

ACADEMIE DE MONTPELLIER
UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

THESE

présentée à l'Université des Sciences et Techniques
du Languedoc (Montpellier II) pour obtenir le grade de :

Docteur - Ingénieur en Sciences Agronomiques

CALLOGENÈSE ET NÉOFORMATION CHEZ DEUX ESPECES D'IGNAMES
COMESTIBLES DIOSCOREA ALATA ET D. TRIFIDA

par

FAUTRET Agnès
Ingénieur agronome

soutenue le 15 novembre 1985 devant la Commission d'Examen

| | | |
|--------|-----------------|------------|
| JURY : | M. JONARD R. | Président |
| | M. DUBLIN P. | Rapporteur |
| | M. GRIGNAC P. | |
| | M. JACQUOT M. | |
| | M. NAVATEL J.C. | |

ACADEMIE DE MONTPELLIER
UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

THESE

présentée à l'Université des Sciences et Techniques
du Languedoc (Montpellier II) pour obtenir le grade de :

Docteur - Ingénieur en Sciences Agronomiques

**CALLOGENÈSE ET NÉOFORMATION CHEZ DEUX ESPECES D'IGNAMES
COMESTIBLES DIOSCOREA ALATA ET D. TRIFIDA**

par

FAUTRET Agnès
Ingénieur agronome

soutenue le 15 novembre 1985 devant la Commission d'Examen

| | | |
|--------|-----------------|------------|
| JURY : | M. JONARD R. | Président |
| | M. DUBLIN P. | Rapporteur |
| | M. GRIGNAC P. | |
| | M. JACQUOT M. | |
| | M. NAVATEL J.C. | |

CIDARC - BIBLIOTHEQUE

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de culture In vitro du CIRAD dans le cadre d'un programme IRAT d'amélioration des ignames comestibles.

Je remercie vivement Monsieur DUBLIN, Inspecteur Général de Recherche ORSTOM, de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de l'aide qu'il n'a jamais cessé de me prodiguer au cours de l'élaboration et de la rédaction de ce travail.

Monsieur le Professeur JONARD, veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour avoir bien voulu accepter la présidence du jury de cette thèse et pour vos critiques concernant la rédaction de ce mémoire.

Je remercie très sincèrement Monsieur JACQUOT, Chef de la Division d'Amélioration des Plantes, pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail et pour m'avoir permis de participer à l'élaboration des projets IRAT pour ce qui concerne l'igname.

Je remercie respectueusement, Monsieur le Professeur GRIGNAC de me faire l'honneur de juger ce travail et Monsieur NAVATEL du C.T.I.F.L. d'avoir bien voulu accepter de participer à la commission d'examen.

Que tous ceux qui ont travaillé avec moi au laboratoire de culture in vitro du CIRAD soient assurés de mes remerciements les plus chaleureux pour l'aide qu'ils m'ont apportée à un moment ou à un autre au cours de ces deux années, en particulier Madame Kilou LAMBERT et Monsieur CHAGVARDIEFF.

Mes remerciements s'adressent tout spécialement à l'équipe IRAT de la Division d'Amélioration des Plantes et plus particulièrement à Madame GUINET et à Messieurs VANDEVENNE et DUMONT.

Je tiens également à remercier Messieurs SCHWENDIMAN et PALLARES du laboratoire de cytologie du CIRAD pour leurs critiques qui m'ont aidé à approfondir ce travail.

Enfin je voudrais remercier tous ceux et celles qui travaillent sur l'igname en France et ailleurs et qui m'ont toujours accueillie avec tant de disponibilité, en particulier Monsieur DEGRAS et Mademoiselle SALEIL qui m'ont fourni du matériel végétal.

Et pour terminer, je tiens à témoigner ma reconnaissance à Monsieur BILLAZ du CIRAD sans l'aide duquel ce travail n'aurait pas eu lieu.

Et d'abord, qu'entendons-nous par variant ? Il s'agit de végétaux qui, nantis du même patrimoine héréditaire que l'individu dont ils sont issus, montrent, d'une manière intégrée et persistante, un mode de fonctionnement de l'information génétique ne correspondant pas à celui normalement connu dans la vie de la plante.

NOZERAN et BANCILHON, 1972

L'igname, la reine des plantes, était une reine très exigeante. Pendant trois ou quatre mois, l'igname demandait un dur travail et une attention constante depuis le chant du coq jusqu'à ce que les poules aillent se percher pour la nuit. Les jeunes pousses étaient protégées contre la chaleur de la terre par des couronnes de feuilles de sisal. Quand les pluies devenaient plus fortes, les femmes plantaient du maïs, des melons et des haricots entre les monticules à ignames. Les ignames étaient alors pourvues de tuteurs, d'abord des petits bâtons et plus tard de grandes et grosses branches d'arbres. Les femmes désherbaient la ferme par trois fois à des périodes définies dans la vie des ignames, ni trop tôt ni trop tard.

CHINUA ACHEBE, 1973

(Nigeria)

Année : 1985

Nom de l'auteur : FAUTRET Agnès

Université des Sciences et Techniques du Languedoc
(Montpellier II).

Titre : Callogenèse et néoformation chez deux espèces d'ignames comestibles
Dioscorea alata et D. cayenensis.

Résumé :

Cette étude a été entreprise dans un but de diversification chez l'igname. Divers types d'explants prélevés sur des vitroplants ont été étudiés pour leur aptitude à la callogenèse et à la néoformation. Des milieux de callogenèse, d'entretien des cals et de néoformation de tige ont été mis au point chez D. alata et D. trifida, sur des fragments de feuille, des noeuds et des microbulbilles. Des néoformations de tige ont été obtenues directement à partir de l'explant initial, sur des cals reliés à l'explant initial et sur des cals isolés de l'explant initial. L'étude cytologique des néoformations montre que leur origine est pluricellulaire.

Mots-clés :

Dioscorea
Igname
Culture in vitro
Callogenèse
Organogenèse

CIDARC - BIBLIOTHEQUE

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 - GENERALITES

1

- 1 - PRESENTATION DES DIOSCOREACEES
 - 1.1 - Origine et dispersion
 - 1.2 - Classification
 - 1.3 - Nombres chromosomiques
 - 1.4 - Les ignames comestibles et les ignames d'intérêt pharmaceutique

- 2 - LA CULTURE DES IGNAMES ET SES CONTRAINTES
 - 2.1 - Mode de reproduction
 - 2.2 - Rendements
 - 2.3 - Qualité des produits récoltés
 - 2.4 - Problèmes de main d'oeuvre
 - 2.5 - Problème de la masse végétale
 - 2.6 - Problèmes phytosanitaires

- 3 - L'AMELIORATION VARIETALE DES IGNAMES COMESTIBLES
 - 3.1 - Biologie de la reproduction sexuée chez les ignames
 - 3.2 - Les variétés améliorées

- 4 - LA CULTURE IN VITRO DANS L'AMELIORATION GENETIQUE DES IGNAMES
 - 4.1 - La multiplication et la conservation de génotype
 - 4.2 - La production de métabolite secondaire
 - 4.3 - La recherche de variabilité génétique

- 5 - CONCLUSION

- 1 - LE MATERIEL VEGETAL
- 2 - LES MILIEUX DE CULTURES
 - 2.1 - Les éléments minéraux
 - 2.2 - Les composés organiques
 - 2.3 - Remarque
- 3 - TECHNIQUES ET CONDITIONS DE CULTURE
 - 3.1 - Désinfection et multiplication du matériel végétal
 - 3.2 - Callogenèse et culture de cal
 - 3.3 - Les conditions de culture
- 4 - NOTATIONS ET MESURES
 - 4.1 - L'initiation des cals
 - 4.2 - L'entretien des cals
 - 4.3 - L'organogénèse
- 5 - TECHNIQUES CYTOLOGIQUES
- 6 - METHODE DE TRAITEMENT DES DONNEES
 - 6.1 - Dispositifs expérimentaux planifiés
 - 6.2 - Test du domaine expérimental point par point
 - 6.3 - transformation de variables

- 1 - INFLUENCE DE L'EXPLANT INITIAL SUR LA CALLOGENESE ET L'ORGANOGENESE ULTERIEURE
 - 1.1 - Expérience
 - 1.2 - Résultats
 - 1.3 - Discussion
 - 1.4 - Conclusion
- 2 - INFLUENCE DE L'AGE ET DE LA POSITION DE L'ORGANE SUR LA PLANTE MERE
 - 2.1 - Influence de l'âge de la feuille terminale
 - 2.2 - Influence du niveau de prélèvement
 - 2.3 - Discussion

- 3 - INFLUENCE DE LA POSITION SUR LE MILIEU ET DE LA TAILLE DE L'EXPLANT INITIAL
 - 3.1 - Position de l'explant sur le milieu
 - 3.2 - Taille de l'explant
- 4 - CONCLUSION
- 5 - RESUME

CHAPITRE 4 - INDUCTION ET ENTRETIEN DES CALS

63

- 1 - CHOIX DES COMBINAISONS AUXINE-CYTOKININE DANS LE MILIEU DE CALLOGENESE
 - 1.1 - Comparaison de 6 auxines différentes au niveau 10^{-5} M
 - 1.2 - Comparaison de l'ANA, de l' α 2,4,5 T et du 2,4-D à différentes concentrations
 - 1.3 - Conclusions
- 2 - AMELIORATION DU MILIEU DE CALLOGENESE CHEZ D. ALATA CV BRAZO FUERTE
 - 2.1 - Recherche du niveau optimal de kinétine dans le milieu de callogenèse
 - 2.2 - Recherche du niveau optimal de 2,4-D dans le milieu de callogenèse en fonction de différentes concentrations de kinétine
 - 2.3 - Recherche du niveau optimal de saccharose dans le milieu de callogenèse
 - 2.4 - Etude de trois facteurs à la fois : 2,4-D, kinétine et saccharose
- 3 - AMELIORATION DU MILIEU DE CALLOGENESE CHEZ LES QUATRE CULTIVARS ETUDIES
 - 3.1 - Niveau optimal de 2,4-D pour la callogenèse d'explant P1
 - 3.2 - Etude simultanée des 3 facteurs 2,4-D, kinétine et saccharose chez D. trifida
 - 3.3 - Influence du milieu mineral
 - 3.4 - Discussion
- 4 - CHOIX D'UN MILIEU POUR LA CROISSANCE DES CALS
 - 4.1 - Croissance de l'ensemble du cal et de l'explant initial
 - 4.2 - Croissance du cal séparé de l'explant initial

4.3 - Conclusion

5 - INFLUENCE DE FACTEURS PHYSIQUES SUR LA CALLOGENESE ET LA CROISSANCE DES CALS

5.1 - Influence de la température

5.2 - Influence de la lumière

6 - ETUDE CYTOLOGIQUE DE LA CALLOGENESE

6.1 - Etude de la callogénèse sur milieu MC

6.2 - Etude de la callogénèse sur milieu riche en saccharose

6.3 - Discussion

7 - CONCLUSION

8 - RESUME

CHAPITRE 5 - ORGANOGENESE DE TIGES

97

1 - ORGANOGENESE DE TIGE A PARTIR DE CALS INITIES ET ENTRETIENUS SUR DES MILIEUX RICHES EN AUXINE

1.1. - Influence des phytohormones

1.2. - Influence de la concentration en sucre

1.3. - Influence de l'azote

1.4. - Influence du génotype

1.5. - Influence du milieu de callogénèse sur l'organogénèse ultérieure

1.6. - Organogénèse de cal isolé de l'explant initial

1.7. - Comparaison des plantes issues de microbouturage et des plantes issues d'un cycle de callogénèse et de néoformation

2 - ORGANOGENESE APRES UNE COURTE PHASE CALLOGENE

2.1. - Influence de la concentration en cytokinine

2.2. - Influence de la concentration en auxine

2.3. - Influence de la lumière

3 - ETUDE CYTOLOGIQUE

3.1. - Néoformation sur cal développé sur milieux riches en auxine

3.2. - Néof ormation sur cal développé sur milieux
pauvres en auxine

4 - CONCLUSION

5 - RESUME

CHAPITRE 6 : CONCLUSION

130

TABLE DES ABREVIATIONS

1 - PHYTOHORMONES

| | |
|-------------------|--|
| AIA | acide β -indolyacétique |
| AIB | acide β -indolybutyrique |
| ANA | acide naphthalène acétique |
| BAP | 6-benzylaminopurine |
| Kin | kinétine 5 furfuryl aminopurine |
| MCPA | acide 4 - chloro-2-méthylphénoxyacétique |
| NOA | acide β -naphtoxyacétique |
| Pi | picloram ou acide 4-amino 3,5,6-trichloropicolinique |
| α -2,4,5-T | acide α -2,4,5-trichlorophénoxypropionique |
| 2,4-D | acide 2,4-dichlorophénoxyacétique |
| 3,4-D | acide 3,4-dichlorophénoxyacétique |

2 - AUTRES COMPOSES DES MILIEUX DE CULTURE

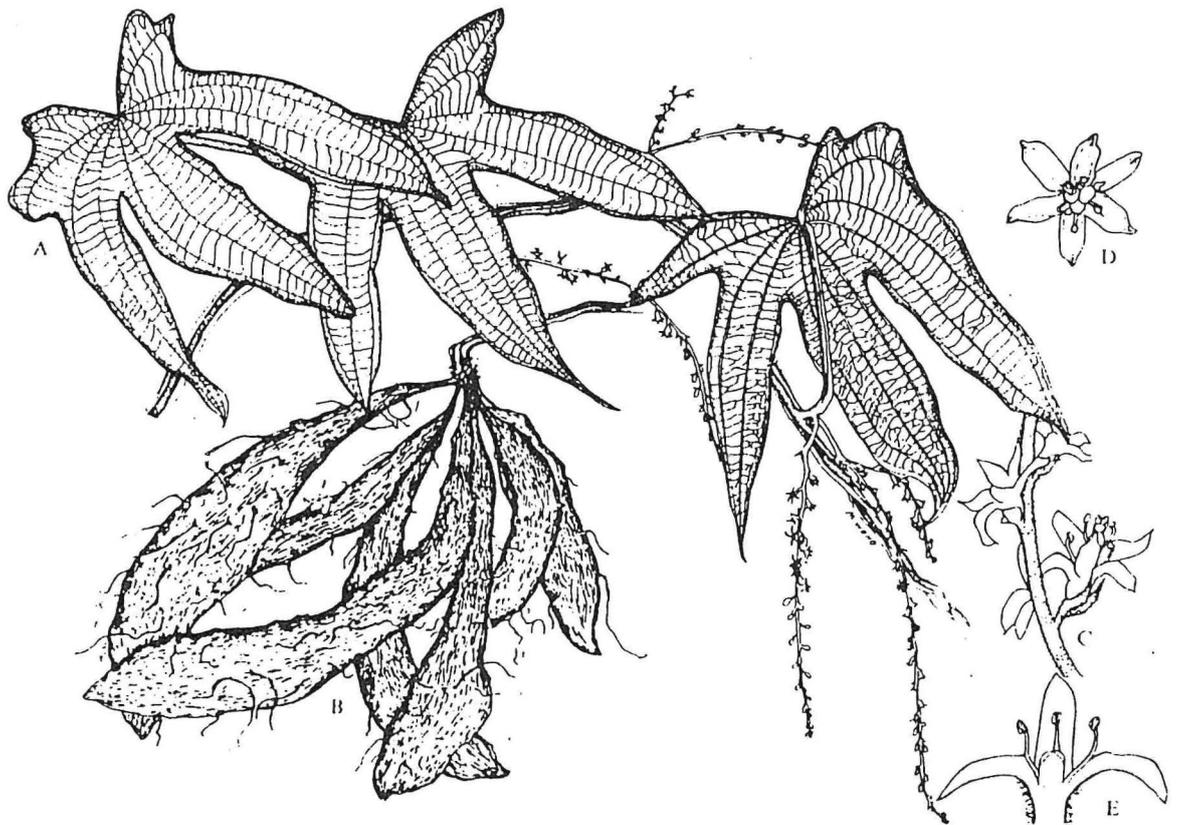
| | |
|---------|--|
| ADN | acide desoxyribonucléique |
| Ads | sulfate d'adénine |
| C.W | lait de coco ou eau de coco |
| Fe EDTA | fer chélaté par le tétraacétate d'éthylène diamine |
| Sac | saccharose |

3 - DIVERS

| | | |
|------|--|-------------------|
| cv | cultivar | |
| DS | différence significative au seuil 5 % | |
| DNS | différence non significative au seuil 5 % | |
| LS | milieu de LINSMAIER et SKOOG (1965) | |
| M 50 | milieu de microbouturage | } |
| MB | milieu de base | |
| MC | milieu de callogenèse | |
| ME | milieu d'entretien | |
| MR | milieu de régénération | |
| MS | milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962) | cf tableau 6 p 27 |
| RT | milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962) modifié par KAUL et STAPA (1968) | cf tableau 6 p 27 |
| SH | milieu de SCIENK et HILDEBRANDT (1971) | |
| S30 | milieu de régénération | cf tableau 8 p 28 |
| var | variété | |

INTRODUCTION

Dioscorea trifida



Dioscorea alata :

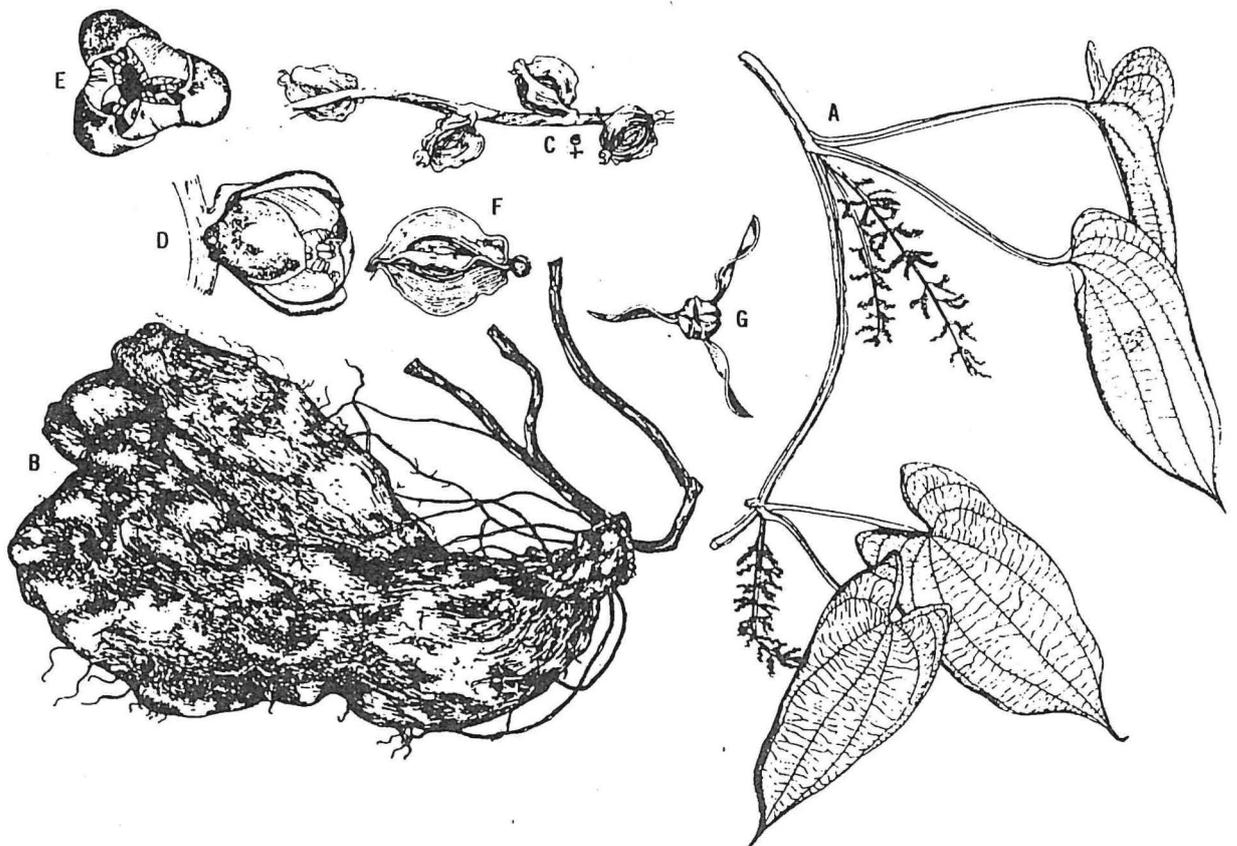


Planche 1 : Dioscorea alata et Dioscorea trifida (d'après PURSEGLOVE , 1972)

- Légende :
- A : portion de tige avec les inflorescences mâles
 - B : tubercule
 - C : portion d'inflorescence femelle ♀ ou mâle ♂
 - D, E : fleurs mâles
 - F, G : fleurs femelles

Depuis les temps préhistoriques, les populations d'Asie et d'Afrique tropicale ont consommé des tubercules d'ignames pour satisfaire leurs besoins alimentaires (ALEXANDER et COURSEY, 1969 ; COURSEY, 1975). Aujourd'hui, cette culture reste limitée à quelques régions qui lui sont traditionnellement et culturellement attachées : l'Afrique de l'Ouest qui produit les 3/4 de la production mondiale, les Caraïbes et certaines régions de l'Asie du Sud-Est (COURSEY, 1967). Très fortement concurrencée par le manioc et la patate douce, la production mondiale des ignames a peu évolué au cours des 20 dernières années*.

