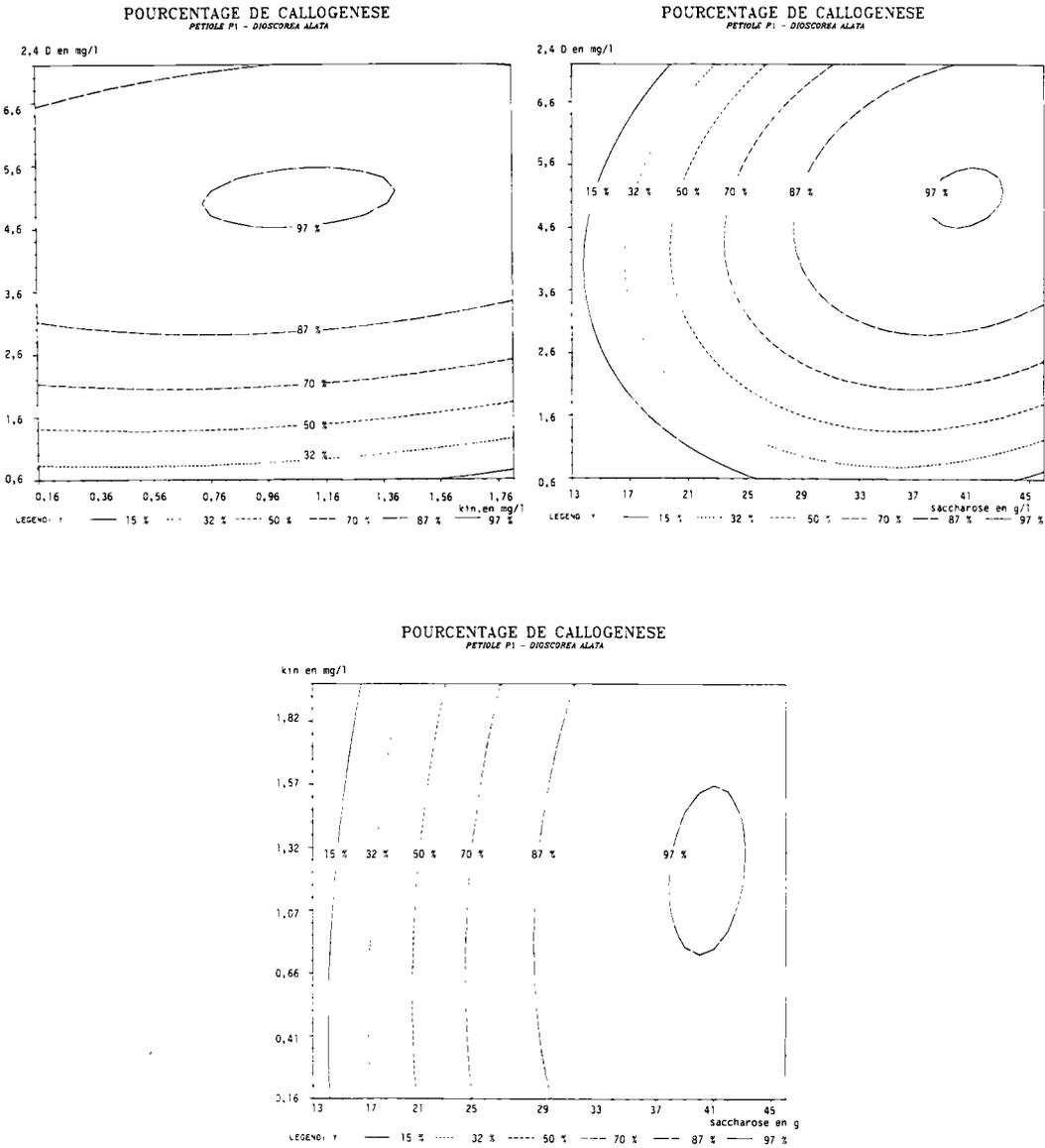


FIGURE 5 : Influence du 2,4-D, de la kinétine et du saccharose sur le pourcentage de callogenèse de pétiole P1 de Dioscorea alata cv Brazo Fuerte.

sont de 1 à 6 mg/l de 2,4D, 0 à 0,5 mg/l de kinétine et 30 g/l de saccharose (AMMIRATO, 1984 ; GREWAL et ATAL, 1976 ; CHATURVEDI, 1976...). La présence de kinétine dans notre milieu permet d'éviter l'apparition de racines sur le cal.