Pour redonner de l'essor à la culture de l'igname, il faut modifier considérablement les variétés actuelles, afin de les adapter aux exigences d'une agriculture moderne plus productive. Or l'amélioration génétique des ignames comestibles par voie sexuée se heurte à de nombreuses difficultés et elle n'a pas permis, jusqu'à présent, de diffuser des hybrides supérieurs aux variétés traditionnelles.

La culture *in vitro* offre la possibilité de créer une variabilité sans faire intervenir la reproduction sexuée. Diverses techniques ont déjà donné des résultats et, en particulier, des néoformations à partir de cals ont été, chez de nombreuses espèces, source de variations somaclonales utilisables en amélioration des plantes. C'est dans ce cadre que s'inscrit notre travail qui porte sur les modalités de callogenèse et de néoformation de tiges chez deux espèces d'ignames comestibles : *Dioscorea alata*, cvs Brazo Fuerte et Florido et *D. trifida*, cvs Moengo V et INRA 5-20 (cf planche 1).

Nous présentons tout d'abord les ignames, les problèmes que posent leur culture et leur sélection et le rôle que peut jouer la culture *in vitro* dans l'amélioration variétale de ces espèces. Puis nous exposerons les techniques utilisées au cours de notre étude. Nos résultats seront divisés en 3 chapitres :

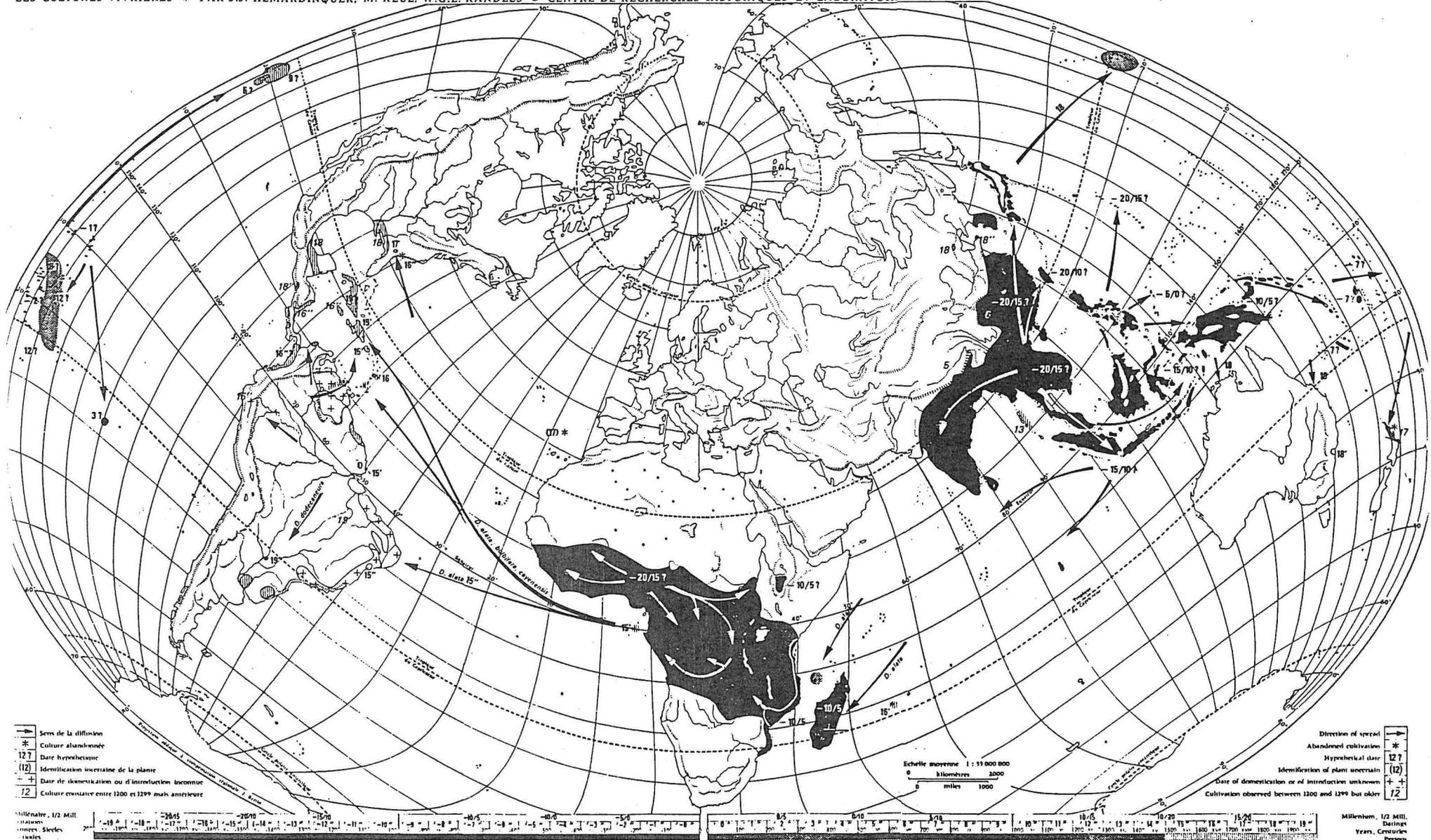
- le choix de l'explant initial,
- la callogenèse et l'entretien des cals d'explants foliaires,
- l'obtention de néoformations à partir de cals ou de fragments de feuilles.

En conclusion, nous exposerons quelques orientations pour la poursuite de cette étude.

* d'après les informations données par la Division Statistique de la FAO, 1984.

CHAPITRE 1 : GENERALITES

INVENTAIRE GÉOGRAPHIQUE ET CHRONOLOGIQUE POUR UN ATLAS D'HISTOIRE MONDIALE
 LES CULTURES VIVRIÈRES * PAR J.J. HEMARDINQUER, M. KEUL, W.G.L. RANDES * CENTRE DE RECHERCHES HISTORIQUES ET LABORATOIRE DE CARTOGRAPHIE DE L'ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES * PARIS 1968



REPARTITION MONDIALE DES IGNAMES COMESTIBLES
 d'après BERTIN et al., 1971

1 - PRESENTATION DES DIOSCOREACEES

Les ignames regroupent un ensemble d'environ 600 espèces appartenant au genre Dioscorea et réparties, pour la plupart, dans la zone intertropicale.

1.1 - Origine et dispersion

Le centre d'origine des Dioscoreacées est probablement l'Asie du Sud-Est où elles se sont différenciées à la fin de l'ère secondaire. Avec la formation de l'Atlantique, au Crétacé, les espèces de Dioscoreae américaines se séparent des espèces afroasiatiques (BURKILL, 1960 ; COURSEY, 1967). Il y aurait donc trois centres de diversification des ignames : l'Asie tropicale, l'Afrique occidentale et l'Amérique tropicale (cf carte de la répartition mondiale des ignames). Les espèces qui ont été étudiées dans ce travail sont d'origine asiatique (D. alata) et américaine (D. trifida).

On ne connaît pas de formes sauvages de D. alata. Elle proviendrait probablement de plantes dérivées de deux espèces sauvages D. hamiltonii et D. persimilis qui sont botaniquement très proches de D. alata (COURSEY, 1969). Il existe par contre des formes sauvages de D. trifida en Amérique et de D. cayenensis en Afrique.

1.2 - Classification

Les ignames appartiennent à :

- la classe des Monocotylédones,
- l'ordre des Liliales,
- le sous ordre des Protoliliales,
- la famille des Dioscoreacées,
- le genre Dioscorea

(d'après BURKILL, 1960 ; cf tableau 1).

La classification des Dioscoreacées reste encore controversée et des études sont en cours pour clarifier les problèmes taxonomiques, en particulier ceux des espèces D. cayenensis et D. rotundata chez lesquelles de nombreux auteurs voient actuellement une seule espèce. (MIEGE, 1982 a, b, c ; IKEDIABI et IGBOANUSSI, 1983 ; HAMON et al., 1985).

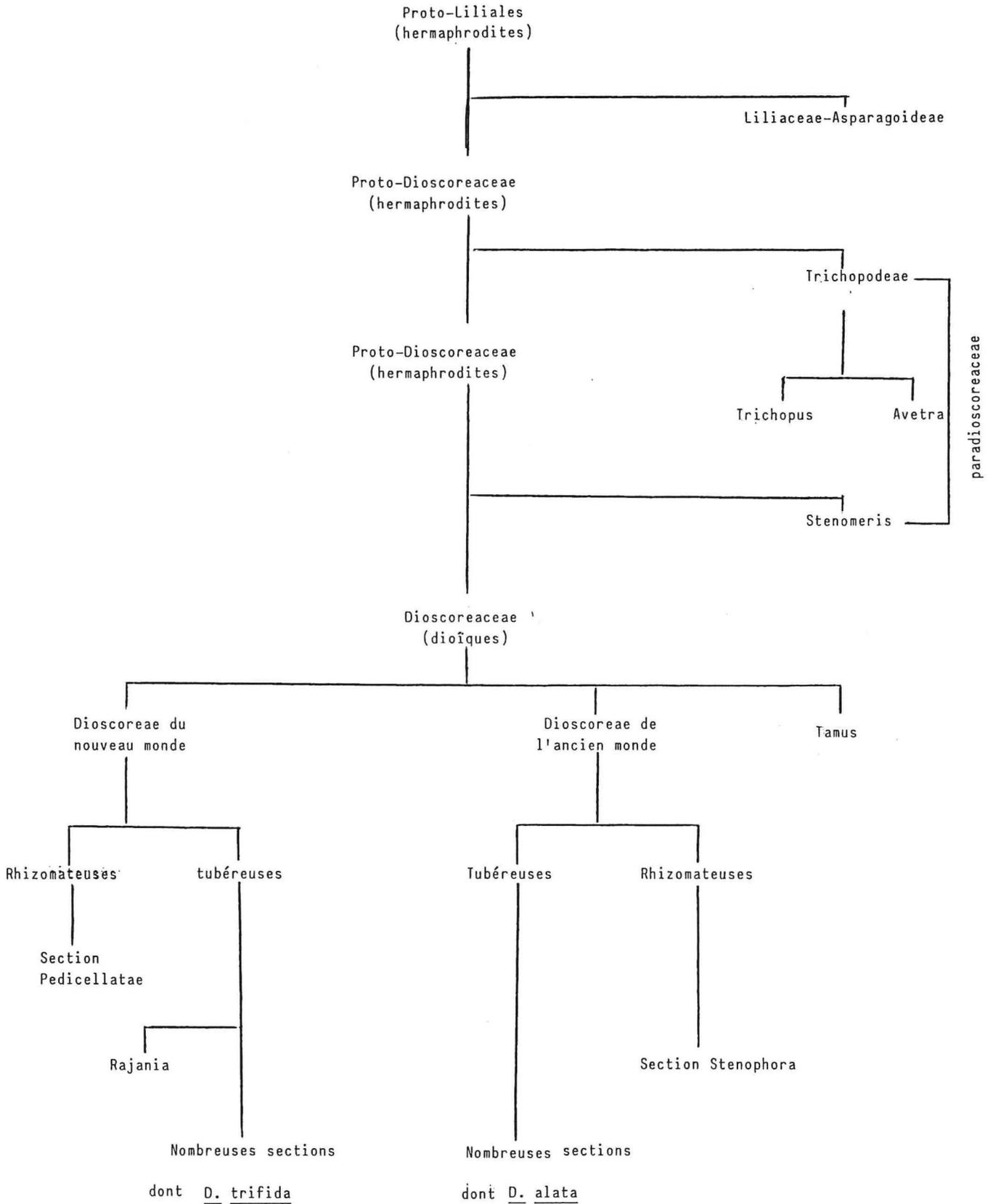


TABLEAU 1 : Classification des Dioscoreacées

(d'après BURKILL, 1960)

1.3 - Nombres chromosomiques

Le nombre de base est $x = 10$ pour les espèces asiatiques et $x = 9$ ou 10 pour les espèces américaines et africaines. Le niveau de ploïdie est variable selon les espèces et les cultivars mais il est généralement élevé entre $2x$ et $10x$ avec tous les intermédiaires possibles. La polyploïdie s'est exercée librement, soit par autopolyploïdie (forme à $4x$ et à $8x$) soit par allopolyploïdie. Les formes aneuploïdes sont rares (MARTIN, 1966). Les nombres chromosomiques rencontrés les plus fréquemment sont : $2n = 40, 60$ ou 80 chez *D. alata* (MARTIN et ORTIZ, 1963 ; RAMACHANDRAN, 1968) et $2n = 80$ chez *D. trifida* (ESSAD, 1984). La polyploïdie de ces espèces peut expliquer leur faible fertilité.

1.4 - Les ignames comestibles et les ignames d'intérêt pharmaceutique

Les ignames sont cultivées principalement pour leur intérêt alimentaire. Elles produisent des tubercules riches en amidon avec une teneur non négligeable en protéines (MARTIN, 1976 ; BOURRET, 1973). Les ignames sont déficientes en lipides mais elles ont une teneur assez élevée en vitamine A et C. Une cinquantaine d'espèces sauvages, parfois à demi domestiquées sont consommables (MARTIN et DEGRAS, 1978b). Elles sont consommées en cas de disette, ou traditionnellement dans le cadre d'une protoagriculture de forêt : les pygmées laissent en terre un fragment de tubercule après en avoir prélevé une partie (BAUCHEU, 1982). Les tubercules de ces espèces sauvages ont une teneur élevée en amidon associée parfois à une assez forte teneur en protéines (10 % de la matière sèche) mais ils présentent de nombreux caractères indésirables : alcaloïdes toxiques, tubercules très profonds, difficiles à déterrer, couverts d'épines... (HLADIK et al., 1984).

Les ignames comestibles sont surtout représentées par une douzaine d'espèces cultivées : les principales sont *Dioscorea alata* et *D. cayenensis-rotundata* suivies par *D. esculenta*, *D. trifida* et *D. bulbifera*. Ces cinq espèces assurent environ 95 % de la production mondiale (MARTIN et DEGRAS, 1978b). Les autres espèces cultivées, de moindre importance, sont : *D. opposita*, *D. japonica*, *D. dumetorum* et *D. hispida* et enfin, *D. pentaphylla*, *D. numilaria* et *D. transversa*. Les ignames viennent en quatrième place dans la production mondiale de tubercules après la pomme de terre, le manioc et la patate douce. D'après les statistiques de la FAO (1974-1982)*, la production mondiale est comprise entre 20 et 25 millions de tonnes, les deux principaux pays producteurs étant le Nigéria et la Côte d'Ivoire.

* d'après les informations données par la Division Statistique de la FAO, 1984.

Depuis les travaux de MARKER et al. (1947), l'industrie pharmaceutique s'est intéressée aux espèces de Dioscorea sauvages qui contiennent des stéroïdes du type sapogénine (principalement la diosgénine) qui s'accumule dans les organes de réserve. Les espèces qui contiennent le plus de sapogénines sont D. composita, D. spiculiflora, D. floribunda, et D. deltoidea (MARTIN, 1972). La diosgénine est utilisée comme molécule de base dans des chaînes de synthèse aboutissant aux hormones sexuelles, aux composés contraceptifs, aux cortisoniques et à la spirolactone (BACCOU, 1984 et SAUVAIRE, 1984).

2 - LA CULTURE DES IGNAME ET SES CONTRAINTES

2.1 - Mode de reproduction

Le mode de reproduction habituel est la multiplication végétative. Il est possible de faire des boutures de tiges (FERGUSSON, 1972), mais dans la pratique agricole, on plante des fragments de tubercules, des petits tubercules formés à côté du tubercule principal, des tubercules de deuxième récolte ou parfois des bulbilles. Ce mode de reproduction est coûteux. Les ignames semences représentent 10 à 30 % du poids de la récolte. Leur conservation est médiocre ; les semencaux sont lourds (au minimum 200 g), fragiles et de taille irrégulière. Ils sont, de plus, hétérogènes et leur levée est irrégulière et souvent mauvaise. Ceci entraîne une grande concurrence des adventices (et un travail de sarclage important), une forte hétérogénéité des calibres des tubercules à la récolte et des rendements d'autant plus faibles que la levée est tardive (VANDEVENNE, 1976).

2.2 - Rendements

Bien qu'en culture monospécifique intensive les rendements puissent atteindre 50 T/ha chez D. alata, D. trifida et D. cayenensis, ceux-ci sont en général beaucoup plus faibles : 10 à 20 T/ha (IITA annual reports 1980 à 1982 ; DEGRAS, 1976 ; RODRIGUEZ, 1983 ; DUMONT, 1984a).

2.3 - Qualité des produits récoltés

Les tubercules présentent une grande variabilité en forme et en taille. Ils sont cassants et leur épiderme est souvent rugueux, irrégulier et fragile. Afin de faciliter la récolte et son éventuelle mécanisation, on recherche des tubercules réguliers ovales ou ronds, résistants aux chocs, de calibre homogène et pas trop volumineux. Ils doivent également bien se conserver au cours du stockage et posséder de bonnes qualités culinaires (temps de cuisson moyen ou court ; chair onctueuse, ni amère ni trop sucrée) et nutritives (teneurs en matière sèche, en acides aminés et en vitamines élevées).

2.4 - Problèmes de main d'oeuvre

La production vient essentiellement de petites exploitations traditionnelles et la culture est entièrement manuelle. C'est une culture exigeante en main d'oeuvre : le billonnage, la plantation, le tuteurage, les sarclages et la récolte requièrent de nombreuses heures d'un travail pénible : environ 200 jours par hectare (OLYMPIO, 1982 ; ONIUENE, 1982 a, b ; DUMONT, 1984b). Dans ces conditions, l'igname apparaît plutôt comme une culture maraichère de luxe ou une grande culture. Des études ont été faites pour mécaniser cette culture afin de réduire les temps de travaux et simplifier les opérations culturales (VANDEVENNE et TOURIZEVITCH, 1977). La mécanisation permet un gain de temps important (VANDEVENNE, 1973b ; SOULEYMANE, 1984).

2.5 - Problème de la masse végétale

Les ignames sont des lianes à grand développement végétatif pouvant atteindre 30 mètres de longueur de tiges avec un nombre total supérieur à 1000 feuilles (TROUSLOT, 1985). Les ignames cultivées sont généralement tuteurées. Le tuteurage est coûteux et gêne la mécanisation des sarclages et de la récolte ; mais l'absence de tuteurage aggrave les dégâts des maladies fongiques et réduit les rendements (WATT, 1963 ; OKOLI, 1982 ; NIANTIKI et al., 1985).

2.6 - Problèmes phytosanitaires

Le mode de propagation par voie végétative favorise la transmission des maladies d'une culture à la suivante.

Chez D. trifida et D. cayenensis-rotundata, les maladies les plus graves sont les viroses, en particulier la mosaïque des feuilles (EDWIGE, 1979 ; HAQUE et MANTELL, 1980 ; THOUVENEL et FAUQUET, 1980 et 1982).

Chez D. alata c'est l'antracnose due à Colletotrichum gloeosporioides qui est la principale maladie foliaire (BAUDIN, 1956 ; TORRIBIO et al., 1980 ; WINCH et al., 1984 ; NOTTEGHEM, 1985).

Certaines variétés, très appréciées des consommateurs mais sensibles ont été presque totalement éliminées par l'antracnose. C'est le cas, par exemple de la variété Pacala aux Antilles. Il existe des variétés résistantes mais elles n'ont pas toujours de bonnes aptitudes agronomiques et culinaires (MINUCCI et al., 1985 ; PALCY et al., 1985).

D'autre part, les nématodes causent des dégâts importants : le principal nématode des ignames, Scutellonema bradys, est responsable de graves pertes occasionnées pendant le stockage des tubercules (DEGRAS et KERMARREC, 1976 ; KERMARREC et al., 1980 ; BRIDGE, 1982).

3 - L'AMELIORATION VARIETALE DES IGNAME COMESTIBLES

3.1 - Biologie de la reproduction sexuée chez les ignames

3.1.2 - La fertilité

La reproduction par graine est possible mais elle est réduite chez les espèces cultivées. Les ignames sauvages, au contraire, sont florifères et se reproduisent par graines (MARTIN et al., 1963 ; PAO et al, 1973 ; ARAKI et al., 1983 ; DUMONT, 1985). Il n'y a que quelques espèces comestibles qui présentent des problèmes de fructification dans le genre *Dioscorea*. La perte de fertilité chez ces espèces serait une conséquence de la domestication (COURSEY, 1976).

Dioscorea alata est presque totalement stérile : sur des milliers de capsules collectées, on obtient quelques dizaines de graines viables (JOS et VIJAYA BAI, 1980) et sur des milliers de pollinisations manuelles effectuées à l'IITA d'Ibadan, il n'a été récolté que 600 fruits et 40 graines viables (IITA Annual Report 1979). Par contre chez *D. trifida* et *D. rotundata*, le pourcentage de graines obtenues est beaucoup plus élevé même s'il reste irrégulier et limité à certains clones (SADIK et OKEREKE, 1975a ; IITA annual report, 1976 ; DEGRAS, 1982).