Choix d'un milieu optimal pour la croissance des cals

Nous avons utilisé pour cette expérience des pétioles de *D. alata* cv Brazo Fuerte ayant subi une phase de callogenèse de 30 jours sur MB + 40 g/l de saccharose + 5 mg/l de 2,4D + 1 mg/l de kinétine. Les explants ont été transférés sur différents milieux d'entretien et nous avons mesuré l'augmentation relative de poids frais :

$$\frac{(P - P_0)}{P_0} = \frac{\text{poids final} - \text{poids initial}}{\text{poids initial}} \text{ après 30 jours.}$$

Nous avons testé l'influence de la concentration en 2,4D (de 0,5 à 5 mg/l) sur MB + sacch. 30 g/l + kin 0,5 mg/l (figure 5) et l'influence de la concentration en saccharose (de 10 à 50 g/l) sur MB + 2,4D 2 mg/l + Kin 0,5 mg/l (figure 7). Nous avons choisi comme milieu d'entretien MB + 2,4D 2 mg/l + kin 0,5 mg/l + sacch. 30 g/l.

Organogenèse à partir de cals initiés et entretenus sur milieu riche en auxine forte

Nous avons recherché des milieux permettant l'organogenèse des cals de pétioles P1 qui avaient été initiés sur milieu optimum de callogenèse (2,4D 5mg/l) puis entretenus pendant 30 jours sur milieu d'entretien (2,4D 2 mg/l).

Diverses auxines en association avec la BAP et 30 g/l de saccharose ont été testées sur *D. alata* cv Brazo Fuerte et *D. trifida* cvs Moengo V et INRA 5.20 (Tableau 3, 4 et 5). Nous n'avons pas obtenu de néoformation de tige sur *D. trifida*. Chez *D. alata* des tiges se développent 2 à 12 mois après passage sur milieu de différenciation. Toutes les auxines testées ainsi que les témoins sans auxines sont susceptibles d'assurer un faible pourcentage de néoformation chez *D. alata*.

Afin de déterminer les niveaux optimaux d'auxine et de cytokinine dans le milieu d'organogenèse, nous avons testé diverses concentrations d'AIB (de 0 à 2 mg/l) et de BAP (de 0 à 8 mg/l) sur des cals de pétiole P1 cv Brazo Fuerte. Comme le pourcentage de néoformation restait faible, nous avons utilisé également des cals de noeud après deux repiquages sur milieu d'entretien. Les résultats des tableaux 6 et 7 montrent que le milieu MB + AIB 0,5 mg/l + sacch. 30 g/l donne un bon pourcentage d'organogenèse.

augmentation relative du poids frais après 28 jours

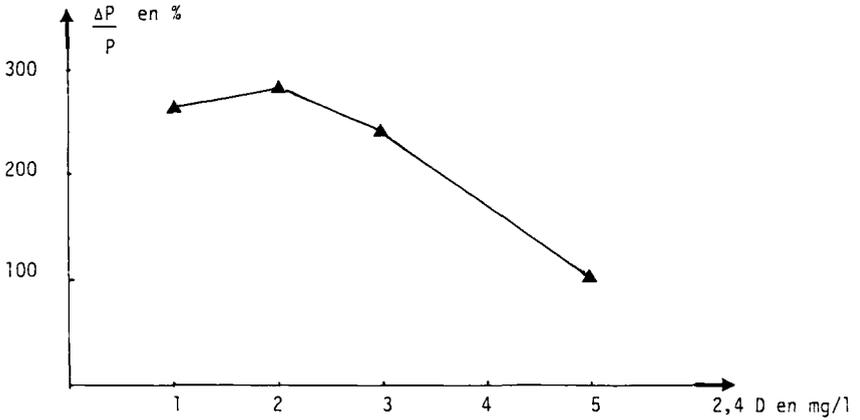


Figure 6 : Influence de la teneur en 2,4 D sur la croissance pondérale des cals de pétiole P1 de *Dioscorea alata*.