3.1.3 - La dioécie

Les ignames sont dioïques avec cependant quelques exceptions (individus monoïques ou même à fleurs hermaphrodites). Certains cultivars ont une floraison abondante mais chez d'autres, on n'a jamais observé de fleurs. Parmi les clones qui fleurissent, il y a beaucoup plus de clones mâles que de clones femelles (DOKU, 1982 ; DEGRAS, 1982 ; BULLE LEGRAND, 1983). Chez *D. alata*, la plupart des clones qui fleurissent sont mâles (MIEGE, 1952) ; il existe quelques clones femelles mais leur floraison est très rare et très irrégulière, pour certains clones moins d'une fois tous les dix ans. (DUMONT, communication personnelle).

3.1.4 - La floraison mâle et la pollinisation

Les fleurs mâles sont groupées en inflorescence de type grappe plus ou moins complexe ; elles sont très petites (4 à 6 mm de longueur) et elles contiennent 6 étamines. Le pollen est collant et la pollinisation semble assurée par des insectes dont Larothrips dentipes (SADIK et OKHEREKE, 1975b). Le nombre de grains de pollen par anthère, la viabilité du pollen et sa fertilité in vitro et in vivo varient considérablement suivant l'espèce et le cultivar (OKHEREKE, 1977 ; BULLE LEGRAND, 1983 ; AKORODA, 1983a).

3.1.5 - La floraison femelle et la fructification

Les fleurs femelles sont groupées en épis. L'inflorescence femelle est plus simple que l'inflorescence mâle et elle contient moins de fleurs. L'ovaire est infère, triloculaire à placentation axile avec 2 ovules par loge (CHADEFAUD et EMBERGER, 1960). Le fruit est une capsule triloculaire qui peut contenir jusqu'à 6 graines ailées. Chez les ignames comestibles, une grande partie de ces graines sont vides, et chez D. rotundata par exemple, plus de la moitié des graines pleines ont un embryon malformé incapable de germer (SADIK et OKHEREKE, 1975a).

Certains clones fleurissent bien, cependant, même en présence de pieds mâles à floraison abondante, le pourcentage de fleurs femelles qui avorte est très élevé. Divers degrés de stérilité ont été observés : dessèchement complet des inflorescences, abscission des fleurs, arrêt du développement des fleurs (DOKU, 1982).

Les causes de la stérilité des ignames comestibles n'ont pas encore été élucidées. Plusieurs hypothèses ont été émises : faible fertilité du pollen ; déficience des ovules ; blocage au niveau de la pollinisation ou de la fécondation...

3.2 - Les variétés améliorées

Jusqu'à présent, l'amélioration génétique des ignames comestibles a été basée principalement sur la sélection clonale : les mutations naturelles ont été les principaux facteurs de l'amélioration effectuée par les paysans au cours des siècles ; les croisements n'y auraient joué qu'un rôle minime (COURSEY, 1976 ; OKOLI, 1982). Des travaux d'électrophorèse réalisés sur 800 cultivars de D. cayenensis-rotundata ont montré que cette espèce pouvait être divisée en quelques groupes extrêmement homogènes (HAMON et TOURE, 1985). Il est très probable que les différences entre cultivars d'un même groupe proviennent de diverses mutations à partir d'un clone.

Cependant le taux de mutations naturelles est très faible, et à notre connaissance, une seule expérience a été tentée pour augmenter ce taux de mutation chez les ignames comestibles : cette expérience d'irradiation de vitroplants et de tubercules menée sur D. trifida n'a pas encore donné de résultats (DEGRAS, MARIE, communications personnelles). Actuellement donc, l'introduction de variétés étrangères demeure quasiment l'unique source de renouvellement génétique.

Peu d'études ont été faites pour améliorer les ignames comestibles par hybridation. Cependant, deux programmes importants ont ouvert la voie de la reproduction sexuée comme technique de création variétale chez ces espèces :

- un programme d'hybridation entrepris à partir de 1966 au centre INRA de Guadeloupe sur *D. trifida* principalement, mais également sur *D. cayensis* et *D. alata* (DEGRAS, 1984). Plusieurs hybrides intraspécifiques de *D. trifida* ont donné des rendements plus élevés que les variétés locales mais avec une qualité moyenne des tubercules (DEGRAS, 1982). Cependant, le clone hybride INRA 5-20 présente une bonne aptitude culinaire (DEGRAS et al., 1980).

- un programme d'hybridation entrepris à partir de 1975 à l'IITA d'Ibadan sur *D. rotundata* principalement mais également sur *D. cayensis*, *D. dumetorum* et *D. alata*. Des dizaines de milliers de plantules issues de graines de *D. rotundata* ont été obtenues et étudiées au point de vue du rendement, de la résistance aux maladies, de l'architecture de la plante, de la qualité et la forme des tubercules et de la conservation (WILSON, 1982). Certains clones, sélectionnés dans la descendance des graines, ont donné des rendements plus élevés que les variétés locales, mais des qualités agronomiques ou culinaires moindres (IITA annual report, 1979 et 1982, AKORODA, 1983 b).

On pourrait attribuer les rendements élevés obtenus par les clones issus de graines à l'élimination des virus lors de la reproduction sexuée. En effet, il a été montré une corrélation positive hautement significative entre la gravité des viroses et la perte de rendement chez les ignames sensibles par exemple chez *D. cayensis-rotundata* (DUMONT, 1984, b). Chez *D. trifida*, le clone hybride INRA 5-20 s'est révélé très sensible aux virus, ce qui réduit considérablement sa production (BUFFON, 1980), malgré ses bonnes potentialités.

Les croisements réalisés ont permis de faire les premières études sur la génétique et l'hérédité de certains caractères chez *D. rotundata* (WILSON et VICTOR, 1980 ; WILSON, 1982 ; AKORODA, 1983 b) et *D. trifida* (DEGRAS, 1982). Il est à noter que de très nombreux génotypes issus de croisements entre cultivars intéressants présentent des caractères primitifs indésirables par exemple des tubercules longs et effilés (TROUSLOT, 1985).

4 - LA CULTURE IN VITRO DANS L'AMELIORATION GENETIQUE DES IGNAMES

A partir des premiers essais effectués par HABERLANDT en 1902, la culture in vitro a évolué jusqu'à la mise au point de cultures indéfinies de tissus de Dicotylédones (GAUTHERET, 1939 ; NOBECOURT, 1939 ; WHITE, 1939) et plus tard, de Monocotylédones (MOREL et WETMORE, 1950). On a obtenu depuis, des cultures de cals ainsi que des néoformations à partir de cals sur un très grand nombre d'espèces de Mono et de Dicotylédones (HUNAULT, 1978 ; 1979 a, b, c ; FLICK et al., 1983 ; AMIRATO, 1983 ; MARGARA, 1984 ; de FOSSARD, 1976).

Les premières publications sur la culture in vitro des Dioscoreacées portent sur la formation de bulbilles à partir de segments nodaux de D. opposita (SAWADA et al., 1958), D. batatas et D. japonica (ASAHIRA et NITSCH, 1968). Elles ont également concerné l'obtention de colonies tissulaires à partir de fragments de tubercules sur D. composita (NICKELL cité par GAUTHERET, 1959) et de bulbilles sur D. sansibarensis (RAO, 1969) et UDUEBO (1971), étudiant la formation des bulbilles à partir de segments nodaux de D. bulbifera), note l'apparition de cals sur certains milieux. A partir de ces premiers essais, la culture in vitro des Dioscoreacées s'est diversifiée dans 3 voies :

- la multiplication et la conservation de génotypes,
- la production de métabolites secondaires,
- la recherche de variabilité.

4.1 - La multiplication et la conservation de génotypes

Le microbouturage in vitro permet d'obtenir rapidement un très grand nombre de plantes à partir d'un seul individu. Il a été largement étudié chez les ignames alimentaires et pharmaceutiques afin d'assurer une multiplication rapide des meilleurs clones : sur D. alata, D. cayenensis-rotundata, D. bulbifera, D. trifida (MANTELL et al., 1978 ; ARNOLIN, 1980 ; GREGOIRE, 1980 ; CORTES-MONLLOR et LIU, 1983 ; DEGRAS, 1983) ; sur D. batatas et D. japonica (ASAHIRA et NITSCH, 1969) et sur D. floribunda (CHATURVEDI, 1975 ; AMMIRATO, 1982).

Des techniques de culture de méristèmes ont été mises au point dans un but phytosanitaire sur D. deltoidea (GREWAL et al., 1977), D. alata et D. rotundata (MANTELL et al., 1980 ; CORTES-MONLLOR et al., 1982 ; NG, 1983 ; NG et HAHN, 1985). Elles permettraient l'élimination des virus qui se raréfient à proximité du méristème. La thérapie appliquée sur le vitroplant semble efficace pour l'éradication de certains virus chez l'igname (BALAGNE, 1985). Elle pourrait être associée à la culture de méristème pour renforcer l'efficacité de cette méthode. Ces techniques suscitent beaucoup d'intérêt en raison de l'amélioration des rendements que pourrait apporter l'utilisation de clones sains. Cependant, la culture de méristème chez les Dioscoreae n'est pas suffisamment maîtrisée pour déboucher actuellement sur des applications agronomiques (SALEIL, communication personnelle).

Par ailleurs, des vitrothèques sont actuellement en cours de constitution pour la conservation des ressources génétiques (IITA annual report 1980 ; DEGRAS, communication personnelle ; NG et HAHN, 1985).

4.2 - La production de métabolites secondaires

La culture en champs des Dioscoreae sauvages s'étant révélée peu rentable pour l'industrie pharmaceutique (MARTIN, 1972), différentes équipes se sont orientées vers la production de diosgénine in vitro. Cependant, malgré des recherches nombreuses, la production de métabolites secondaires chez les ignames n'a jusqu'à présent pas eu d'applications industrielles, la production in vitro n'étant pas suffisante pour concurrencer d'autres sources de stéroïdes..

L'initiation et la culture de cals ont été étudiées chez les principales espèces productrices de diosgénine. Des milieux capables d'assurer une bonne croissance des cals et une production maximale en diosgénine ont été mis au point. Outre la diosgénine, les cals contiennent diverses sapogénines (TOMITA et al., 1970 ; RENARD, 1984). Les cals sont ensuite passés en suspension cellulaire, puis en culture continue en biofermenteur (TAL et GOLDBERG, 1982).

Les milieux de culture les plus couramment employés pour l'induction et la croissance des cals sont le milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962) et le milieu RT (KAUL et STABA, 1968). L'hormone presque exclusivement utilisée lors de ces deux étapes est le 2,4-D. Le tableau 2 rassemble les descriptions des conditions de callogenèse chez les diverses espèces de Dioscorea qui ont fait l'objet d'études.

4.3 - La recherche de variabilité génétique

A l'issue du VIIème symposium de la Société Internationale pour les Plantes à Tubercules Tropicales (Guadeloupe, juillet 1985), trois orientations ont été retenues dans la recherche de variabilité par culture in vitro chez les ignames :

- l'haploïdie,
- la variation somaclonale,
- la culture et la fusion de protoplastes.

4.3.1 - L'haploïdie

A notre connaissance, une seule étude a été faite sur ce sujet : des cultures d'anthers, réalisées chez D. trifida, ont donné quelques divisions des microspores (ARNOLIN, 1976). Ce travail n'a pas été poursuivi. Cette voie pourrait cependant contribuer efficacement à l'amélioration des ignames d'après les résultats obtenus chez les autres espèces polyploïdes :

L'obtention d'haploïdes par androgenèse ou gynogenèse a été réalisée chez de nombreuses plantes ; nous ne citerons que quelques espèces de type polyploïde : blé tendre (DE BUYSER et HENRY, 1979, 1980) ; canne à sucre (FITCH et MOORE, 1983) ; Ray gras (PAGNIEZ et DEMARLY, 1979) ; pomme de terre (DUNWELL et SUNDERLAND, 1973 ; WEATHERHEAD et HENSHAW, 1979)... Il est également possible d'induire le développement d'haploïdes par parthenogénèse in vitro (HERMSEN et VERDENIUS, 1973).

TABEAU 2 : CALLOGENESE ET CULTURE DE CAL CHEZ DIVERSES DIOSCOREAE

| Espèces | Explant d'origine | Milieu minéral | Hormones dans le milieu de collagenèse | Hormones dans le milieu d'entretien | Sucre + composés organiques divers | Conditions culturales | Fréquence des repiquages | But de l'expérience | Références |
|--------------|-------------------|----------------------------|---|--|---|-----------------------------------|--------------------------|---|--|
| D. deltoidea | tubercules | MS modifié | 2,4-D 6mg/l +AIA 1mg/l +Kin 0,5mg/l | 2,4-D 1mg/l +AIA à 2,25mg/l + Kin 0,25mg/l | Adénine 5mg/l Mesoinositol 1g/l CW 15 % sac 30 g/l | 27 ° 14 h de jour | X | Détermination de la teneur en diosgénine des cals | CHATURVEDI et SRIVASTAVA, 1976 |
| | | Schenk Hildebrandt modifié | X | 2,4-D 2mg/l +AIA 2mg/l +Kin 0,5mg/l | Sac 30 g /l | 27° 15 h de jour | X | idem | CHATURVEDI et CHOWDHURY, 1980 |
| | | | X | 2,4-D 0,5mg/l AIA 2mg/l Kin 0,5mg/l | mesoinositol 500 mg/l sac 30 g | 27° 15 h de jour | X | Idem | CHOWDHURY et CHATURVEDI, 1980 |
| | | MS | X | 2,4-D 1mg/l | X | 27° 15 h de jour | X | Effet de l'azote sur la différenciation ultérieure du Cal | SINGH, 1978 |
| | | MS | X | 2,4-D 2mg/l | X | 27° 14 h de jour | X | Etude de la respiration | SINGH, 1982 |
| | Plantules | RT | 2,4-D 1mg/l | 2,4-D 1mg/l | Sac 30 g/l Mesoinositol 5g/l | Lumière du jour | 4 semaines | Détermination de la teneur en diosgénine | KAUL et STABA, 1968 |
| | Rhizomes | MS ou RT | 2,4-D 1mg/l Kin 0,1 mg/l | 2,4-D 1mg/l | Sac 30 g/l hydrolysate de caseine | Obscurité ou lumière diffuse | 6 semaines | Etude des conditions de culture des cals | ABROSHNIKOVA et al, 1971 |
| | | X | RT | X | 2,4-D 1mg/l | Extrait de levure sac : 30 g/l | 16 h de jour | 3 semaines | Détermination de la teneur en diosgénine |

| Espèces | Explant d'origine | Milieu minéral | Hormones dans le milieu de callogenèse | Hormones dans le milieu d'entretien | Sucre + composés organiques divers | Conditions culturales | Fréquence des repiquages | But de l'expérience | Références |
|--|---------------------|--------------------|---|-------------------------------------|------------------------------------|---------------------------|--------------------------|--|---|
| D. deltoidea | X | MS | X | Kin 0,1mg/l 2,4-D 1mg/l | hydrolysate de caseine 50 mg/l | X | 4 semaines | Etude de la mutagenèse | KARANOVA <u>et al</u> , 1979 |
| | X | MS | X | 2,4-D 0,1mg/l | X | 28° culture en fermenteur | X | Production de diosgénine | TAL et GOLDBERG, 1982 et 1983 |
| D. composita | noeuds de plantules | MS | 2,4-D 1mg/l | 2,4-D 1mg/l | myoinositol 5 g/l sac 30 g/l | 25° | X | Etude des réactions en culture in vitro | ORTEGA - PACHECO, 1970 |
| D. villosa D. balearica D. caucasica | hypocotyle | MS | 2,4-D 3mg/l | 2,4-D 1mg/l | Sac 30 g/l | X | 4 semaines | Détermination de la teneur en diosgénine | RENARD, 1984 |
| D. floribunda | Tubercules et apex | RT | 2,4-D 1mg/l | 2,4-D 2mg/l | X | 26 ° | 6 semaines | détermination de la teneur en diosgénine des cals | AMINUDDIN et CHOWDHURY, 1983 |
| | Plantules | RT | 2,4-D 3mg/l | 2,4-D 3mg/l | X | X | 6-8 semaines | idem | KHANNA <u>et al</u> , 1977 |
| | | RT | 2,4-D 1mg/l | 2,4-D 3mg/l | X | X | X | idem | KHANNA <u>et al</u> , 1980 |
| D. Sansibarensis | Bulbilles | White | 2,4-D 2mg/l | 2,4-D 2mg/l | Sac 10 g/l CW 10 % | X | X | Culture de cal | RAO, 1969 |
| D. Tokoro | Plantules | Linsmeier et Skoog | 2,4-D (10 ⁻⁶ à 10 ⁻⁵ M) Kin (0-2) mg/l | 2,4-D 10 ⁻⁶ M | X | 25° | 4 semaines | Détermination de la teneur en diosgénine des cals | TOMITA <u>et al</u> , 1970 |
| D. zingiberensis | hypocotyles | RT | 2,4-D:4mg/l | 2,4-D 4mg/l | sac 30 g/l | 24° | X | idem | Research group of plant morphology 1978 |
| D. alata D. bulbifera D. trifida | noeuds | MS | Kin 0,1mg/l ANA I mg/l 2,4-D I mg/l | - | Glutamine 200 mg/l Sac 30 g/l | 25-30° 12 h de jour | X | Etude des réactions des noeuds en culture in-vitro | ARNOLIN, 1980 |
| D. alata, D. esculenta D. rotundata | tubercules | MS | 2,4-D (5-50)10 ⁻⁶ M | X | Sac 30 g/l | 25° Obscurité | X | Activité invertasique des tissus | KOUASSI <u>et al</u> , 1984 |

X : information non précisée dans l'article

TABLEAU 3 : NEOFORMATIONS OBTENUES SUR DIVERSES DIOSCOREAE

| Espèces | Explant Explant d'origine | Milieu d'entretien du cal | Age et poids des cals mis sur milieu d'organogénèse | Milieu d'organogénèse | Résultats | But de l'expérience | Références |
|--|--|--|---|--|--|--|--|
| D. deltoidea | hypocotyles des graines en germination | MS + 2,4-D 1 mg/l | cal de 50 mg après le 6ème repiquage | RT + AIB 0,5 ppm + BAP 0,5 ppm | tiges après 2 mois | multiplication rapide | GREWAL et ATAL, 1976 |
| | plantules issues de graine | MS + ANA (1-5 mg/l) + lait de coco 10 % | cal après le 5ème repiquage | MS + KIN 1 mg/l + BAP (1-2 mg/l) MS + KIN (7 à 12 mg/l) + 2,4-D 0,01 mg/l | tiges après 45 jours | Etude des variants | MASCARENHAS, HENDRE, NADGIR, GHUGALE, GLOBBOLE, PRABHU, TAGANNATHAN, 1976 |
| | "tubercules" de plantules | X | X | MS + lait de coco 10 % | tiges après 4 semaines | | |
| | tubercules | MS + 2,4-D 1 mg/l | cal de 100 mg après le 7ème repiquage | MS modifié + 2,4-D 0,01 mg/l + KIN (6 à 12 mg/l) | embryogénèse somatique après 20 jours | étude de l'ef- fet de l'azote | SINGH, 1978 |
| MS + 2,4-D 2 mg/l | | cal après le 7ème repiquage | MS modifié + 2,4-D 0,01 mg/l + KIN 9mg/l | embryogénèse somatique | étude de la respiration | SINGH, 1982 | |
| D. composita | noeuds | RT + 2,4-D 2 mg/l + KIN 0,5 mg/l | cals de 1 g agés de 1 an | RT + ANA 0,5 mg/l + BAP 1,5 mg/l | tiges après 45 jours | étude des variants | DATTA S.K.. et al. 1981 |
| D. macrosta- chya | noeuds | X | X | MS + lait de coco 10 % + ANA 5 mg/l ou 2,4-D 5 mg/l | tiges après 8 semaines | multiplication rapide | MAPES et URATA, 1970 |
| D. floribunda | noeuds | MS + BAP (2mg/l) + 2,4-D 6 mg/l ou ANA 8 mg/l | 4ème repiquage | MS + ANA 4 mg/l + BAP 2 mg/l ou MS + 2,4-D 4 mg/l + BAP 2 mg/l | tiges après 20 jours | multiplication rapide et étude des variants | SENGUPTA et al, 1984 |
| | embryons excisés | MS + 2,4-D 4 mg/l | après 6 semaines de collagenèse et 8 semaines de culture en milieu liquide | MS + glutamine 500mg/l zeatine 0,1 um | embryogénèse somatique après 4 à 6 semaines | multiplication rapide - étude des variants | AMMIRATO, 1982 AMMIRATO, 1984 |
| | feuilles dressées | X | X | MS + ANA 0,1 mg/l + BAP 0,5 mg/l + Ads 50 mg/l | tiges après 15 jours | multiplication rapide | SINHA et CHATURVEDI, 1979 |
| D. alata | bulbilles anthocyanées | X | X | MS + KIN (10-14 mg/l) + 2,4-D (0,01 et 0,02 mg/l) | tiges après 6 à 7 semaines | multiplication rapide | ASOKAN, O'HAIR, LITZ, 1983 |
| D. alata D. rotundata D. esculenta | tubercules | X | X | MS + ANA (10^{-7} à 10^{-5} M) + KIN ($5 \cdot 10^{-7}$ à 10^{-6} M) | tiges (temps non précisé) | activité enzy- matique des cals | KOUASSI, VASSEUR, FOURNET, DUBOIS, 1984 |

X : Information non précisée dans l'article

Les haploïdes ont contribué à l'amélioration des plantes polyploïdes :

- en simplifiant l'analyse génétique : la réduction du nombre des chromosomes facilite la compréhension du déterminisme des caractères ; elle permet en outre, chez les cultivars allopolyploïdes, d'étudier les relations entre les différents génomes.

- en simplifiant la sélection par hybridation : l'amélioration des plantes polyploïdes par voie sexuée est longue et difficile à réaliser à cause de la complexité génétique des caractères. Chez la pomme de terre qui est tétraploïde, le passage au niveau dihaploïde permet une sélection plus rapide des caractères à déterminisme simple (MENDIBURU et al., 1974 ; HERMSEN et RAMADA, 1981). Le regroupement des gènes favorables sur un même individu peut être réalisé plus efficacement avec des effectifs plus faibles et moins de rétrocroisements pour l'élimination de caractères indésirables (PERENNEC, 1982). Cependant, l'importance des interactions au niveau tétraploïde dans l'expression de caractères quantitatifs tels que le rendement ne permet pas leur sélection au niveau dihaploïde (MENDOZA et HAYNES, 1974).

4.3.2 - L'utilisation de la variation somaclonale

Divers types de néoformations ont déjà été obtenues dans le genre Dioscorea (cf tableau 3) :

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

- néoformations de tiges à partir de cals de plantules issues de graines sur D. deltoidea (GREWAL et ATAL, 1976 et MASCARENHAS et al., 1976) et de cals de noeuds sur D. macrostachya (MAPES et URATA, 1970) et sur D. composita (DATTA et al., 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 ; ASOKAN 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 dans le genre Dioscorea, même si des études dans ce sens ont été entreprises (MASCARENHAS et al., 1976 ; ARSENE, 1979 ; DATTA et al., 1981). Ces études sont peu nombreuses ; aucun résultat (positif ou négatif) n'a été publié et certains travaux (celui d'ARSENE par exemple) n'ont pas été poursuivis. Il est probable, cependant, que des recherches systématiques sur les néoformations obtenues à partir de cals puissent mettre en évidence des variations somaclonales. C'est dans cette optique que s'inscrit notre travail.

4.3.2.1 - Résultats et perspectives chez diverses espèces

Les plantes néoformées à partir de cals peuvent présenter différents types de variation :

- des variations qui ne sont pas transmissibles par voie sexuée ou qui disparaissent après une ou deux générations de reproduction sexuée. Elles pourraient être causées par une rémanence des substances de croissance employées (CHALEFF et KEIL, 1982).

- des modifications chromosomiques : diverses anomalies peuvent être induites par le passage in vitro : polyploïdies, aneuploïdies, translocations, délétions, mutations géniques (SUNDERLAND, 1977 ; D'AMATO, 1978).

- des variations transmissibles mais de type non mendélien ou variations épigénétiques (SAN NOEUM et AHMADI, 1982) ; SIBI, 1982). Elles pourraient être dues soit à des modifications de l'ADN extranucléaire, celui des mitochondries par exemple (GENGENBACH et al., 1977) ; soit à un changement de la situation cytoplasmique des cellules qui induirait des modifications dans le fonctionnement du génome (DEARLY, 1976 ; SIBI, 1976).

Chez de nombreuses espèces cultivées (maïs, canne à sucre, riz, pomme de terre, tomate...), on a recherché et obtenu des variants présentant un intérêt agronomique (SKIRVIN, 1978 ; BRIGHT et al., 1983 ; CHALEFF, 1983 ; REISCH, 1983 ; SCOWCROFT et al., 1985). Les exemples les plus intéressants se rencontrent chez les plantes polyploïdes à multiplication végétative : canne à sucre, pomme de terre, Pélagonium (LARKIN et SCOWCROFT, 1981). On peut espérer qu'il en soit de même pour l'igname. Les caractères que l'on cherche à améliorer chez l'igname et qui, chez d'autres espèces, ont été modifiés après culture in vitro, sont les suivants :

a) La résistance aux maladies

Dans le criblage de la variation des plantes issues de cals, on observe parfois une tolérance accrue à certains parasites par exemple résistance à la maladie de Fiji chez la canne à sucre (KRISHNAMURTHI et TLASKAL, 1974). Dans le cas où le parasite agit par toxine microbienne, on peut orienter la variation en cultivant les cals sur des milieux contenant une toxine microbienne isolée ou un filtrat de culture microbienne. On a ainsi obtenu parmi les

plants régénérés à partir des cals, des résistances à diverses maladies (JAUBERTIE et al., 1978 ; BRANCHARD, 1984), par exemple : des maïs résistants à Helminthosporium maydis (GENGENBACH et al., 1977), des cannes à sucre résistantes à Helminthosporium sacchari (LARKIN et SCOWCROFT, 1983), des pommes de terre résistantes à Phytophthora infestans (BEHNKE, 1979)...

b) l'architecture de la plante

Des modifications de l'architecture des plantes ont été observées chez la tomate, la laitue (SIBI, 1981), la canne à sucre (CHACVARDIEFF, 1980 ; WAHOUNOU, 1985), le Pélargonium (SKIRVIN et JANICK, 1976)... et en particulier une masse foliaire plus compacte et plus efficace a été observée sur des variants de pommes de terre (SHEPARD et al., 1980).

c) Qualité des tubercules

On a obtenu des variations portant sur différents caractères des tubercules de pomme de terre (SHEPARD et al. 1980 ; SECOR et SHEPARD, 1981) :

- plus grande homogénéité en taille ou en forme,
- qualité de l'épiderme,
- composition chimique du tubercule,
- rendement.

4.3.2.2 - Application de cette méthode à l'igname

Les variations somaclonales pourraient être utilisées pour améliorer un caractère spécifique dans un clone déjà sélectionné. (SKIRVIN et JANICK, 1976 ; EVANS et al., 1984). Les variations intéressantes et stables pourraient être fixées par multiplication végétative permettant ainsi la création d'une variabilité qui ne bouleverse pas complètement le génotype et qui apporte une amélioration ponctuelle sur des variétés d'ignames satisfaisantes par ailleurs.

On pourrait par exemple rechercher une résistance à l'antracnose chez les clones sensibles de D. alata. Le mécanisme de l'action de Colletotrichum gloeosporioides sur l'igname n'a pas été étudié à notre connaissance, mais on a isolé, chez Colletotrichum lagenarium (responsable de l'antracnose des Cucurbitacees), des substances toxiques à haut poids moléculaire (AURIOL, communication personnelle).

On pourrait également chercher à restaurer l'aptitude à la floraison.

Des cycles successifs de callogenèse et régénération entraînent un rajeunissement de la plante et parfois une régression vers des mécanismes ancestraux ou sauvages. On peut donc espérer atteindre un seuil où réapparaîtrait la fertilité qui est un caractère sauvage plus ou moins perdu par les ignames cultivées (DE FARLY, communication personnelle).

D'autre part, la vigueur semble le caractère déterminant dans la capacité de floraison d'un clone (DEGRAS, 1982, 1984 ; AKORODA, 1983a ; AKORODA et al., 1984 ; SADIK et WILSON, communications personnelles). Seules les plantes les plus vigoureuses peuvent atteindre le stade de floraison avant la fin du cycle végétatif (les ignames cultivées sont des plantes annuelles). L'obtention de variants présentant une vigueur accrue pourrait permettre de résoudre le problème de l'absence de floraison de certains clones.

Enfin, il serait peut-être possible de trouver dans le criblage des variations somaclonales, des plantes présentant :

- des tubercules plus uniformes et moins fragiles ;
- une masse végétale réduite et plus efficace : certaines espèces de Dioscorea sauvages sont naines : par exemple D. elephantipes qui a un gros tubercule et des parties aériennes réduites (BURKILL, 1960) , D. pyreneica etc... un caractère génétique de réduction des entrenœuds existe probablement dans le genre Dioscorea ;
- un port non lianescent. L'espèce malgache D. hexagona qui est naine présente certaines formes à port dressé (BURKILL, 1960). Ce caractère existe donc dans le genre Dioscorea bien qu'il soit extrêmement rare.

On pourrait également faire appel à la mutagenèse pour augmenter les possibilités d'induction de variations. Le traitement pourrait s'appliquer sur les vitroplants où sont prélevés les explants initiaux ou sur les cals. La mutagenèse présente l'avantage, chez les plantes multipliées végétativement, de ne changer que quelques caractères sans bouleverser tout le phénotype (BROERTJES, 1972). Il est possible de détecter certaines des mutations dans le matériel irradié lui-même et de faire une sélection rapide parmi ces mutants (BROERTJES, 1969). Des expériences de mutagenèse sur suspension cellulaire ont été entreprises chez D. deltoidea (KARANOVA et SHAMINA, 1978 ; KARANOVA et al., 1979). Des souches cellulaires mutantes ont été obtenues mais les auteurs ne semblent pas s'être intéressés à la régénération de plantes à partir des cellules mutées.

4.3.3 - La culture de protoplastes

4.3.3.1 - Résultats et perspectives chez diverses espèces

La culture de protoplastes et la régénération de tiges à partir des cals obtenus sont assez bien maîtrisées chez un certain nombre d'espèces principalement parmi les Dicotylédones (BINDING et al., 1982 ; BHOJWANI et RAZDAN, 1983), par exemple : la pomme de terre (SHEPARD et TOTTEN, 1977 ; BINDING et al., 1978 ; BOKELMANN et ROEST, 1983) ; la tomate (MORGAN et COCKING, 1982), le tabac (TAKEBE et al., 1971 ; BELIARD et PELLETIER, 1978b) ; le colza THOMAS et al., 1982)...

La culture de protoplastes offre de larges possibilités de création de variabilité génétique :

- la fusion permet d'obtenir des hybrides somatiques sans passer par la reproduction sexuée. Des hybrides inter et intraspécifiques ont déjà été obtenus dans les genres Nicotiana, Solanum, Petunia, Datura, Daucus, Brassica... (WIDHOLM, 1982 ; HARMS, 1983 ; SHEPARD et al., 1983).

- la régénération de plantes à partir de protoplastes sans passer par la fusion est une autre source de variations somaclonales. De telles variations ont été observées par exemple chez la pomme de terre (SECOR et SHEPARD, 1981 ; SHEPARD, 1982) ; le tabac, la laitue (LARKIN et al., 1983), la luzerne (JOHNSON et al., 1984) etc...

- le protoplaste est un matériel privilégié pour diverses formes de manipulations génétiques :

. pour un traitement mutagène : en partant du protoplaste, on est assuré de ne pas avoir de chimères parmi les mutants induits.

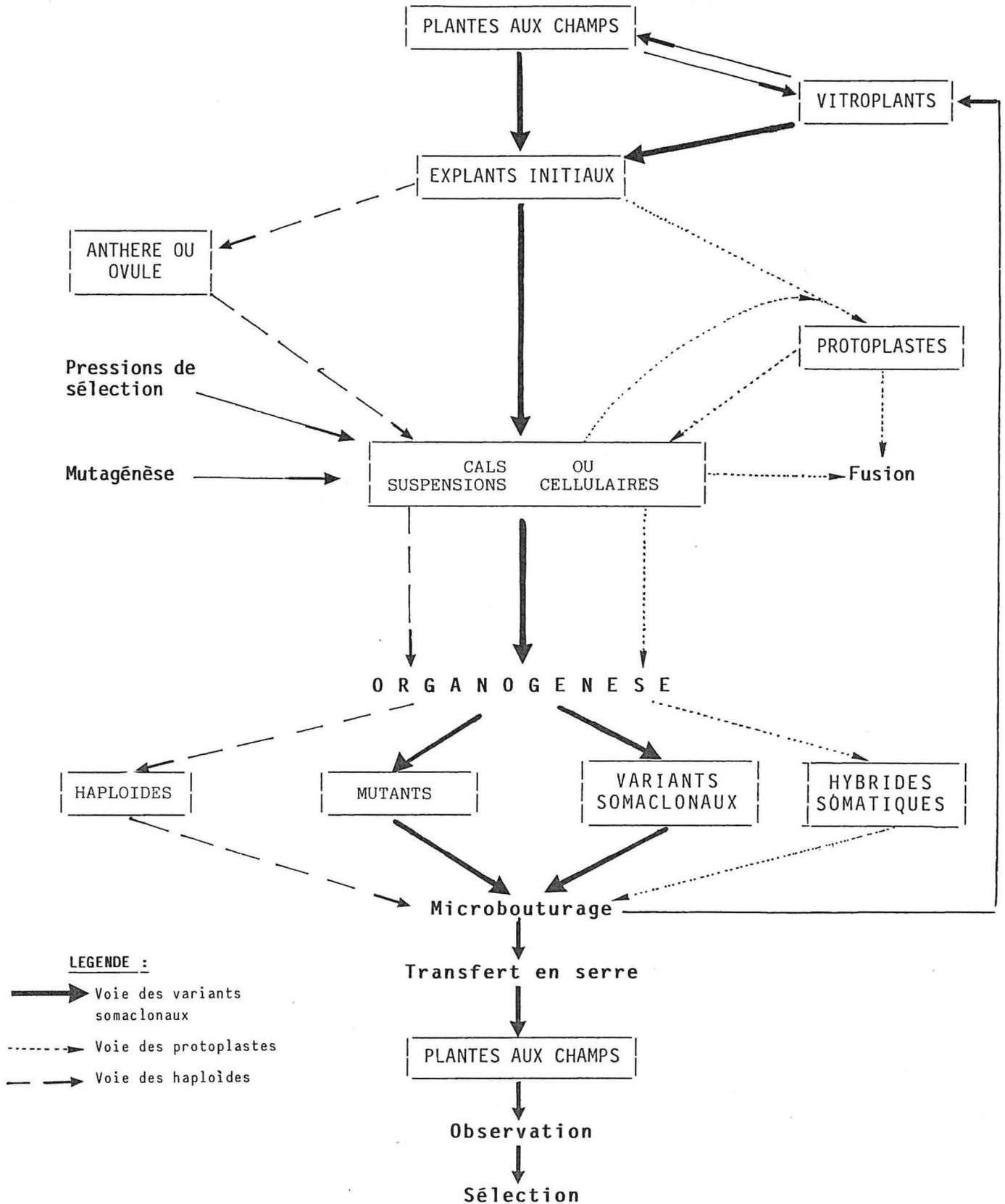
. pour l'introduction d'ADN étranger dans le génome : on peut soit fusionner un protoplaste de plante avec un sphéroplaste de bactérie introduisant ainsi un gène isolé et cloné dans le protoplaste (COCKING, 1983 ; HAIN et al., 1984) ; soit introduire directement des fragments d'ADN à l'aide d'une microseringue dans le protoplaste (LAWRENCE et DAVIES, 1985).

4.3.3.2 - Application de cette méthode à l'igname

Des protoplastes ont été isolés sur D. alata, D. trifida et D. cayenensis. Les publications ne font état que de quelques divisions après l'obtention des protoplastes qui étaient issus de feuilles (BELL, 1982 ; MABANZA, 1984) de tubercules (ONYA et al., 1984) ou de cotylédons (MOMONT, 1984).

Actuellement, les conditions de la culture in vitro des protoplastes d'igname n'ont pas encore été définies. Il faudra ensuite régénérer les tiges à partir des colonies tissulaires. Cette dernière étape semble très difficile à réussir chez de nombreuses espèces en particulier parmi les Monocotylédones (GUIDERDONI, 1984). La maîtrise de la callogenèse et de l'organogenèse à partir de différents organes d'ignames pourrait être un préalable à la régénération de protoplastes. En effet, un des facteurs déterminant dans l'évolution des protoplastes semble être le choix de l'explant initial ; certaines cellules seraient plus "compétentes" que d'autres c'est-à-dire plus aptes à se diviser elles-mêmes et à donner des protoplastes susceptibles de se multiplier de façon soutenue (POTRYKUS, 1979). Les explants qui produisent des cals à fort pouvoir de régénération, ainsi que ces cals, pourraient être un matériel de départ favorable à l'obtention de protoplastes présentant des aptitudes à la régénération de plantes (DALE, 1981 ; VASIL et VASIL, 1980).

FIGURE 1 : LES VITROMETHODES DANS LA CREATION DE VARIABILITE GENETIQUE



Après avoir obtenu la maîtrise de la culture et de la régénération de protoplastes, il restera à résoudre le problème techniquement complexe de la fusion de protoplastes de clones ou d'espèces différentes : séparation des hybrides et des protoplastes parentaux non fusionnés (BELLIARD et PELLETIER, 1978a) et régénération des protoplastes hybrides.

La fusion de protoplastes chez l'igname ouvrirait des perspectives nouvelles : elle permettrait de croiser entre eux tous les cultivars stériles et d'hybrider deux clones mâles ou deux clones femelles ; ceci augmenterait considérablement les potentialités d'hybridation qui resteraient limitées par la dioecie même si on réussissait à restaurer la fertilité chez les ignames.

5 - CONCLUSION

L'étude de la callogénèse et de l'organogénèse dans le genre Dioscorea, que nous nous proposons de traiter, devrait donc permettre d'élargir les possibilités d'investigation et d'action dans le cadre de l'amélioration génétique des ignames :

- soit directement comme technique d'induction de variations somaclonales,

- soit indirectement par les applications qu'elle pourrait offrir, notamment comme matériel de base pour l'obtention de protoplastes aptes à régénérer des plantes. La figure 1 montre l'importance de la maîtrise des étapes callogénèse et organogénèse dans toutes les vitrométhodes qui ont pour but la création de variabilité.

CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

TABLEAU 4 : QUELQUES CARACTERISTIQUES DES CULTIVARS UTILISES DANS CETTE ETUDE

| ESPECES | CULTIVARS | PIGMENTATIONS | SEXES | RESISTANCES AUX MALADIES | | RENDEMENTS | QUALITES ORGANOLEPTIQUES |
|------------|--------------|------------------------|---------------|--------------------------|-----------------|------------|--------------------------|
| | | | | Anthracnose | Viroses | | |
| D. alata | Brazo Fuerte | légèrement anthocyanée | Clone mâle | résistant | résistant | bon | moyennes |
| | Florido | non anthocyanée | clone mâle | sensible | résistant | moyen | bonnes |
| D. trifida | Moengo V | fortement anthocyanée | clone femelle | résistant | sensible | moyen | bonnes |
| | INRA 5-20 | non anthocyanée | clone mâle | résistant | très sensible | moyen | bonnes |

1 - LE MATERIEL VEGETAL

Deux espèces d'ignames ont été étudiées : Dioscorea trifida provenant de la station INRA de Guadeloupe et D. alata dont les tubercules ont été fournis par la station IDESSA IRAT de Bouaké en Côte d'Ivoire. Les deux cultivars de D. alata retenus ont été sélectionnés à la station de Mayaguez à Porto Rico puis introduit en Afrique.

Les caractéristiques des 4 variétés employées sont mentionnées dans le tableau 4. Elles ont été trouvées dans les travaux de VANDEVINNE (1972 ; 1973 a, 1974) ; MARTIN et al., (1975) ; RODRIGUEZ (1975, 1977, 1979, 1983) et DEGRAS (1980). Les tubercules des différents clones ont été plantés au mois de mars dans une serre chaude (où la température reste supérieure à 20° C) au CIRAD de Montpellier. Afin de limiter le développement de maladies cryptogamiques sur les lianes en cours de croissance, les plantes ont été traitées une fois par semaine avec un fongicide (Benlate ou Bayleton). Des noeuds prélevés sur ces lianes, ont été désinfectés et mis en culture in vitro. Ainsi constituée, cette collection in vitro a servi de matériel de départ pour l'ensemble de nos expériences. Nous avons également utilisé des graines de D. trifida issues d'un croisement frère-soeur entre deux hybrides provenant du croisement INRA 25 (femelle) par INRA 5-20 (mâle).

Les 4 cultivars utilisés dans cette étude ont été choisis au hasard et non pour leur aptitude à la culture in vitro. Les cultivars Brazo Fuerte et Moengo V se trouvaient déjà en collection dans le laboratoire. Le cv Florido a été également étudié parce qu'il donne de très bonnes performances en Côte d'Ivoire et que sa culture est en extension en Afrique. Le cv INRA 5-20 provient d'une descendance de croisement entre 2 variétés locales ; il a été retenu car il a de bonnes aptitudes potentielles malgré sa très grande sensibilité aux virus.

2 - LES MILIEUX DE CULTURE

Le milieu nutritif de base est composé d'éléments minéraux, de vitamines et de saccharose en solution dans de l'eau désionisée sur des filtres de résines échangeuses d'ions. Il est solidifié par de la gélose. Certains milieux contiennent en outre des substances de croissance et divers composés organiques.