Des explants P1 du cultivar Brazo Fuerte ayant subi une phase de callogenèse de 30 jours sur le milieu MC ont été transférés sur le milieu MB + kin 0,5 + sac 30 g/l + 2,4-D (1 à 5 mg/l) du poids de matière fraîche. 30 explants par traitement ont été suivis.

augmentation relative du poids frais après 28 jours

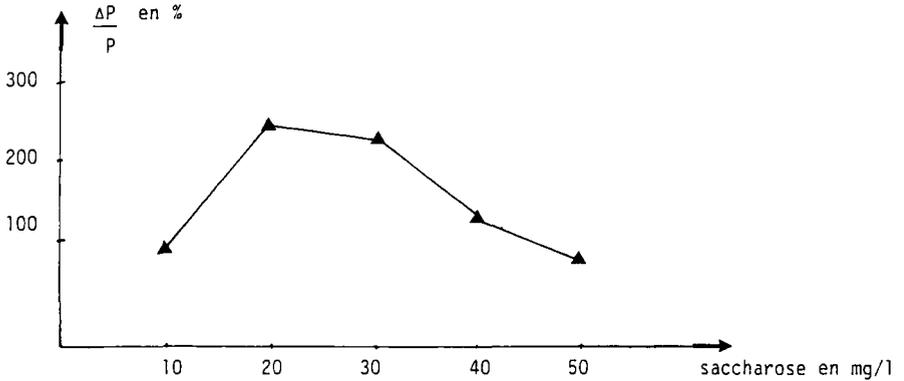


Figure 7 : Influence de la teneur en saccharose sur la croissance pondérale des cals de pétiole P1 de *Dioscorea alata*.

Des explants P1 du cultivar Brazo Fuerte ayant subi une phase de callogenèse de 30 jours sur le milieu MC ont été transférés sur le milieu MB + 2,4-D 2 Mg/l + kin 0,5 mg/l + sac (10 à 50 mg/l) et nous avons mesuré l'augmentation du poids de matière fraîche. 30 explants par traitement ont été suivis.

Tableau III : Influence de diverses auxines sur le % de néoformation à partir de cals de pétiole Pl de D. alata cv Brazo Fuerte et D. trifida cvs Moengo V et INRA 5.20 (% de cals ayant donné au moins une tige après 5 mois)

| cultivar | milieux (mg/l) | AIA 0,5 | AIB 0,5 | NOA 0,5 | ANA 0,5 | - | KIN 1 | MB |
|--------------------------------|-------------------|---------|---------|---------|---------|-------|-------|----|
| | | BAP 2 | BAP 2 | BAP 2 | BAP 2 | BAP 2 | BAP 2 | |
| D. trifida cv Moengo V | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| D. trifida cv INRA 5.20 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| D. alata cv Brazo Fuerte | | * | 4% | 8% | 4% | 2% | 4% | 2% |

* 1 cal de deuxième génération qui, transplanté sur AIB 0,5 BAP 2, a donné plusieurs tiges 12 mois après la mise sur milieu de néoformation.

Tableau IV : Influence de diverses auxines sur le % de néoformation à partir de cals de pétiole Pl de D. alata cv Brazo Fuerte (observation après 5 mois).

| BAP (mg/l) | ANA (mg/l) | | NOA (mg/l) | | AIB (mg/l) | | |
|---------------|------------|-----|------------|-----|------------|-----|-----|
| | 0,1 | 0,5 | 0,1 | 0,5 | 0,1 | 0,5 | 1,0 |
| 0,5 | 0 | 8% | 0 | 2% | 2% | 6% | 8% |
| 2 | 0 | 4% | 0 | 0 | 0 | 4% | 4% |

Tableau V : Influence de diverses auxines sur le % de néoformation à partir de cals de pétiole Pl de D. alata cv Florido (observation après 3 mois).

| BAP (mg/l) | auxine (mg/l) | ANA 0,5 | AIB 0,5 | NOA 0,5 | MB |
|------------|---------------|---------|---------|---------|----|
| | 0 | | 24% | 18% | 4% |
| 2 | | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tableau VI : Influence de la concentration en AIB sur le % de néoformation à partir de pétiole P1 de D. alata cv Brazo Fuerte (observation après 5 mois).

| AIB (mg/l) \ BAP (mg/l) | 0,0 | 0,5 | 1,0 | 1,5 | 2,0 |
|-------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| 0 | 8% | 16% | 4% | 0 | 0 |
| 2 | 4% | 2% | 2% | 0 | 0 |

Tableau VII : Influence de la concentration en 6 BAP sur le % de néoformation à partir de pétiole P1 et de noeud N2 de D. alata cv Brazo Fuerte (observation après 5 mois)

| hormone (mg/l) \ explant | AIB 0,5 | | | | | |
|--------------------------|---------|---------|-------|-------|-------|-------|
| | BAP 0 | BAP 0,5 | BAP 1 | BAP 2 | BAP 4 | BAP 8 |
| cal de noeud | 20% | 12% | 12% | 26% | 6% | 6%* |
| cal de pétiole | 8% | 4% | 2% | 4% | 0 | 0 |

* les tiges qui se développent meurent après 1 mois.

Nous avons fait également une étude sur l'influence de la forme et de la quantité d'azote sur le pourcentage de néoformation chez *D. alata* cv Brazo Fuerte. L'apport d'azote sous forme réduite ou organique est généralement nécessaire pour obtenir de l'embryogenèse somatique (AMMIRATO, 1982 ; SINGH, 1978). Nous avons modifié le milieu de base de façon à tester différents rapports N réduit/N oxydé (de 0,5 à 1,4). Nous n'avons pas obtenu d'embryogenèse somatique mais nous avons observé une influence significative de la quantité et de la qualité d'azote sur le pourcentage de néoformation (Tableau 8).

Le rapport $\frac{N \text{ réduit}}{N \text{ oxydé}} = 1$ donne de très bons résultats.

La faible teneur en azote totale de ce milieu en est peut-être la cause.

La réaction des cals de *D. alata* cv Brazo Fuerte sur les différents milieux qui ont donné des néoformations a été à peu près uniforme. Le cal anthocyané formé sur milieu riche en auxine noircit et se nécrose et un deuxième cal non anthocyané à croissance lente se développe après 2 à 3 mois. Certains de ces cals donnent des tiges. Nous avons donc cherché à obtenir directement à partir de l'explant initial ce type de cal à croissance lente.

Organogenèse à partir de cals initiés sur un milieu faible en auxine

Nous avons mis des pétioles P1 de *D. alata* cv Brazo Fuerte sur le milieu de base additionné de 1 mg/l d'ANA ou 0,01 mg/l de 2,4D ou sans auxine, de diverses concentrations de kinétine ou de 6 BAP (de 0 à 10 mg/l) et de 30 g/l de saccharose. Les explants développent sur certains milieux un cal au niveau de la blessure du pétiole et du départ des nervures. Ces cals produisent ensuite des racines. Après 2 mois, des tiges commencent à apparaître au niveau du départ des nervures et du cal cicatriciel. Les résultats (Tableau 9) montrent que, chez la variété étudiée, des doses élevées de cytokinine inhibent totalement la callogenèse et l'organogenèse de tige et de racine. Une certaine dose d'auxine est nécessaire pour induire la callogenèse et l'organogenèse : les explants cultivés sur les témoins sans auxine ou en présence d'une dose trop faible d'auxine (2,4D 0,01 mg/l) n'ont pas développé de cal ni de néoformation.