2.1. - Les éléments minéraux

On distingue deux groupes d'éléments minéraux selon leur concentration dans le milieu :

TABLEAU 5 : COMPOSITION DES SOLUTIONS MINERALES DE MACROELEMENTS

| Solutions salines | N 30 K (MARGARA, 1978) | | (MURASHIGE et SKOOG(1962) | | Milieu proposé par SINGH (1978) | |
|--|------------------------|-----|---------------------------|-------|---------------------------------|------|
| | mg/l | mM | mg/l | mM | mg/l | mM |
| Nitrate de calcium $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 590 | 2,5 | - | - | - | - |
| Nitrate de potassium KNO_3 | 1313 | 13 | 1900 | 18,80 | - | - |
| Nitrate d'ammonium NH_4NO_3 | 480 | 6 | 1650 | 20,60 | 1429 | 18 |
| Sulfate de magnesium $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 246 | 1 | 370 | 1,50 | 370 | 1,50 |
| Phosphate monopotassique KH_2PO_4 | 136 | 1 | 170 | 1,25 | 170 | 1,25 |
| Chlorure de calcium $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | - | - | 440 | 3,00 | 440 | 3,00 |
| Chlorure de potassium KCl | 74,5 | 1 | - | - | - | - |

TABLEAU 6 : COMPOSITION DES SOLUTIONS MINERALES DE MICROELEMENTS

| MICROELEMENTS | MURASHIGE ET SKOOG (1962) | | RT KAUL ET STABA (1968) | |
|---|------------------------------|-------|-------------------------------|-------|
| | mM | mg/l | mM | mg/l |
| Acide borique H_3BO_3 | 100 | 6,2 | 100 | 6,2 |
| Sulfate de manganèse $Mn SO_4, 4 H_2O$ | 100 | 22,3 | 76,8 | 16,9 |
| Sulfate de zinc $Zn SO_4, 7 H_2O$ | 30 | 8,6 | 37,8 | 10,6 |
| Iodure de potassium KI | 5,0 | 0,83 | 5,0 | 0,85 |
| Molybdate de sodium $Na, Mo O_4, 2H_2O$ | 1,0 | 0,25 | 1,0 | 0,25 |
| Sulfate de cuivre $Cu SO_4, 5 H_2O$ | 0,1 | 0,025 | 0,1 | 0,025 |
| Chlorure de cobalt $Co Cl_2, 6 H_2O$ | 0,1 | 0,025 | 0,1 | 0,025 |
| Acide éthyléné Na_2 - EDTA | 0,2 (Na) | 37,3 | 0,2 (Na) | 37,3 |
| Diamine tétracétique Sulfate de fer $Fe SO_4, 7 H_2O$ | 0,1 (Fe) | 27,8 | 0,1 (Fe) | 27,8 |

TABLEAU 7 : COMPOSITION DE LA SOLUTION VITAMINEE DE MOREL (1948)

| Vitamines | mg/l | mM |
|--------------------------|-------|-------|
| Panthoténate de calcium | 1,0 | 2,1 |
| Myo inositol | 100,0 | 550,0 |
| Acide nicotinique | 1,0 | 8,0 |
| Thiamine dichlorure | 1,0 | 3,0 |
| Chlorydrate de Pyridoxol | 1,0 | 5,0 |
| Biotine | 0,01 | 0,04 |

TABLEAU 8 : LES PRINCIPAUX MILIEUX EMPLOYES DANS CETTE ETUDE

| | MILIEU DE MICROBOUTURAGE | MILIEU DE CALLOGENESE | MILIEU D'ENTRETIEN | MILIEU DE BASE | MILIEUX DE REGENERATION | | |
|------------------|--------------------------------------|-----------------------|--------------------|-------------------|-------------------------|-------------------|--|
| | M50 | MC | ME | MB | MR | S30 | |
| MACROELEMENTS | MURASHIGE ET SKOOG, 1962 | | | | | SINGH, 1978 | |
| MICROELEMENTS | MURASHIGE ET SKOOG, 1962 | | | | | | |
| Fer EDTA | MURASHIGE ET SKOOG, 1962 | | | | | | |
| VITAMINES | MOREL, 1948 | | | | | | |
| SACCHAROSE mg/l | (saccharose ou sucre du commerce) 50 | 30 | 30 | - | 30 | 30 | |
| AGAR g/l | Labosi : 6,0 | Difco Bacto : 6,5 | Difco Bacto : 6,5 | Difco Bacto : 6,5 | Difco Bacto : 6,5 | Difco Bacto : 6,5 | |
| AUXINES mg/l | - | 2,4 - D : 5,0 | 2,4-D : 2,0 | - | AIB : 0,5 | AIB : 0,5 | |
| CYTOKININES mg/l | - | Kin : 1,0 | Kin : 0,5 | - | BAP : 2,0 | BAP : 2,0 | |

2.1.1. - Les macroéléments dont la teneur est supérieure à une millimole.

Nous avons utilisé la solution des macroéléments de MURASHIGE et SKOOG (1962) mise au point pour la culture de cals de moelle de tabac. Dans certaines expériences, nous utilisons des modifications de ce milieu en particulier, celle proposée par SINGH (1978) que nous avons employé dans notre milieu S30. Les autres modifications seront précisées dans le texte par la suite. Nous avons également utilisé le milieu N30K de MARGARA (1978). La composition de ces différents milieux est donnée dans le tableau 5.

2.1.2. - Les microéléments dont la teneur est inférieure à une millimole

Nous avons utilisé les microéléments de MURASHIGE et SKOOG (1962). Le milieu RT de KAUL et STABA (1963) est souvent cité dans la littérature sur les Dioscoréacées (cf tableau 2). Ce milieu contient la solution des macroéléments de MURASHIGE et SKOOG et une solution de microéléments très peu différente de celle de MURASHIGE et SKOOG (cf tableau 6).

Le fer est apporté sous forme d'un chélate afin d'en assurer une meilleure assimilation. Le chélate est une combinaison du sel disodique de l'acide éthylène diamine tétracétique Na₂ - EDTA à la concentration de 37,3 mg/l avec le sulfate ferrique, Fe SO₄, 7 H₂O à la concentration de 27,8 g/l.

2.2. - Les composés organiques

Nous avons utilisé la solution des vitamines de MOREL (1948) dont la composition est donnée dans le tableau 7. Certains milieux contiennent en outre de la glutamine ou de l'adénine.

La source de carbone employée est le saccharose (et souvent le sucre de canne blanc du commerce pour l'entretien des vitroplants).

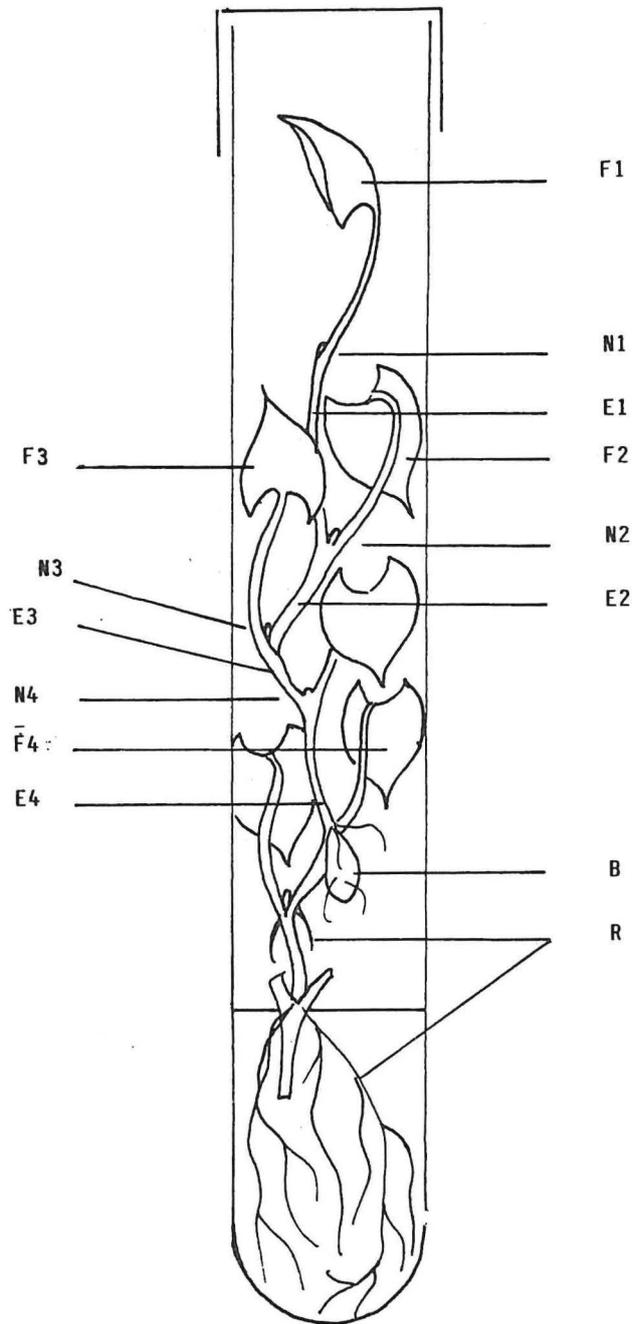
La liste des substances de croissances, auxines et cytokinines qui ont été testées dans nos expériences figure dans la table des abréviations.

Les milieux sont solidifiés par de l'agar Difco-Bacto (6,5 g/l) pour les expériences de callogenèse et d'organogenèse et de l'agar Labosi (6 g/l) pour l'entretien des vitroplants.

2.3. - Remarque

Les milieux les plus fréquemment employés figurent dans le tableau 8. Les autres seront mentionnés dans le texte. Le pH de ces milieux est ajusté à 5,6 avec HCl, KOH ou Na OH avant l'adjonction d'agar. Les milieux sont ensuite autoclavés 20 minutes à 110° C.

FIGURE 2 : DIVERS TYPES D'EXPLANTS PRELEVES



Légende :

- F1 : feuille terminale
- F2 : feuille subterminale
- F3, F4 : feuilles de rang 3 et 4
- N1 : noeud terminal
- N2 : noeud subterminal
- N3, N4 : noeuds de rang 3 et 4
- E1 : entrenoeud terminal
- E2, E3, E4 : entrenoeuds de rang 2
3 et 4
- B : bulbille
- R : racines adventives

3 - TECHNIQUES ET CONDITIONS DE CULTURE

3.1. - Désinfection et multiplication du matériel végétal

Les tiges, prélevées sur des plantes en serre sont débarrassées de leurs feuilles et fractionnées en boutures de 3 cm environ. Les boutures comportent un fragment de tige avec un ou deux bourgeons axillaires. Les explants sont d'abord soumis à un lavage à l'eau additionnée de quelques gouttes d'un agent mouillant (teepol) puis rincées 3 fois à l'eau. Ils sont ensuite immergés dans l'alcool à 70° durant 3 minutes, puis dans une solution contenant 8 % d'hypochlorite de calcium de 200 à 220 degrés chlorométriques et 70 % de chlore actif durant 20 minutes. Après 3 rinçages à l'eau stérile, ils sont mis en culture sur le milieu MS50. (cf tableau 8). On obtient ainsi environ 90 % de boutures exemptes d'infections. La mise en culture des explants et les repiquages successifs s'effectuent en conditions aseptiques sous une hotte à flux laminaire.

Nous avons également désinfecté des tubercules et des graines au cours de notre travail. Le processus de désinfection est le même mais le passage dans l'hypochlorite doit être prolongé (30 minutes et non 20).

Il est préférable de débarrasser la graine de l'aile membraneuse qui l'entoure avant la désinfection. Les graines désinfectées sont ensuite mises en germination en tube sur un pont de papier filtre trempant dans une solution composée des macro et des microéléments de MURASHIGE et SKOOG diluée de moitié et de Fer - EDTA à la concentration de 0,1 mM de fer.

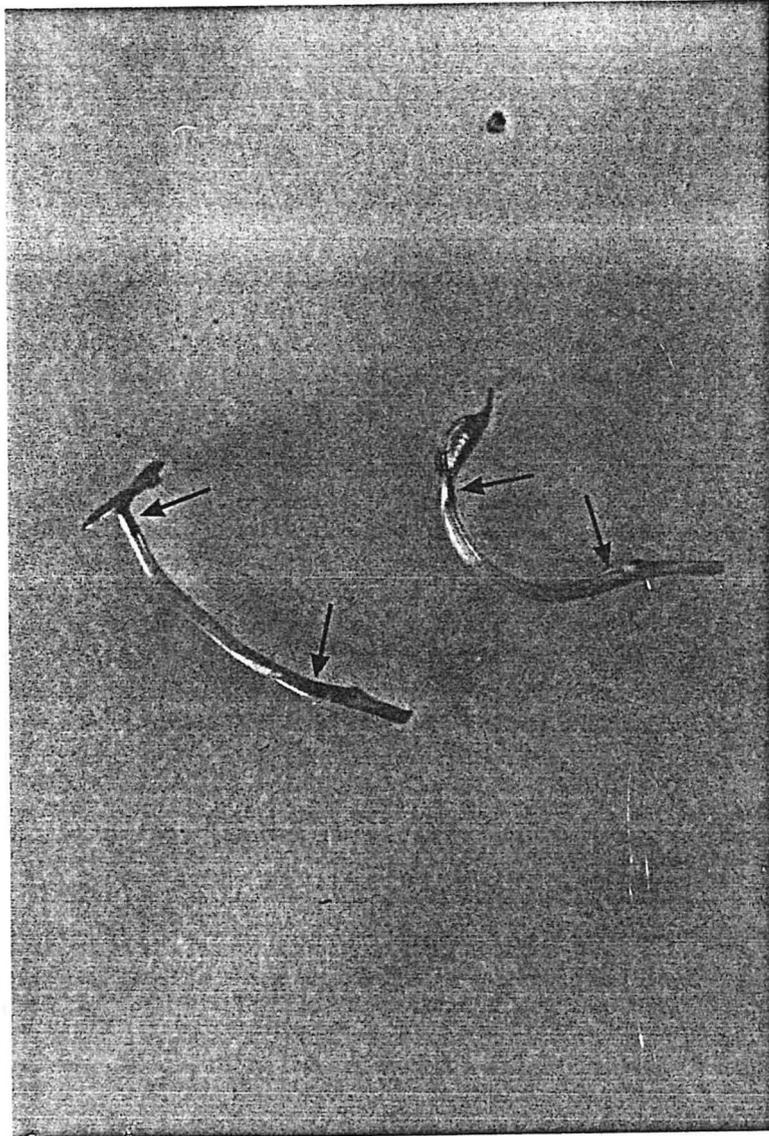
3.2. - Callogenèse et culture de cal

Tous les organes disponibles à partir d'un vitroplant ont été étudiés (cf figure 2). La feuille terminale a été appelée F1 et tous les explants prélevés au niveau terminal portent le numéro 1. Les explants subterminaux portent le numéro 2 et les explants de la base portent des numéros variables en fonction du nombre de noeuds existant sur le vitroplant.

Les explants que nous avons le plus utilisés pour notre étude sont les fragments de feuilles terminales contenant un pulvinus (cf photo 1).

Les explants sont placés horizontalement (sauf indication contraire) sur un milieu de callogenèse. Après 30 jours pour Dioscorea alata et 50 jours pour D. trifida, les cals formés sont repiqués avec ce qui reste de l'explant initial sur un milieu d'entretien ou d'organogenèse. Nous avons suivi plusieurs stratégies au cours de nos expériences (cf figure 4).

PHOTO 1 : feuille de D. alata cv Brazo Fuerte in vitro



Les feuilles sont entières avec un limbe cordé (D. alata) ou lobé (D. trifida) et un long pétiole. Le pétiole présente un pulvinus à chaque extrémité. Les pulvini sont des renflements moteurs qui permettent à la feuille de s'orienter. Les mouvements s'effectuent par des expansions ou des contractions localisées de la région corticale, dus à des changements de turgescence des cellules (STEWART, 1969)

VITROPLANT

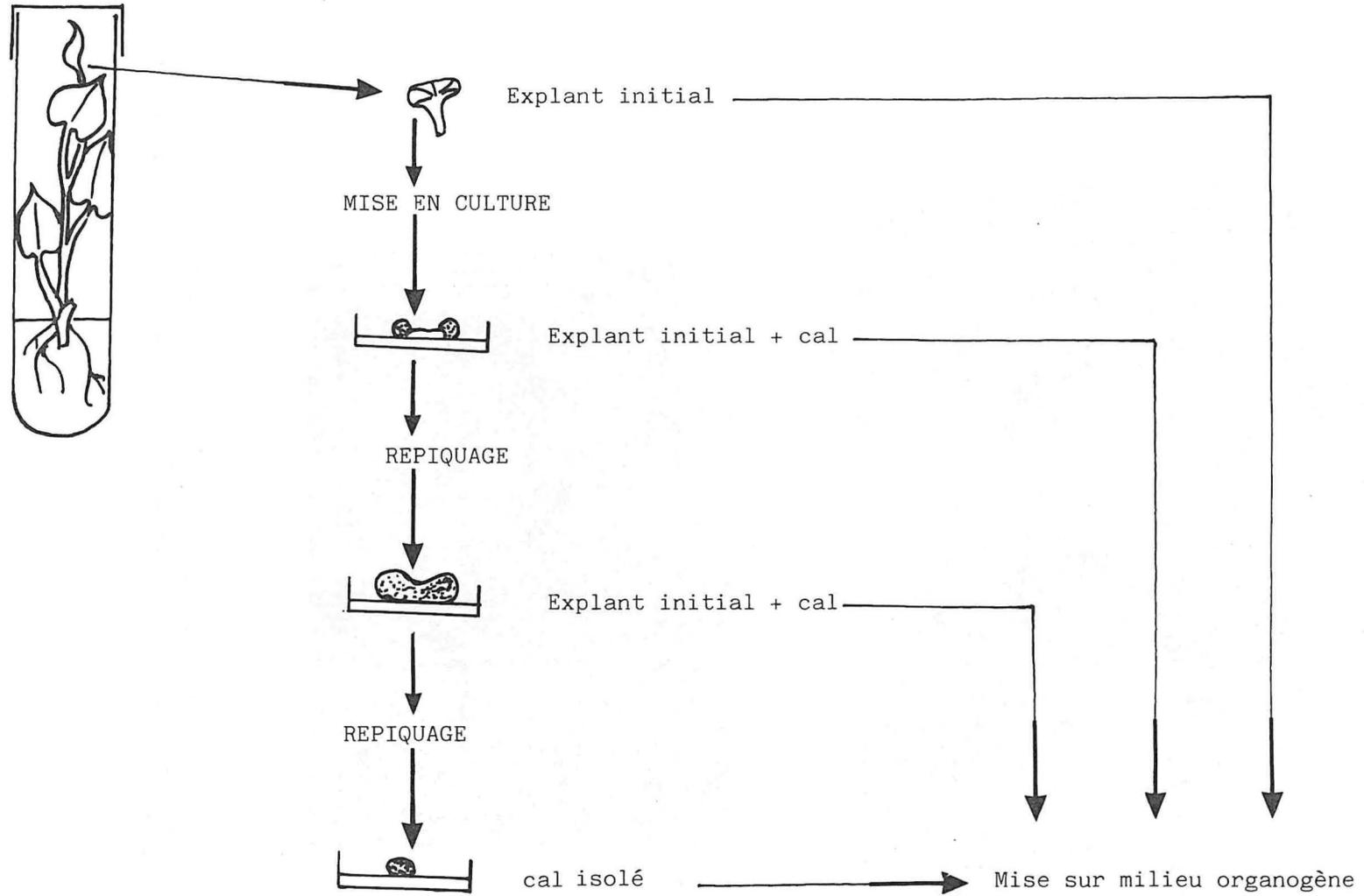


FIGURE 4 : DIFFERENTES STRATEGIES UTILISEES DANS CETTE ETUDE

PHOTO 3 : Les 4 classes de cals chez D. alata

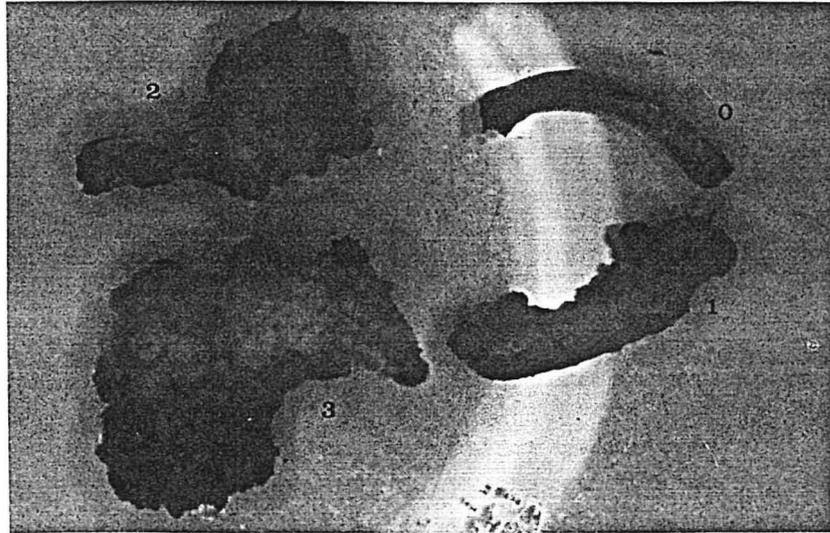


PHOTO 4 : cal blanc de classe 1



Des explants P1 de D. alata cv Brazo Fuerte ont été placés sur le milieu de callogenèse M.C. Après 28 jours on observe l'intensité de la callogenèse.