Le pourcentage obtenu sur les explants initiés avec une auxine faible est supérieur à celui obtenu en présence.

Tableau VIII : Influence de la forme et de la quantité totale d'azote sur le % de néoformation chez *D. alata* cv Brazo Fuerte (% de cal ayant donné au moins une tige après 6 mois).

| Milieu utilisé | MS normal | MS normal + Glutamine 500mg/l | MS modifié | MS modifié à 500 mg/l d'azote | MS modifié a 500 mg/l d'azote + Glutamine 500 mg/l |
|------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------|----------------------------------|-------------------------------------------------------|
| | NH4 = 20 mM NO3 = 38 mM Norganique = 7 mM | NH4 = 20 mM NO3 = 38 mM | NH4 = 25 mM NO3 = 38 mM | NH4 = 18 mM NO3 = 18 mM | NH4 = 18 mM NO3 = 18 mM Norganique = 7mM |
| rappor molaire : Nrédult/Noxydé | 0,5 | 0,7 | 0,7 | 1,0 | 1,4 |
| azote total | 58 mM | 65 mM | 60 mM | 36 mM | 43 mM |
| % de néoformation | 4% | 2% | 4% | 34% | 4% |

Tableau IX : Influence de la kinétine et de la 6 benzylaminopurine sur la néoformation de tiges sur les pétioles Pl de *D. alata* cv Brazo Fuerte (% d'explants ayant donné au moins une tige ou une racine après 135 jours).

| auxine (mg/l) \ cytokinine (mg/l) | Kinétine | | | | 6 Benzyl aminopurine | | | | |
|-----------------------------------|----------|---------|---------|----------|----------------------|---------|---------|----------|----|
| | kin 0 | kin 0,1 | kin 1,0 | kin 10,0 | BAP 0 | BAP 0,1 | BAP 1,0 | BAP 10,0 | |
| ANA 1 | cal | 68 % | 76 % | 0* | 0* | 70 % | 64 % | 0* | 0* |
| | racine | 40 % | 44 % | 0 | 0 | 44 % | 36 % | 0 | 0 |
| | tige | 16 % | 18 % | 0 | 0 | 20 % | 16 % | 0 | 0 |
| 2,4D 0,01 | cal | 0 | 0 | 0* | 0* | - | 0 | 0* | 0* |
| | racine | 0 | 0 | 0 | 0 | - | 0 | 0 | 0 |
| | tige | 0 | 0 | 0 | 0 | - | 0 | 0 | 0 |
| témoins sans auxine | cal | 0 | 0 | 0 | 0* | - | 0 | 0 | 0* |
| | racine | 0 | 0 | 0 | 0 | - | 0 | 0 | 0 |
| | tige | 0 | 0 | 0 | 0 | - | 0 | 0 | 0 |

* Un cal très petit de type mycélien se développe sur les blessures de certains explants.
Ce cal n'évolue pas.

DISCUSSION

La callogenèse et la culture de cal ont été largement étudiées chez les espèces de *Dioscorea* à diosgénine : *D. deltoidea* (ABROSHNIKOVA et al., 1971 ; CHATURVEDI et SRIVASTAVA, 1976 ; CHATURVEDI et CHOWDHURY, 1980 ; KAUL et STABA, 1968 ; TAL et GOLDBERG, 1982), *D. floribunda* (AMINUDDIN et CHOWDHURY, 1983), *D. composita* (DATTA, 1981), *D. zingiberensis* (anonyme chinois, 1978). Divers types de néoformations ont été obtenues dans le genre *Dioscorea* :

- Embryogenèse somatique à partir de cals d'embryon sur *D. floribunda* (AMMIRATO, 1984) et de tubercules sur *D. deltoidea* (SINGH, 1978).

- Néoformations de tiges à partir de cals de seedling sur *D. deltoidea* (GREWAL et ATAL, 1975 et MASCARENHAS et al., 1976) et de cals de noeuds sur *D. macrostachya* (MAPES et URATA, 1970) et sur *D. composita* (DATTA, 1981).

- Organogenèse rapide sur fragments de tubercules ou de bulbilles ayant subi une phase de callogenèse chez *D. alata*, *D. rotundata* et *D. esculenta* (KOUASSI et al., 1984 ; ASSOKAN et al., 1983).

- Organogenèse directe sans passage par cal sur feuille dressée de *D. floribunda* (SINHA et CHATURVEDI, 1979).

Aucune publication n'a, à notre connaissance, fait état de variations somaclonales obtenues sur *Dioscoreae*, même si des études dans ce sens ont été entreprises (MASCARENHAS et al., 1976 ; DATTA, 1981 ; ARSENE, 1979). Une étude a été faite sur la mutagenèse de cellules en suspension de *D. deltoidea* (KARANOVA et al., 1979) mais les souches cellulaires étudiées n'ont pas été placées sur milieu organogène.

Notre but étant l'obtention de variations somaclonales :

- Nous avons choisi un explant dépourvu de méristème: en effet, lorsque l'explant initial contient un méristème, les plantules néoformées peuvent provenir de la dé-répression du méristème contenu dans l'explant initial qui a proliféré au cours des repiquages successifs, et les mécanismes empêchant l'instabilité génétique étant particulièrement développés au niveau du méristème, la variabilité induite est faible. Au contraire, un explant sans méristème isolé de la plante mère échappe aux mécanismes correcteurs de la variabilité et il pourra y avoir néoformation de plantes "variantes" par rapport à la plante mère.

- Nous avons choisi un fragment de vitroplant qui présente l'intérêt de pouvoir faire des cycles assez rapprochés de callogenèse et d'organogenèse, ce qui n'est pas possible si on utilise des organes tels que le tubercule ou

le seedling. La variation induite est beaucoup plus importante après plusieurs cycles de callogenèse qu'après un seul (ROSSIGNOL, 1984).

Les néoformations de cet explant apparaissent lentement : entre 2 et 12 mois après la mise sur milieu organogène. Ceci est contraire aux résultats qui ont été publiés sur *Dioscoreae* où les néoformations (embryogenèse somatique ou organogénèse) apparaissent beaucoup plus rapidement : de 15 jours à 2 mois après transfert sur milieu organogène. Nous avons également obtenu une organogénèse rapide (entre 3 et 8 semaines) à partir de cal d'explants contenant un méristème. La lenteur d'apparition des néoformations à partir de cals de pétioles P1 est favorable à l'obtention de variants.

Les plantules néoformées ont été mises en collection *in vitro*. Elles présentent des différences de taille, de pigmentation et de vigueur. Nous les conservons en observation pour vérifier si ces différences subsistent après quelques cycles de microbouturage.

Les ignames étant polyploïdes : allo et autopolyploïde avec $2n = 2$ à $10x$ chez *D. alata* et $2n = 8x = 80$ chez *D. trifida* (ESSAD, 1984), chaque cultivar possède une grande hétérogénéité génétique qui pourrait être révélée par des cycles de callogenèse et d'organogénèse. Cependant, une partie des mutations induites ne se manifesteront pas car les allèles des chromosomes redondants risquent de masquer la variation.