3.3. - Les conditions de culture

3.3.1. - Réipients

La callogenèse et l'organogenèse sont réalisées dans des petites boîtes de Pétri en polystyrène cristal de 55 mm de diamètre, scellées par du film plastique adhésif Scel-o-frais.

Les vitroplants qui fournissent le matériel de base pour les expériences sont cultivés dans des tubes en pyrex de 25 mm de diamètre et 195 mm de hauteur contenant 20 ml de milieu M 50, recouverts d'un capuchon de polycarbonate et scellés avec du Scel-o-frais.

3.3.2. - Eclairage

L'initiation et la croissance des cals se font à l'obscurité. L'organogenèse est réalisée à la lumière pour éviter l'étiollement des pousses néoformées. La lumière est fournie par des tubes néons GRO LUX ES 36 W de marque Sylvania. La photopériode est de 12 heures et l'intensité lumineuse d'environ $20 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

3.3.3. - Température

La callogenèse et l'organogenèse ont lieu dans une salle de culture dont la température est de $27^\circ \text{C} + 2^\circ \text{C}$. Les vitroplants en collection sont placés à une température légèrement plus basse $25^\circ + 2^\circ \text{C}$.

4 - NOTATIONS ET MESURES

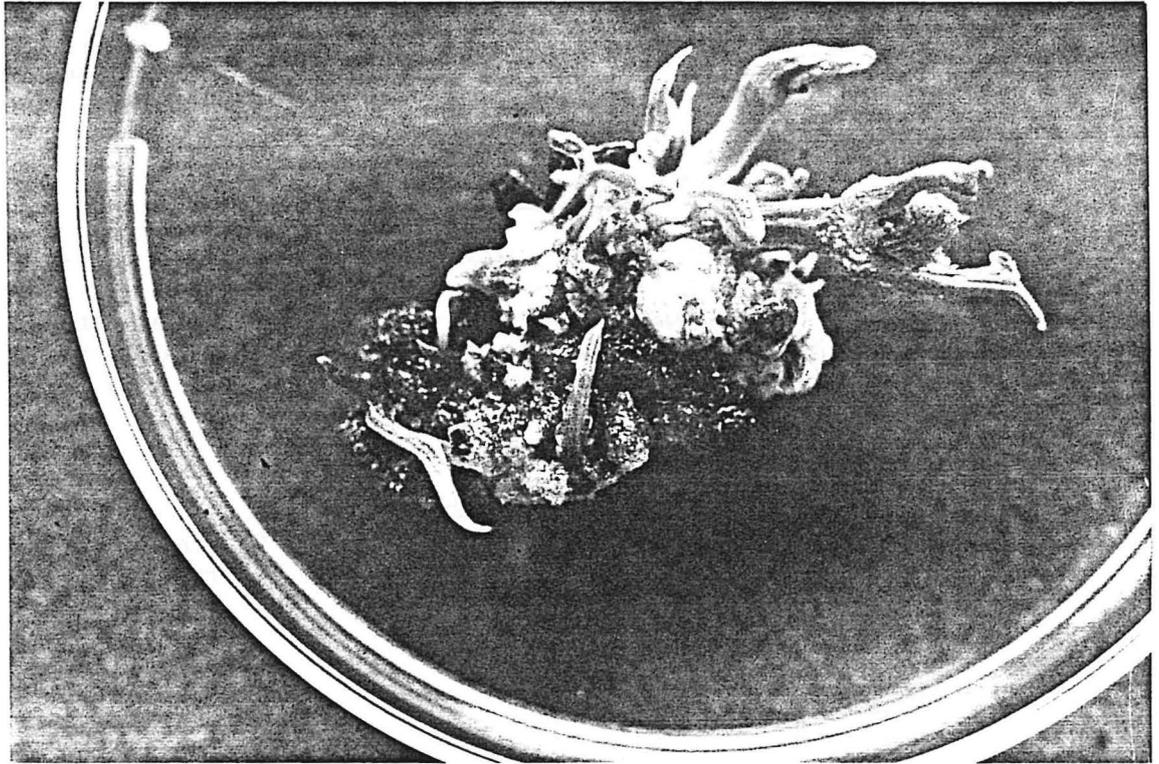
4.1. - L'initiation des cals

L'intensité d'initiation des cals est mesurée par le pourcentage d'explants ayant initié au moins un cal visible en fin de culture.

L'évaluation de la callogenèse se fait après 30 jours chez D. alata et 50 jours chez D. trifida. Nous avons procédé à une notation en 4 classes :

- 0 : absence de réponse
- 1 : phénomène de très faible intensité. Par exemple des cals blancs d'environ 1 mm d'épaisseur et constitués de quelques cellules se forment sur les blessures de certains explants. Ces cals ne grossissent pas même après plusieurs mois sur le même milieu (cf photos 3 et 4).
- 2 : callogenèse moyenne.
- 3 : callogenèse intense.

PHOTO 5 : Régénération de plusieurs tiges à partir d'un cal de D. alata cv Florido.



Des cals issus de fragments de feuilles ont été placés sur le milieu d'organogenèse MS + ANA 1 mg/l. Après deux mois, plusieurs néoformations apparaissent sur ces cals.

Le pourcentage de callogenèse que nous mesurons dans nos expériences correspond aux cals des classes 2 et 3.

Nous avons fait une expérience de mesure du poids frais des cals de D. alata cv Brazo Fuerte pour relier ces 4 classes établies subjectivement à un critère mesurable.

Des fragments de feuille P2 ont été gardés 2 mois sur le milieu MB + sac 30 g/l + 2,4-D 3mg/l + Kin 0,5 mg/l. Les classes ont été établies après 30 jours de callogenèse et 25 explants de chaque classe ont été suivis. Les résultats du tableau 9 montrent que les poids des cals des classes 0 et 1 augmentent très peu (2 à 4 fois en 2 mois), tandis que ceux des classes 2 et 3 augmentent considérablement (20 à 80 fois en 2 mois).

4.2. - L'entretien des cals

L'augmentation relative de matière fraîche est calculée par le rapport :

$$\frac{\Delta P}{P} = \frac{\text{Poids final} - \text{poids initial}}{\text{poids initial}}$$

4.3. - L'organogenèse

Le pourcentage de néoformations qui est évalué dans nos expériences correspond au nombre de cals ayant donné au moins une tige ou une racine. Les tiges néoformées sont ensuite coupées et transplantées en tube sur le milieu de microbouturage M50 où elles se développent et s'enracinent. Les cals qui ont commencé à former une tige continuent à en produire d'autres qui sortent à divers endroits dans la masse du cal (cf photo 5). Si on enlève ces tiges au fur et à mesure qu'elles se forment, le cal continue à en produire de nouvelles pendant plusieurs mois.

5 - TECHNIQUES CYTOLOGIQUES

Pour la fixation, les cals et les fragments de feuille sont mis à tremper dans le Navashine pendant 24 heures au moins. La déshydratation est effectuée par trempage dans des bains successifs d'alcool. Les coupes sériées de 10mm d'épaisseur sont réalisées au microtome. Elles sont ensuite colorées à l'hématoxyline de Régaud après mordantage à l'alun de fer (cf annexe 1).

TABLEAU 9 : EVOLUTION DU POIDS FRAIS DE L'ENSEMBLE cal + explant initial EN FONCTION
DES DIFFERENTES CLASSES DE cals

Les explants initiaux sont des pétioles P1 de D. alata cv Brazo Fuerte

| Classes | Poids moyen en mg (σ_{n-1}) | Poids moyen de l'explant initial (1,6) | Poids moyen de l'ensemble cal + explant après 1 mois (2,8) | Poids moyen de l'ensemble cal + explant après 2 mois (3,0) | Augmentation de Poids après 2 mois : Poids initial/poids final |
|----------|---|--|---|---|--|
| Classe 0 | (σ_{n-1}) | 7,8 | 14,2 | 15,1 | x 2,2 |
| Classe 1 | (σ_{n-1}) | 7,4 | 25,6 | 32,7 | x 4,4 |
| Classe 2 | (σ_{n-1}) | 7,9 | 73,9 | 150,8 | x 19,1 |
| Classe 3 | (σ_{n-1}) | 7,2 | 168,9 | 547,0 | x 76,0 |

Leur poids de matière fraîche a été mesuré après un passage de 30 et 60 jours sur le milieu MB + sac 30 g/l + 2,4-D 3mg/l + kin 0,5 mg/l. Les chiffres figurant dans le tableau correspondent à la moyenne de 25 explants par classe.

6 - METHODES DE TRAITEMENT DES DONNEES

Pour optimiser une réponse dépendant de un ou plusieurs facteurs, deux méthodes peuvent être employées :

- si l'on ne sait rien a priori sur le type de relation liant la réponse aux variables explicatives dans un domaine expérimental donné, on peut tester point par point ce domaine ;

- si l'on suppose que la relation liant la réponse aux variables explicatives peut être représentée par un modèle mathématique, on peut utiliser des plans expérimentaux.

6.1. - Dispositifs expérimentaux planifiés

Dans notre travail nous avons utilisé la méthodologie de BOX et WILSON (1951) qui comprend deux étapes :

- un plan factoriel à 2 niveaux
- un plan centré composé.

Cette méthode a été utilisée avec succès pour l'amélioration de milieux assurant la croissance de microorganismes (SANGLIER, 1977) de vitroplants de canne à sucre (SAUVAIRE, 1980) et également la callogenèse, l'entretien des cals et l'organogenèse chez la canne à sucre (SAUVAIRE et GALZY, 1980) et la féverole (BELOT, 1983).

Bien qu'il soit théoriquement possible d'étudier un grand nombre de facteurs simultanément, les utilisations courantes des plans centrés composés se limitent à 3 facteurs.

6.1.1. - Les plans factoriels à deux niveaux

Ces plans permettent de sélectionner les variables expérimentales influençant la réponse étudiée et d'obtenir les effets des différents facteurs et leurs interactions. Un tel plan est présenté aux tableaux 28 et 29 p. 80. Les variables sont étudiées à 2 niveaux codés (-1) et (+1) pour les variables qualitatives, avec en plus des témoins ou points centraux, codés (0) pour les variables quantitatives.

6.1.2. - Les plans centrés composés

Les K variables quantitatives les plus influentes sélectionnées à l'issue du plan factoriel à 2 niveaux sont expérimentées à 5 niveaux codés ($-\alpha$), (-1), (0), (1) et ($+\alpha$). Ce plan contient :

- un plan factoriel à 2 niveaux, codés (-1) et (+1),
- 2 K points axiaux codés ($-\alpha$) et ($+\alpha$),
- n points centraux, codés (0).

Les valeurs des niveaux codés et du nombre n de répétitions du point central sont choisies en fonction du nombre K des facteurs étudiés de façon à ce que le plan centré composé soit rotatif et le plus orthogonal possible.

Un plan centré composé est présenté aux tableaux 25, 26 et 27, page 74. Dans ce plan, on suppose a priori que le modèle mathématique de la relation liant la réponse aux variables explicatives est du type :

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i X_i + \sum_{i=1}^n b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n b_{ij} X_i X_j + \epsilon$$

b_0 représente la réponse moyenne, b_i l'effet principal de X_i , b_{ii} , un terme quadratique, b_{ij} l'interaction entre X_i et X_j et l'écart au modèle.

L'adéquation du modèle quadratique aux résultats expérimentaux est testée par un rapport F entre le carré moyen de l'inadéquation au modèle et le carré moyen de l'erreur expérimentale, au seuil $P = 5\%$ ou $P = 1\%$.

La représentation graphique du phénomène étudié est donnée sous forme de courbes d'isoreponses en coordonnées $X_i X_j$ (cf figure 12) ou en courbe d'influence individuelle d'un facteur, les autres facteurs étant fixés à un niveau constant : le point central ou l'optimum (cf figure 11 p. 76).

6.1.3. - Critique de cette méthode

Cette méthode permet d'étudier plusieurs facteurs à la fois en limitant le nombre des combinaisons à tester par rapport à un plan factoriel complet. Elle présente cependant des inconvénients :

- le modèle quadratique simple proposé n'est pas toujours acceptable pour représenter le phénomène étudié. Lors de notre étude sur l'optimisation des milieux de callogenèse de pétioles de D. trifida, le modèle quadratique s'est révélé inadéquat (cf page 81).

- le modèle calculé n'est valable que dans l'espace étudié. Si l'optimum se situe hors des limites du domaine expérimental, il n'est pas possible d'extrapoler les résultats obtenus.

- cette méthode ne donne pas d'intervalle de confiance autour de l'optimum. Elle ne permet pas de savoir si deux courbes d'isoreponses voisines sont significativement différentes ou pas.

6.2. - Test du domaine expérimental points par points

Nous avons utilisé cette méthode plus longue mais plus sûre, dans de nombreux cas. Nous avons alors employé des analyses de variance à deux facteurs (DAGNELLE, 1969, 1970), des tests de comparaison de fréquences (HELLER, 1968) et des tests X (SNEDECOR et COCHRAN, 1957) pour l'interprétation statistique de nos résultats.

Dans ces expériences nous avons réalisé (sauf indications contraires de notre part) deux répétitions de 25 explants par traitement et les résultats alors portés dans les tableaux ou sur les courbes correspondent à la moyenne des deux répétitions.

6.3. - Transformation de variables

Afin d'uniformiser les variances dans certains cas, nous avons procédé à la transformation :

$y = 100 \text{ Arcsin} \sqrt{x}$ où x est une proportion.

CHAPITRE 3 : CHOIX DE L'EXPLANT INITIAL

TABLEAU 10 : Régénérations obtenues sur diverses monocotylédones

| PLANTE | EXPLANT INITIAL | MILIEU DE CALLOGENESE | MILIEU D'ORGANOGENESE | REFERENCE |
|-------------------------|----------------------------|---|---|----------------------------------|
| Cocos nucifera | embryons | MS + sac 10 g/l + ANA (0,05 à 5 μ M) + 2,4-D (2 à 22 μ M) + BAP (0,4 à 4 μ M) | IDEM | GUPTA <u>et al.</u> , 1984 |
| | jeunes feuilles | X | X | PANNETIER et BUFFARD MOREL, 1982 |
| Elaeis guineensis | jeunes feuilles | X | X | AHEE <u>et al.</u> , 1981 |
| Musa sp ADB | apex de tige | MS + sac 20 g/l + 2,45-T 1 mg/l + BAP 1 mg/l | MS + sac 40 g/l + BAP 5 mg/l | CRONAUER et KRICKORIAN, 1983 |
| Allium sativum | apex de tige feuilles | SH Modifié + sac 58 g/l + 2,4-D 2 μ M + Kin 0,5 μ M | SH modifié + AIA 10 μ M + Kin 10 μ M | ABO et NIL, 1977 |
| Allium sepa | apex de plantule | BSD + Pi (0,5 - 1 mg/l) + BAP (0,25 - 2 mg/l) | BSD + Pi (0,025 à 0,05 mg/l) + IBA (0,35 à 1 mg/l) | PHILIPS et LUTEYN, 1983 |
| Echinocloa crusgali | inflorescences | MS + sac 30 g/l + 2,4-D 2 mg/l + BAP 0,5 mg/l | IDEM | WANG et YAN, 1984 |
| Asparagus | 1er entrenoeud du plantule | MS + sac 20 g/l + ANA 1 mg/l + BAP 0,1 mg/l | IDEM | HARADA et YAKUWA, 1983 |
| | | LS + sac 30 g/l + 2,4-D (10 ⁻⁷ à 10 ⁻⁵ M) + BAP (10 ⁻⁷ à 10 ⁻⁵ M) | X | HUNAULT, 1973a |
| | feuilles | X | MS + sac 20 g/l + ANA 5 10 ⁻⁶ + BAP 5 10 ⁻⁷ M | JULIEN, 1974 |
| | hypocotyle | LS + 2,4-D 1mg/l + Kin 0,3 mg/l | LS | WILMAR et HELLENDORRN, 1968 |
| Colocasia esculenta | apex de tige | SH Modifié + sac 20 g/l + ANA 10 μ M + Kin 9 μ M | SH Modifié + sac 20 g/l + ANA (0,5 - 5 μ M) + Kin 0,45 μ M | ABO EL NIL et ZETTLER, 1976 |
| Anthurium Scherzérianum | jeunes inflorescences | Nitch (1969) + 2,4-D 0,1 mg/l + BA 1 mg/l | IDEM | GEIER, 1982 |

La différenciation n'est pas totalement irréversible chez les végétaux : certaines cellules sont totipotentes, c'est-à-dire qu'elles sont capables de se différencier puis de reformer des plantes entières. Cependant, toutes les cellules d'une plante ne conservent pas leurs potentialités organogènes : la différenciation cellulaire s'accompagne souvent de changements cytologiques qui peuvent entraîner une perte plus ou moins complète de la totipotence cellulaire (STREET, 1973 ; BHOJWANI et RAZDAN, 1983).

Les caractéristiques de l'explant initial qui influencent ses capacités de callogenèse et d'organogénèse ultérieure sont d'après MURASHIGE, 1974 :

- la nature de l'organe dont il est issu,
- l'espèce et le génotype de la plante mère,
- l'âge et la position de l'organe sur la plante mère,
- la taille de l'explant,
- la préparation de la plante mère,
- et parfois la saison durant laquelle les explants sont prélevés.

Dans ce chapitre nous avons expérimenté l'aptitude à la callogenèse et l'organogénèse de différents organes chez les quatre cultivars dont nous disposons. Puis nous avons choisi un explant (un fragment de feuille) pour étudier l'influence de l'âge et de la position de l'organe sur la plante mère et l'influence de la taille et de la position de l'explant initial sur le milieu de callogenèse.

1 - INFLUENCE DE LA NATURE DE L'ORGANE SUR LA CALLOGENESE ET L'ORGANOGENESE

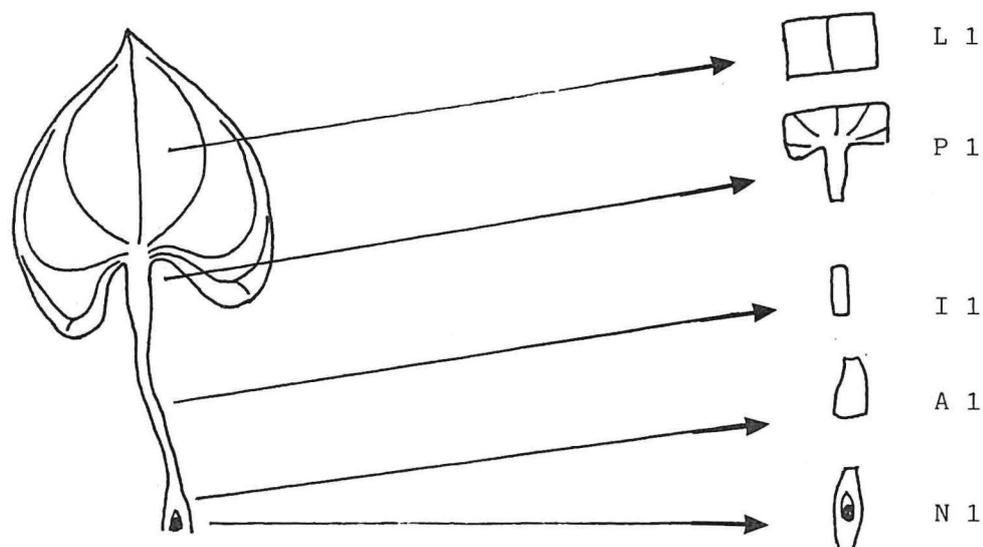
Tous les organes de la plante ne sont pas capables d'exprimer la totipotence cellulaire, en particulier chez les Monocotylédones. Les explants qui ont donné les meilleurs résultats chez celles-ci ont été prélevés sur certains organes jeunes (cf tableaux 10 et 11) :

- embryon et plantules issus de graines,
- jeunes inflorescences,
- jeunes feuilles immatures.