CONCLUSION

L'obtention de néoformations à partir de cal de *Dioscorea* est d'un grand intérêt pour l'amélioration génétique des ignames :

- par la possibilité d'utilisation des variants : des études précises sur la physiologie des caractères que l'on cherche à améliorer seraient cependant nécessaires pour orienter les variations éventuelles ou en tirer partie ;

- par la possibilité d'utilisation dans l'étude des protoplastes ; la fusion des protoplastes offre une solution très séduisante aux problèmes de reproduction sexuée des *Dioscoreae* mais l'emploi de cette méthode se heurte aux difficultés de régénérer des plantes à partir des protoplastes. L'utilisation de cals susceptibles de régénérer comme matériel de base pour la formation des protoplastes serait peut-être un moyen de surmonter cette barrière.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient l'IRAT et le laboratoire de culture in vitro du CIRAD où a été réalisée cette étude, ainsi que M. DEGRAS (INRA) et M. DUMONT (IRAT) pour la fourniture de matériel végétal et de documentation.

BIBLIOGRAPHIE

- ABROSHNIVOVA M.A., BUTENKO R.G., SINIOUKHIN A.M., 1971. Kultura tkanei *Dioscorea deltoidea* kak produktentor steroidmyka saponid y senikov. Rostitelnye Resursy, 7 : 517524.
- AMINUDIN, CHOWDHURY A.R., 1983. Production of diosgenin in somatic callus tissues of *Dioscorea floribunda*. Planta Medica, 48 (2) : 92-93.
- AMMIRATO P.V., 1982.- Growth and morphogenesis in culture of the monocot yam *Dioscorea*. In : plant tissue culture (Fugirawa A. ed), Maruzen, Tokyo, 169-170.
- AMMIRATO P.V., 1984.- Yams. In : Handbook of plant cell culture. Vol. 3 (Ammirato, Evans, Sharp, Yamada ed), Macmillan Publishing, New York, 327-354.
- Anonyme Chinois, 1978.- The preliminary experiment on the callus tissue culture of *Dioscorea zingiberensis*. Proc. of symp. on plant tissue culture. Science Press, Peking, 481-484.
- ARSENE M., 1979.- Etude de phénovariants par culture de tissus chez *Dioscorea alata* et *D. trifida*. DEA Amélioration des Plantes. Univ. Paris Sud, Centre d'Orsay, 11 p.
- ASOKAN M.P., O'HAIR S.K., LITZ R.E., 1983.- In vitro plant development from bulbils explants of two *Dioscorea* species. Hortscience, 18 (5), 702-703.
- BAUDIN P., 1956.- Maladie parasitaire des ignames de côte d'Ivoire. Revue de mycologie, 21 : 87-111.
- BOX G.E.P. et WILSON K.B., 1951.- On the experimental attainment of optimum conditions. J.R. Stat. Soc. B13 : 1-45.
- BRANCHARD M., 1984.- Application des vitrométhodes à la mise en oeuvre de programme de sélection de plantes résistantes à des maladies. Agromonie, 4 (9) : 905-911.
- CHATURVEDI H.C. et SRIVASTAVA S.N., 1976.- Diosgenin biosynthesis by tuber callus tissue culture of *Dioscorea deltoidea*. Lloydia, 39, 82-83.
- CHATURVEDI H.C. et CHOWDHURY A.R., 1980. Effect of growth hormones and some nitrogen sources on diosgenin biosynthesis by tuber callus of *D. deltoidea*. Indian J. Exp. Biol., 18 (9) : 913-915.

COURSEY D.G., 1976.- Yams in evolution of crop plants (Simmonds ed.). Longman, London, 70-74.

DATTA S.K. et DATTA K., 1981. Propagation of yam - *Dioscorea composita* - through tissue culture. Proc. Costed Symp. on tissue culture of economically important plant, Singapore (A.N Rao ed), 90-93.

ESPIAND H., 1983.- Conséquence de la culture in vitro sur la morphogénèse des boutures nodales de l'igname *D. alata* cv Tahiti. Thèse 3ème cycle, Paris Sud, Centre d'Orsay, 80 p.

ESSAD S., 1984. Variation géographique des nombres chromosomiques de base et polyploïdie dans le genre *Dioscorea* à propos du dénombrement des espèces *transversa*, *pillosa* et *trifida*. Agronomie, 4 (7) : 611-617.

GREWAL S. et ATAL C.K., 1976.- Plantlet formation in callus culture of *Dioscorea deltoidea*. Indian J. Exp. Biol., 14 (3) : 252-253.

IITA, 1979.- Annual Report. Yam, 63
-65.

IITA, 1980. Annual Report. Yam, 65-70.

JOS J.S. et VIJAYA BAI, 1980.- Overcoming high female sterility in an asian species of *Dioscorea*. National Seminar on tuber crop production technology. Tamil Nadu Agricultural University, 161-164.

KARANOVA S.L., SHAMINA Z.B., 1979.- Induced genetic variability of somatic cells of *Dioscorea deltoidea*. In vitro phototrophy with respect to phytohormones. Soviet Genetics, 14 (6) : 691-696.

KAUL B. et STABA E.J., 1968.- *Dioscorea* tissue culture : (1) Biosynthesis and isolation of diosgenin from *Dioscorea deltoidea* callus and suspension cells. Lloydia, 31 (2) : 171-179.

KOUASSI B., VASSEUR J., FOURNET B., DUBOIS J., 1984.- Activité invertasique des cultures de tissus de *Dioscoreae*. Rev. Cytol. Biol. Veg. Bot., 7, 97-108.

LARKIN P.J. et SCOWCROFT W.R., 1981.- Somaclonal variation. A novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor. Appl. Genet., 60, 197-214.

MAPES M.O. et URATA U., 1970.- Aseptic stem culture of *Dioscorea* clone. Proc. 2nd Intern. Symp. Trop. Root Tuber Crops. Hawaï, 25-27.

MASCARENHAS A.F., HENDRE R.R., NADGIR A.L., GHUGALE D.D., GODBOLE D.A., PRABHU R.A., TAGANNATHAN V., 1976.- Development of plantlets from cultured tissues of *Dioscorea deltoidea*. Ind. J. Exp. Biol., 14, 604-606.

MOREL G., 1984.- Recherche sur la culture associée de parasites obligatoires de tissus végétaux. Ann. Epiphyties (série Pathologie Végétale), 14, 123-124.

MURASHIGE T. et SKOOG F., 1962.- A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15, 473-497.

ROSSIGNOL L., ROSSIGNOL M., DUCREUX G., NOZERAN R., DARPAS A., 1984.- Analyse de la variabilité d'individus néoformés à partir de cals chez la pomme de terre *Solanum tuberosum* l. Var. B. F. 15. Bull. Soc. Bot. Fr., 131, lettre 1984, 3, 171-190.

SAUVAIRE D. et GALZY R., 1980.- Une méthode de planification expérimentale appliquée aux cultures de tissus végétaux. Exemple de la canne à sucre (*Saccharum* sp.). Can. J. Bot., 58, 264-269.

SHEPARD J.F., BIDNEY D., SHAHIN E., 1980.- Potatoe protoplasts in crop improvement. Science, 208 (4) : 17-24.

SINGH J.P., 1978.- Effect of nitrogen source on shoot bud differentiation of *Dioscorea deltoidea* callus cultures. Biologia Plantarum, 20 (6) : 436-439.

SINHA M., CHATURVEDI H.C., 1979.- Rapid clonal propagation of *D. florbunda* by vitroculture of excised leaves. Current Science, 48 (4) : 176-178.

TAL B. et GOLDBERG I., 1982.- Growth and diosgenin production by *Dioscorea deltoidea* cells in batch and continuous cultures. Planta medica, 44 : 107-110.

VANDEVENNE R. et TOURTZEVITCH Y., 1977.- Essai de mécanisation de la culture de l'igname en Côte-d'Ivoire. Machinisme Agricole Tropical, 60, 30-46.

WINCH J.E., NEWHOOK F.J., JAKSON G.V.H., COLE J.S., 1984.- Studies of *Colletotrichum gloesporioides* diseases on yam *Dioscorea alata* in Salomon Islands. Plant Pathology, 33, 467-477.