TABLEAU 11 : Quelques exemples de régénérations obtenues sur graminées

| PLANTE | EXPLANT INITIAL | MILIEU DE CALLOGENESE | MILIEU D'ORGANOGENESE | REFERENCE |
|-----------------|---|---|---|---------------------------------------|
| Oryza sativa | jeunes inflorescences | LS + sac 30 g/l + 2,4-D (1 à 2,5 mg/l) | LS + sac 30 g/l + AIA 0,5mg/l + BAP 1mg/l ou Kin 2 mg/l | TSUNG HIEN CIEN <u>et al.</u> , 1985. |
| | graines | MS + sac 20 g/l + 2,4-D 2 mg/l | MS + sac 70 g.l + ANA -2mM + Kin 50mM | SUENAGA <u>et al.</u> , 1982 |
| | jeunes feuilles de plantules | N6 + sac 20 g/l + 2,4-D (1 à 3 mg/l) | N6 + sac 20 g/l + 2,4-D 0,01 mg/l + Kin 0,2 mg/l | WERNICKLE <u>et al.</u> , 1981 |
| Triticum sp | embryons | MS + sac 20 g/l + 2,45T 5mg/l ou 2,4-D 5mg/l | MS + sac 20 g/l + AIA 0,1 mg/l + zeatine 1 mg/l) | EAPEN et RAO, 1982 |
| | embryons | MS + sac 20 g/l + 2,4-D 1 mg/l | MS + sac 20 g/l + 2,4-D 0,1 | SEARS et DECKARD, 1982 |
| Zea mays | embryons de graines immatures | MS + sac 20 g/l + 2,4-D 2 mg/l ou 2,45-T 2mg/l | MS + sac 20 g/l + 2,4-D 0,25 mg/l ou 2,45-T 0,25 mg/l | BECKER et POLLACSEK, 1979 |
| Pennisetum sp | embryons immatures jeunes inflorescences | MS + sac 30 g/l + 2,4-D 2,5 Mg/l | MS + sac 30 g/l | VASIL et VASIL, 1981 |
| | jeunes feuilles | MS + sac 30 à 60 g/l + 2,4-D 0,5 mg/l + NAA 1 mg/l + BAP 0,5 mg/l | IDEM | HAYDU et VASIL, 1981 |
| Panicum maximum | jeunes feuilles | MS + sac 30 g/l + 2,4-D (2,5 - 10 mg/l) | MS + sac 30 g/l + GA 1 mg/l | LU et VASIL, 1981 |
| Sorghum bicolor | Premiers noeuds des plantules | MS + sac 25 g/l + 2,4-D (1 à 5 mg/l) | MS + sac 25 g/l + ANA 5mg/l | MASIELLER et HOLDEN, 1970 |
| | embryons immatures | MS + 2,4 D X | MS + Ads 100 mg/l | DUNSTAN <u>et al.</u> , 1979 |
| Saccharum sp | jeunes feuilles | MS + sac 30 g/l 2,4-D (3 à 30 mg/l) | MS + sac 30 g/l + 2,4-D 0,3 mg/l ou ANA 3mg/l + Kin 0,3mg/l ou zeatine 0,3 mg/l | CHAGVARDIEFF <u>et al.</u> , 1981 |

FIGURE 3 : Différents fragments de la feuille terminale F1 utilisés comme explant initial pour la callogénèse



LEGENDE :

| Explants prélevés sur la feuille terminale | Symbole | Taille de l'explant en mm |
|--|---------|---------------------------|
| Limbe sans le départ des nervures | L1 | 8 x 5 |
| Départ des nervures + pulvinus distal | P1 | 8 |
| Partie du pétiole située entre les 2 pulvini | I1 | 8 |
| Pulvinus proximal | A1 | 5 |
| Apex | N1 | 10 |

N.B : les symboles L2, P2, I2, A2, N2 correspondent aux organes homologues sur la feuille subterminale F2.

1.1. - Expérience

Tous les organes disponibles à partir de vitroplants ont été expérimentés : explants foliaires (cf figure 3), entrenoeuds, noeuds, microbulbilles et racines. De plus, chez D. trifida, des hypocotyles de graines germinées in vitro ont été testés.

1.3. - Résultats

Les explants ont été placés sur le milieu de callogenèse MC puis transférés sur le milieu organogène S30. Les résultats (cf tableaux 12 à 15) montrent que si les réponses des cultivars Brazo Fuerte et Florido de D. alata sont comparables, elles diffèrent considérablement de celles de D. trifida.

Les cals varient selon l'explant et le cultivar. Les cultivars anthocyanés produisent sur le milieu MC des cals anthocyanés : roses pâles chez Brazo fuerte, roses violacés chez Moengo V. Les cultivars non anthocyanés produisent des cals blancs (cf photos 6 à 9).

Sur les limbes, les cals se développent au niveau des blessures et des nervures. Sur les explants P, ils se forment préférentiellement sur le départ des nervures et la blessure du pétiole et sur les pulvini proximaux à partir des blessures.

Les cals qui se développent sur les explants I sont très semblables à ceux des entrenoeuds. Le pourcentage de callogenèse à partir de ces explants est resté très faible chez toutes les variétés testées. Il est à noter que dans 20 à 40 % des cas, des cals très réduits formés de quelques cellules et qui n'évoluent pas se sont développés sur les blessures chez D. alata. Ces cals qui sont blancs même dans les variétés anthocyanées n'ont pas été pris en compte dans le pourcentage de callogenèse (classe 1).

Sur les racines, les cals se développent très lentement. Après 30 jours, ils ont l'aspect de petites boules translucides de 1 à 2 mm de diamètre, disposées en chapelet sur toute la longueur de la racine.

Les microbulbilles non épluchées forment 2 types de cals : un cal mou hyperhydrique à croissance rapide qui se développe de préférence à la périphérie de la rondelle et un cal plus dense à croissance lente sur la partie centrale. Le cal central est blanc même chez les cultivars anthocyanés contrairement aux cals hyperhydriques périphériques.

Tableau 12 : Aptitude à la callogenèse et à la néoformation de divers explants prélevés sur des vitroplants de Dioscorea alata cv Brazo Fuerte.

| explant | niveau de prélèvement sur le vitroplant | % de callogenèse sur milieu MC après 30 jours | % de cal ayant formé une tige sur le milieu S30 après 90 jours |
|--|---|---|--|
| limbe sans le départ des nervures | feuille terminale | L1 90 % DNS | 0 % |
| | feuille subterminale | L2 96 % | 0 % |
| départ des nervures et pulvinus distal | feuille terminale | P1 84 % DNS | 4 % |
| | feuille subterminale | P2 78 % | 4 % |
| fragment de pétiole entre les 2 pulvini | feuille terminale | I1 10 % | 0 % |
| | feuille subterminale | I2 2 % | 0 % |
| pulvinus proximal | feuille terminale | A1 94 % DNS | 4 % |
| | feuille subterminale | A2 92 % | 6 % |
| entrenoeud | terminal | E1 24 % DNS | 0 % |
| | subterminal | E2 14 % | 0 % |
| racines | | R 25 % | 0 % |
| microbulbilles entières | | BNE 86 % | 34 % |
| microbulbilles dont le cortex a été supprimé | | B 90 % | 16 % |
| noeuds | terminal | N1 86 % DNS | 50 % |
| | subterminal | N2 84 % | 46 % |

Les explants ont été placés sur le milieu MC pendant 30 jours puis transférés sur le milieu S30. Les chiffres du tableau correspondent à la moyenne de deux répétitions de 25 explants par traitement.

Tableau 13 : Aptitude à la callogénèse et à la néoformation de divers explants prélevés sur des vitroplants de Dioscorea alata cv Florido.

| explant | niveau de prélèvement sur le vitroplant | % de callogénèse sur milieu MC après 30 jours | % de cal ayant formé une tige sur le milieu S30 après 90 jours |
|--|---|---|--|
| limbe sans le départ des nervures | feuille terminale | L1 85 % DNS | 0 % |
| | feuille subterminale | L2 80 % | 0 % |
| départ des nervures et pulvinus distal | feuille terminale | P1 76 % DNS | 4 % |
| | feuille subterminale | P2 70 % | 6 % |
| fragment de pétiole entre les 2 pulvini | feuille terminale | I1 12 % DNS | 0 % |
| | feuille subterminale | I2 10 % | 0 % |
| pulvinus proximal | feuille terminale | A1 80 % DNS | 8 % |
| | feuille subterminale | A2 74 % | 6 % |
| entrenoeud | terminal | E1 32 % DNS | 0 % |
| | subterminal | E2 28 % | 0 % |
| racines | | R 90 % | 0 % |
| microbulbilles entières | | BNE 90 % | 8 % |
| microbulbilles dont le cortex a été supprimé | | B 92 % | 12 % |
| noeuds | terminal | N1 84 % DNS | 8 % |
| | subterminal | N2 80 % | 16 % |

Les explants ont été placés sur le milieu MC pendant 30 jours puis transférés sur le milieu S 30. Les chiffres du tableau correspondent à la moyenne de deux répétitions de 25 explants par traitement.

Tableau 14 : Aptitude à la callogenèse et à la néoformation de divers explants prélevés sur des vitroplants de Dioscorea trifida cv Moengo V.

| explant | niveau de prélèvement sur le vitroplant | % de callogenèse sur milieu MC après 50 jours | % de cal ayant formé une tige sur le milieu S30 après 120 jours |
|--|---|---|---|
| limbe sans le départ des nervures | feuille terminale | L1 18 % | 0 % |
| | feuille subterminale | L2 16 % | 0 % |
| départ des nervures et pulvinus distal | feuille terminale | P1 30 % | 0 % |
| | feuille subterminale | P2 28 % | 0 % |
| fragment de pétiole entre les 2 pulvini | feuille terminale | I1 2 % | 0 % |
| | feuille subterminale | I2 0 % | 0 % |
| pulvinus proximal | feuille terminale | A1 20 % | 0 % |
| | feuille subterminale | A2 26 % | 0 % |
| entrenoead | terminal | E1 2 % | 0 % |
| | subterminal | E2 2 % | 0 % |
| racines | | R 40 % | 0 % |
| microbulbilles entières | | BNE 80 % | 6 % |
| microbulbilles dont le cortex a été supprimé | | B 84 % | 8 % |
| noeuds | terminal | N1 76 % | 4 % |
| | subterminal | N2 80 % | 8 % |

Les explants ont été placés sur le milieu MC pendant 50 jours puis transférés sur le milieu S30. Les chiffres du tableau correspondent à la moyenne de deux répétitions de 25 explants par traitement.

Tableau 15 : Aptitude à la callogenèse et à la néoformation de divers explants prélevés sur des vitroplants de Dioscorea trifida cv INRA 5-20

| explant | niveau de prélèvement sur le vitroplant | % de callogenèse sur milieu MC après 50 jours | % de cal ayant formé une tige sur le milieu S30 après 120 jours |
|--|---|---|---|
| limbe sans le départ des nervures | feuille terminale | L1 8 % | 0 % |
| | feuille subterminale | L2 10 % | 0 % |
| départ des nervures et pulvinus distal | feuille terminale | P1 26 % DNS | 0 % |
| | feuille subterminale | P2 24 % | 0 % |
| fragment de pétiole entre les 2 pulvini | feuille terminale | I1 0 % | 0 % |
| | feuille subterminale | I2 0 % | 0 % |
| pulvinus proximal | feuille terminale | A1 24 % DNS | 0 % |
| | feuille subterminale | A2 28 % | 0 % |
| entrenoeud | terminal | E1 0 % | 0 % |
| | subterminal | E2 0 % | 0 % |
| racines | | R 20 % | 0 % |
| microbulbilles entières | | BNE 60 % | 10 % |
| microbulbilles dont le cortex a été supprimé | | B 68 % | 8 % |
| noeuds | terminal | N1 50 % DNS | 6 % |
| | subterminal | N2 68 % | 8 % |
| Hypocotyles de seedlings issus du croisement INRA 5-20 x INRA 25 | | 58 % | 4 % |

Les explants ont été placés sur le milieu MC pendant 50 jours puis transférés sur le milieu S 30. Les chiffres du tableau correspondent à la moyenne de deux répétitions de 25 explants par traitement.

Des explants P1 de D. alata ont été placés sur le milieu MC pendant 30 jours. Les photos 6 et 7 montrent un début de callogenèse. Chez le cultivar Brazo Fuerte les cals sont anthocyanés (photo 6) et chez le cultivar Florido, ils sont blancs (photo 7).

PHOTO 6 : Début de callogenèse sur explant P1 du cv Brazo Fuerte.

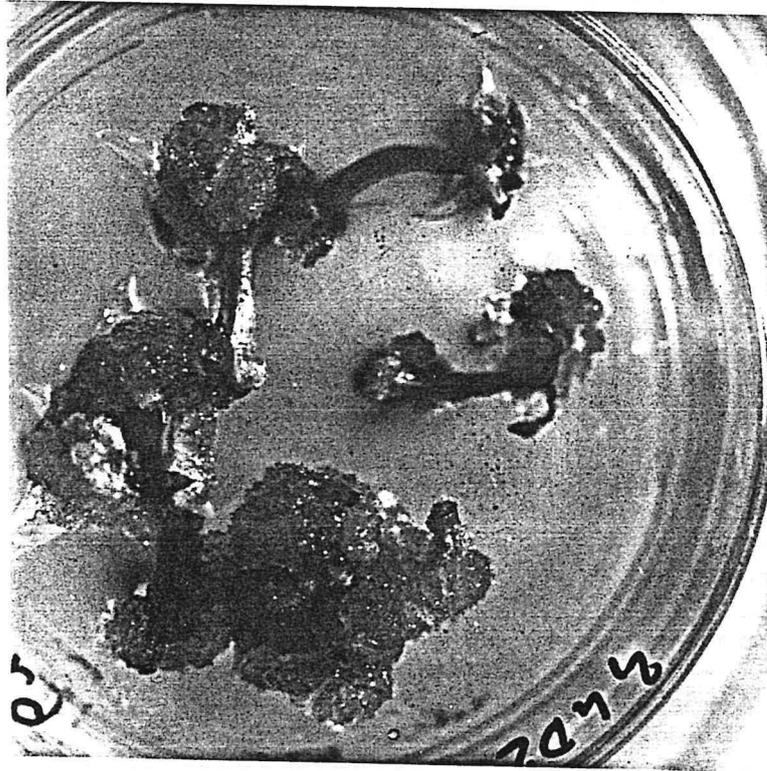
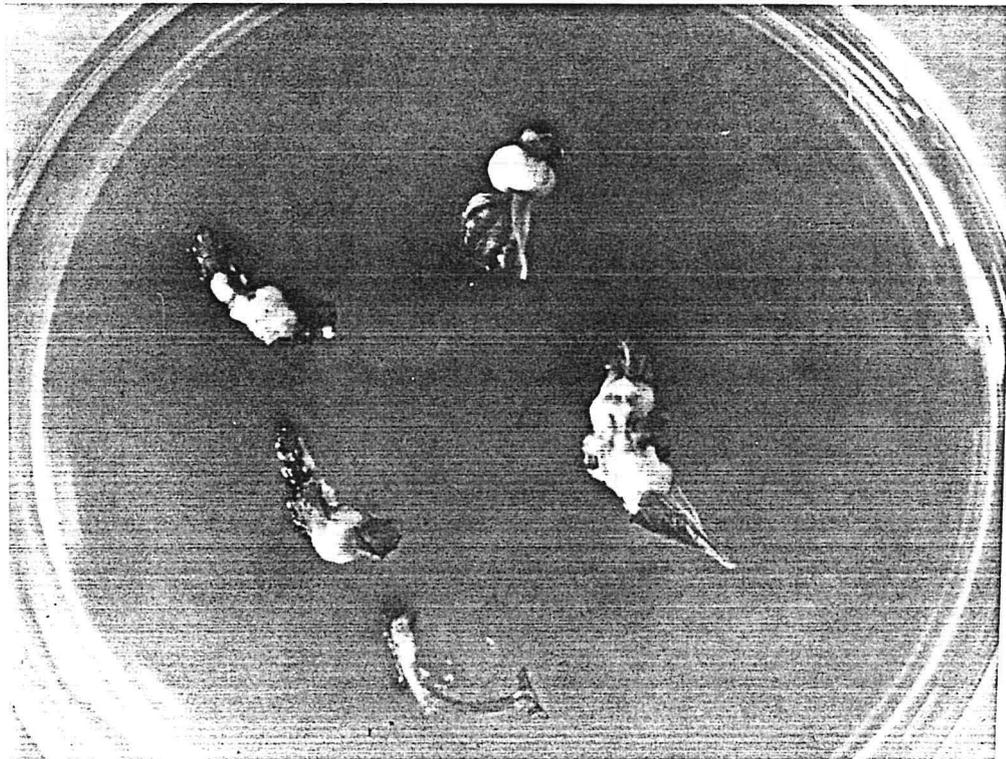


PHOTO 7 : Début de callogenèse sur explant P1 du cultivar Florido.



Sur les noeuds, les cals se forment à partir du bourgeon axillaire (noeud N2) ou terminal (explant N1). Les portions de tige et de pétiole qui sont présentes dans cet explant participent très peu à la formation du cal.

Aussi bien pour la callogenèse que pour l'organogenèse nous n'avons pas observé de différences significatives entre le niveau terminal et le niveau subterminal de prélèvement des explants.

Les explants qui donnent les meilleurs pourcentages de callogenèse et d'organogenèse ultérieures sont les noeuds et les microbulbilles. Ces explants contiennent des méristèmes. Parmi les explants sans méristème qui ont donné des néoformations de tiges après callogenèse, nous avons trouvé le pulvinus proximal et l'ensemble pulvinus distal et départ des nervures (P1 et P2), chez *D. alata*. Chez *D. trifida* aucun explant dépourvu de méristème ne nous a donné de néoformation de tiges.

1.4. - Discussion

Si l'explant initial contient un méristème, les néoformations qui apparaissent par la suite sur les cals issus de cet explant peuvent provenir d'un simple démarrage de méristème qui aurait proliféré au cours des repiquages successifs (KING et al., 1978). Dans ce cas, les plantules néoformées sont issues d'un méristème de la plante mère et la variabilité induite est faible, les mécanismes réprimant l'instabilité génétique étant particulièrement développés au niveau des méristèmes (DEMARLY, 1984).

Au contraire, une fois séparé de la plante mère, un explant initial ne contenant aucun méristème échappe aux mécanismes stabilisateurs et correcteurs de la variabilité et il pourra y avoir néoformation de "variants".

D'après la revue bibliographique résumée aux tableaux 2 et 3, p. 13 à 15, seuls quelques organes ont été retenus pour l'obtention de cals :

- les tubercules chez *D. deltoidea* (ABROSHNIKOVA et al., 1971 ; CHATURVEDI et SRIVASTAVA, 1976 ; CHATURVEDI et CHOWDHURY, 1980) et *D. floribunda* (AMINUDDIN et CHOWDHURY, 1983).

Des explants P1 de *D. trifida* ont été placés sur le milieu MC pendant 50 jours et repiqués sur le milieu ME. Les photos 8 et 9 montrent le développement des cals après 45 jours sur le milieu ME. Les cals du cultivar Moengo V sont anthocyanés (photo 8) et ceux du cultivar INRA 5-20 sont blancs.

PHOTO 8 : cals d'explants P1 du cultivar Moengo V, après 95 jours sur milieu non organogène.

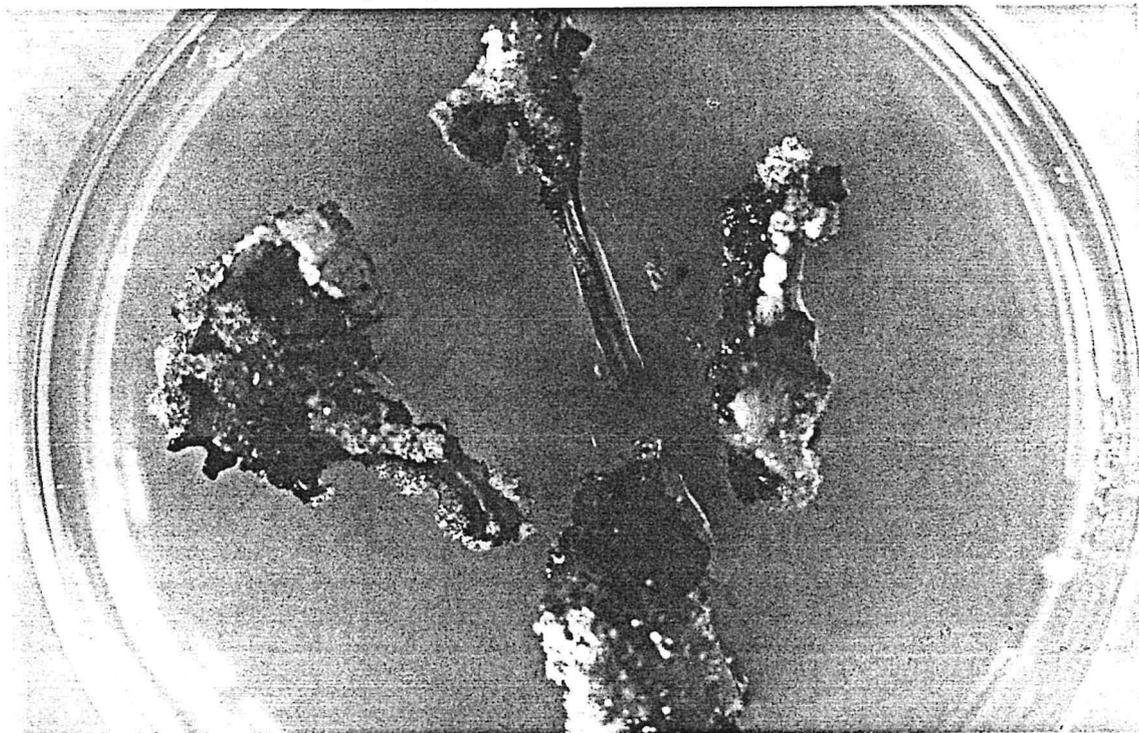


PHOTO 9 : cals d'explants P1 du cultivar INRA 5-20, après 95 jour sur milieu non organogène.



- les hypocotyles de graines en germination chez D. zingiberensis (Research group of plant morphology, 1978) ; D. deltoidea (GREWAL et ATAL, 1976) ; D. villosa, D. balcanica et D. polystachya (RENARD, 1984).

- les jeunes plantules entières chez D. deltoidea (KAUL et STABA, 1968 ; MARSHALL et STABA, 1976).

- les noeuds chez D. composita (ORTEGA-PACHECO, 1970).

Tous ces organes contiennent des méristèmes : les hypocotyles de graines parfois appelés "tubercule du seedling" contiennent une ébauche d'axe caulinaire, des ébauches de racines et un méristème secondaire qui est à l'origine de la tubérisation de l'axe hypocotylé (LAWTON et LAWTON, 1967 ; CARTONI-CRETON, 1977) ; les tubercules et les bulbilles contiennent des îlots méristématiques diffus dans la zone corticale profonde (MATHURIN, 1982 ; WICKHAM et al., 1982). Les tubercules qui présentent les meilleures potentialités organogènes sont ceux dont la dormance a été levée (AMMIRATO, 1984), ce qui témoigne d'une influence de la présence de méristèmes actifs sur les possibilités de néoformation.

Les auteurs qui ont obtenu des néoformations à partir de cals de Dioscorea sont partis d'explants initiaux contenant soit des méristèmes (embryons, hypocotyles, plantules, noeuds) soit des pro-méristèmes (tubercules et bulbilles), cf tableau 3 p. 15. Une seule étude (AMMIRATO, 1982) mentionne l'obtention de cals et de suspensions cellulaires à partir de jeunes feuilles de D. alata, D. bulbifera, D. composita et D. floribunda. Aucune néoformation de tige n'avait pu être obtenue à partir de ces cals de feuilles.

Nos expériences ont confirmé les données de la bibliographie pour ce qui concerne les explants contenant des méristèmes : les noeuds, les bulbilles et les hypocotyles de graines ont montré des potentialités de callogenèse et d'organogenèse élevées chez D. alata et D. trifida. Mais nous avons également pu mettre en évidence les capacités d'organogenèse des cals issus de fragments de feuilles, ce qui constitue un résultat nouveau.

Il ne nous a pas été possible de travailler sur des inflorescences et, à notre connaissance, aucune étude n'a été faite sur les organes floraux. Il serait souhaitable de tester l'aptitude de ce matériel qui s'est révélé très réactif chez de nombreuses Monocotylédones (riz, sorgho, Pennisetum...).

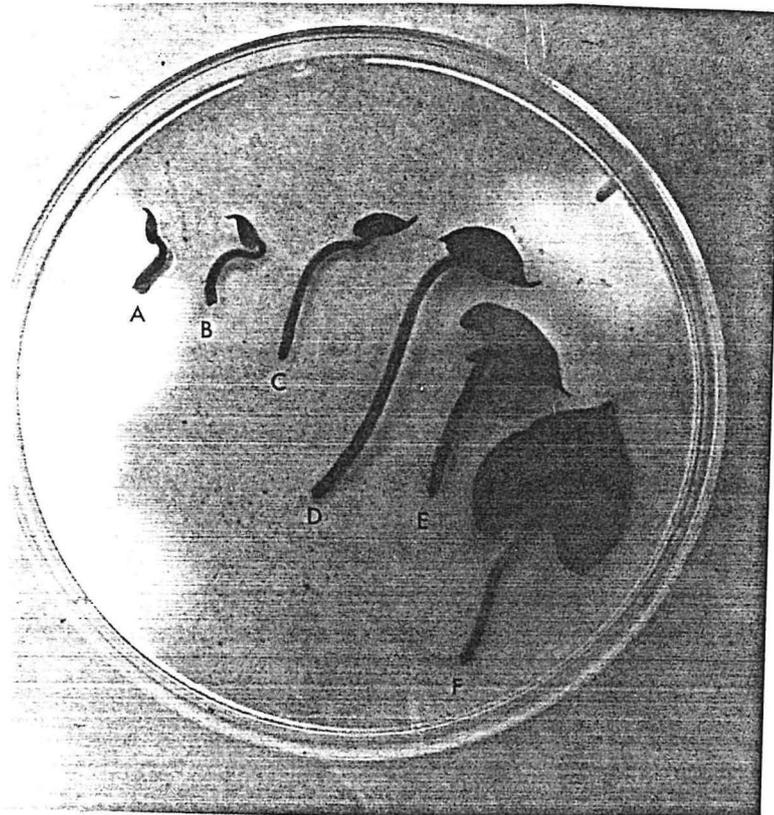
TABLEAU 17 : Influence de l'âge de la feuille terminale sur la callogénèse et l'organogénèse de l'explant P1.

| | Callogénèse (après 40 j) | Pourcentage d'organogénèse | |
|----------------|--------------------------|----------------------------|----------------|
| | Feuilles jeunes | 44 % a | de tige 16 % b |
| Feuilles âgées | 54 % a | de tige 2 % c | de racine 8 % |

Les explants P1 de feuilles jeunes et de feuilles âgées ont été placés sur le milieu MB + sac 30 g/l + ANA 1 mg/l. 2 répétitions de 30 explants par traitement ont été faites.

N.B. Il n'y a pas de différences significatives, au seuil 5%, entre les traitements portant la même lettre.

PHOTO 10 : Différents stades de développement de la feuille terminale.



1.4. - Conclusion

Notre but étant d'obtenir des néoformations de tiges en vue d'une diversification génétique, nous avons recherché des explants initiaux sans méristème. Nous avons écarté le pulvinus proximal qui est situé au contact du méristème axillaire et qui pouvait contenir des prolongements méristématiques. Nous avons donc choisi par la suite de cette étude l'explant P constitué de l'ensemble du pulvinus distal et du départ des nervures. Cet explant ne contient pas de méristème comme l'ont montré des études anatomiques sur *Dioscoreae* (AYENSU, 1972 ; ESPIAND, 1983) et nos propres observations cytologiques (cf photos 11 et 12 p. 89).

2 - INFLUENCE DE L'AGE ET DE LA POSITION DE L'ORGANE SUR LA PLANTE MERE

Ils influencent le métabolisme de l'explant et ses réactions en culture in vitro. On a montré par exemple une action de l'âge sur les potentialités de callogenèse et d'organogenèse des tubercules de pomme de terre (OURAISHI et al, 1979) et des cotylédons de laitue (WEBB et TORRES, 1984)...

2.1. - Influence de l'âge de la feuille terminale

La feuille terminale présente divers stades de développement (cf photo 10). Des explants P1 ont été prélevés aux stades B et C appelés "jeunes" et au stade F appelé âgé.

La callogenèse n'est pas significativement différente chez les explants prélevés sur des feuilles jeunes ou âgées mais le pourcentage de néoformation est significativement plus élevé chez les feuilles jeunes (cf tableau 17).

2.2. - INFLUENCE DU NIVEAU DE PRELEVEMENT DE L'EXPLANT SUR LA PLANTE MERE

2.2.1. - Expérience

Des explants P ont été prélevés sur des feuilles situées à différents niveaux sur le vitroplant, de la base (P4) à l'apex (P1). Leur aptitude à la callogenèse a été comparée ainsi que les possibilités d'organogenèse des cals issus de ces explants.

TABLEAU 18 : Influence du niveau de prélèvement d'explants P sur le pourcentage de callogenèse chez D. trifida, cv Moengo V.

| Callogenèse et organogénèse Niveau de prélèvement de l'explant | Pourcentage de callogenèse MC MB + sac 40 g/l + 2,4-D 5mg/l + Kin 1mg/l | Pourcentage d'organogénèse de tiges sur Milieu de régénération MR |
|---|---|--|
| P 1 | 60 % a | 0 % |
| P 2 | 54 % a | 0 % |
| P 3 | 20 % b | 0 % |
| P 4 | 12 % c | 0 % |

TABLEAU 19 : Influence du niveau de prélèvement sur le pourcentage de callogenèse et d'organogénèse de tige à partir d'explants P de D. alata cv Brazo Fuerte.

| Callogenèse et organogénèse Niveau de prélèvement de l'explant | Pourcentage de callogenèse sur MB + sac 40 g/l + 2,4-D 5mg/l + Kin 1mg/l | Pourcentage d'organogénèse de tiges sur Milieu de régénération MR |
|---|--|--|
| P 1 | 96 % d | e 14 % après 75 j |
| P 2 | 88 % d | e 12 % après 75 j |
| P 3 | 94 % d | 0 % |
| P 4 | 92 % d | 0 % |

Des explants P1 de D. trifida (tableau 18) et de D. alata (tableau 19) prélevés sur les feuilles F1 à F4 ont été placés sur le milieu MC. La callogenèse a été observée après 50 jours pour le cv Moengo V et 30 jours pour le cv Brazo Fuerte. Après une phase d'entretien des cals, ceux-ci ont été transférés sur le milieu MR. 2 répétitions de 25 explants par niveau ont été faites.

N.B. Il n'y a pas de différences significatives au seuil 5% entre les traitements portant la même lettre.

2.2.2. - Résultats

Chez D. alata, la callogenèse induite par le 2,4-D qui est une auxine efficace ne présente pas de différences significatives entre le niveau basal (F4) et le niveau terminal (F1). Par contre, seuls les cals issus des feuilles terminales F1 et F2 ont donné des néoformations de tiges.

Chez D. trifida, nous n'avons pas obtenu de néoformations de tiges mais on observe une baisse significative du pourcentage de callogenèse du niveau 1 au niveau 4 (cf tableau 18).

2.3. - Discussion

Le vitroplant se développe en formant tout d'abord la feuille F4 (d'où est tiré l'explant P4) puis la feuille F3, puis F2 et F1. Il y a donc une différence d'âge entre les explants P1, P2, P3 et P4, et même si morphologiquement la feuille change peu, il semble qu'elle change physiologiquement puisqu'on observe une différence significative dans la callogenèse et l'organogenèse entre les feuilles basales et celles du sommet de la bouture.

AMMIRATO (1982) n'avait obtenu de callogenèse que sur les jeunes feuilles dont la taille était la moitié de celle des feuilles matures (ce qui correspond probablement aux stades B ou C de la photo 3) chez D. alata, D. bulbifera, D. composita et D. floribunda (cultivars non précises). Par contre ABROSHNIKOVA et al., 1971 n'avaient pas obtenu de cals à partir de tissus foliaires prélevés sur des plantules de D. deltoidea, issues de graines et cultivées in vitro.

Nous avons pu obtenir une bonne callogenèse chez les explants issus de feuilles âgées avec différents milieux mais nous avons observé une influence significative de l'âge sur le pourcentage de néoformation. La différence entre nos résultats et ceux d'ABROSHNIKOVA et d'AMMIRATO pourrait être due à un facteur variétal et également à la composition du milieu de callogenèse, la notre présentant un niveau auxinique plus élevé. Par ailleurs, les explants P ont été prélevés sur des vitroplants cultivés en conditions axéniques pendant de longues périodes. Or un passage in vitro prolongé entraîne un rajeunissement des végétaux (NOZERAN et al., 1982). Les vitroplants de D. alata présentent des caractères juvéniles (feuilles alternes, absence de tubercules) qui pourraient expliquer la plus grande réactivité des explants foliaires.

On a observé dans nos deux expériences que les cals issus de feuilles âgées ne régénèrent pas. Cette influence de l'âge sur la capacité d'organogenèse a été notée chez de nombreuses Monocotylédones par exemple chez le riz (WERNICKE et al., 1981) et chez le sorgho (WERNICKE et BRETELL, 1980) où l'aptitude à régénérer des tiges diminue au fur et à mesure que les feuilles se différencient.

TABLEAU 20 : Influence de la position de l'explant dans le milieu sur la callogénèse et l'organogénèse ultérieure.

| Explants | Positions | Pourcentages de callogénèse |
|----------|--|-----------------------------|
| L 1 | Dressée | 0 % |
| | Couchée face supérieure contre le milieu | 90 % |
| | Couchée face inférieure contre le milieu | 65 % |
| P 1 | Dressée | 5 % |
| | Couchée face supérieure contre le milieu | 80 % |
| | Couchée face inférieure contre le milieu | 75 % |
| F 1 | Dressée | 20 % |
| | Couchée face inférieure contre le milieu | 60 % |

Les explants initiaux prélevés sur *D. alata* cv Brazo Fuerte ont été mis en culture sur le milieu de callogénèse MC. Dans cette expérience, nous avons utilisé des tubes afin de permettre une position dressée. Nous avons employé 20 explants par traitement.

Les explants L1 et P1 ont été couchés soit avec la face inférieure, soit avec la face supérieure du limbe en contact avec le milieu. Les feuilles entières qui avaient leur limbe replié en deux ont été couchées sur le côté, la face inférieure du limbe contre le milieu.

TABLEAU 21 : Influence de la taille de l'explant sur la callogénèse

| | Pourcentages de callogénèse |
|---|-----------------------------|
| Feuille entière (2 cm) | 65 % a |
| P 1 (2 cm de longueur) | 70 % a |
| P 1 (1 cm de longueur) | 90 % b |
| P1 (0,5 cm de longueur) | 85 % b |
| P1 (0,2 cm de longueur, départ des nervures). | 50 % c |

Des explants P1 de *D. alata* cv Brazo Fuerte ont été placés sur le milieu MC. 20 explants par taille ont été employés. La callogénèse a été observée après 30 jours.

N.B. Il n'y a pas de différences significatives, au seuil 5%, entre les traitements portant la même lettre.

3 - INFLUENCE DE LA POSITION SUR LE MILIEU ET DE LA TAILLE DE L'EXPLANT INITIAL

3.1. - Position de l'explant sur le milieu

Des feuilles entières Fl (sans l'apex N1) et des fragments de feuilles Ll et Pl ont été mis en position dressée ou couchée sur le milieu (cf tableau 20).

Seules les parties en contact avec le milieu présentent des cals. Les cals qui se sont développés sur les feuilles et les pétioles dressés se sont formés sur la partie qui était à l'intérieur du milieu gélifié.

Pour les limbes, les cals se développent mieux si la face supérieure de la feuille repose sur le milieu. Pour les explants P la position semble moins affecter la callogenèse.

3.2. - Taille de l'explant

Nous avons mis sur le milieu de callogenèse MC, des feuilles entières et des explants Pl de diverses longueurs : 2 cm, 1 cm, 0,5 cm et 0,2 cm.

La callogenèse démarre au niveau de la blessure du pétiole et du départ des nervures. Le fait de recouper une partie du limbe active la formation du cal au niveau du départ des nervures. Lorsque le limbe est entier, la callogenèse se fait préférentiellement au niveau de la blessure du pétiole. Lorsque le pétiole est trop long (Pl = 2 cm) la callogenèse se fait plutôt au niveau du pulvinus et à l'extrémité coupée du pétiole ; entre deux cals, reste un morceau de pétiole peu modifié. Lorsque l'explant est de taille plus réduite (Pl = 0,2 cm), la callogenèse est moins intense. La taille optimale semble se situer entre 0,5 et 1,0 cm (cf tableau 21).

4 - CONCLUSIONS

Il semblerait que les explants P de jeunes feuilles situées au niveau terminal ou subterminal puissent présenter une aptitude à régénérer suffisante chez D. alata pour servir de matériel de base dans cette étude. Nous avons, dans la suite de ce travail, essayé de mettre au point des milieux de callogenèse d'entretien des cals et de régénération susceptibles d'augmenter le taux de néoformations obtenues sur cet explant.

Nous n'avons pas, par contre obtenu de résultats avec des fragments de feuilles chez D. trifida. Nous avons cependant essayé de poursuivre des recherches sur l'explant P1. En effet deux hypothèses peuvent expliquer cette absence de néoformations :

- la perte de la totipotence des cellules de l'explant initial ou du cal ; dans ce cas il faudrait envisager un autre explant de départ ou tester d'autres génotypes dont certains pourraient se montrer plus réactifs.

- l'absence des stimuli nécessaires pour que les cellules s'engagent dans un processus d'organogenèse dans cette expérience. En effet les milieux que nous avons employés dans les expériences relatées dans ce chapitre avaient été mis au point par des expériences préliminaires sur D. alata cv Brazo Fuerte, et ils étaient peut être moins adaptés à l'espèce D. trifida.

5 - RESUME

Divers types d'explants prélevés sur des vitroplants ont été étudiés pour l'aptitude à la callogenèse et à l'organogénèse chez D. alata et D. trifida. Ceux qui ont donné les meilleurs pourcentages d'organogénèse à partir de cal sont les noeuds, les microbulbilles et les fragments de feuilles contenant un pulvinus. Ce dernier type d'explant a été retenu du fait qu'il ne contient pas de méristème. Nous avons choisi l'explant P constitué du départ des nervures et du pulvinus distal.

Une étude de l'âge et de la position sur la plante mère de la feuille où est prélevé l'explant P a montré que les jeunes feuilles terminales dont le limbe est replié présentent de plus grandes potentialités organogènes que les feuilles matures.

Nous avons donc poursuivi cette étude avec des explants P1 issus de jeunes feuilles terminales (F1). Pour la callogenèse, la taille optimale de cet explant P1 se situe entre 0,5 et 1 cm et seules les parties en contact avec le milieu présentent un cal.

CHAPITRE 4 : INDUCTION ET ENTRETIEN DES CALS

Tableau 22 : Influence de diverses auxines sur le pourcentage de callogenèse d'explants P1 de *D. alata* cv Brazo Fuerte.

Les explants P1 ont été placés sur les milieux de callogenèse MB + sac 40 g/l additionné des auxines et des cytokinines mentionnées dans le tableau. Après 30 jours, nous avons noté le pourcentage de callogenèse (cals) et nous avons transférés ces cals sur le milieu d'organogénèse S30. Nous avons observé les néoformations de tige (tiges) apparues après 120 jours sur le milieu S30. Les pourcentages indiqués dans ce tableau correspondent à 50 explants par traitement.

| Auxine dans le milieu de callogenèse | Cytokinine dans le milieu de callogenèse | |
|--------------------------------------|--|-------------------------|
| | Kin $5 \cdot 10^{-6} M$ | BAP $5 \cdot 10^{-6} M$ |
| 2,4-D $10^{-5} M$ | cals : 68 % tiges : 4 % | D N S 40 % 0 % |
| 3,4-D $10^{-5} M$ | cals : 36 % tiges : 0 % * | D S 8 % 0 % |
| Pi $10^{-5} M$ | cals : 64 % tiges : 0 % | D S 24 % 0 % |
| α 2,45 T $10^{-5} M$ | cals : 80 % tiges : 6 % | D S 16 % 0 % |
| MCPA $10^{-5} M$ | cals : 84 % tiges : 0 % | D S 20 % 0 % |
| ANA $10^{-5} M$ | cals : 24 % tiges : 2 % | D N S 16 % 2 % |

* Un cal a donné une néoformation de tige 12 mois après transfert sur milieu organogène.

On a cherché à mettre au point des milieux de callogenèse et d'entretien des cals à partir d'explants P1 en essayant diverses combinaisons, d'auxine, de cytokinine et de saccharose chez D. alata et D. trifida. On a également expérimenté l'influence de la température et de la lumière ; cette étude a été complétée par l'observation cytologique des cals chez D. alata.

1 - CHOIX DES COMBINAISONS AUXINE - CYTOKININE DANS LE MILIEU DE CALLOGENESE

D'après les données bibliographiques sur Dioscorea (cf tableaux 2 et 3 p. 13 à 15), le 2,4-D est la seule auxine employée pour la callogenèse et l'entretien des cals. Certains travaux cependant l'emploient en combinaison avec l'AIA (CHATURVEDI et SRIVASTAVA, 1976 ; CHATURVEDI et CHOWDHURY, 1980) ou l'ANA (ARNOLIN, 1980).

Mais, le 2,4-D qui est un puissant activateur de la callogenèse est généralement inhibiteur de l'organogenèse (MARGARA, 1984). Il a, de plus, un effet toxique aux concentrations élevées. Nous avons donc étudié l'influence de diverses auxines qui n'avaient pas été expérimentées à notre connaissance sur les Dioscoreae afin de les comparer à celle du 2,4-D et de l'ANA.

1.1. - Comparaison de 6 auxines différentes au niveau 10^{-5} M

1.1.1. - Expérience

Nous avons expérimenté 6 auxines différentes (le 2,4-D, le 3,4-D, l' α 2,4,5-T, l'ANA, le MCPA et le picloram) au niveau 10^{-5} M soit environ 2 mg/l en combinaison avec deux cytokinines (la kinétine ou la BAP) au niveau $5 \cdot 10^{-5}$ M soit environ 1 mg/l.

1.1.2. - Résultats

- Chez D. alata, le pourcentage de callogenèse est significativement plus élevé en présence de kinétine qu'en présence de BAP (cf tableau 22). Les auxines les plus efficaces pour la callogenèse sont le 2,4-D, l' α 2,4,5-T, le MCPA et le picloram. Le 2,4-D et l' α 2,4,5-T assurent une bonne callogenèse sans inhiber totalement les possibilités de néoformation.

- Chez D. trifida, les auxines les plus efficaces pour la callogenèse sont le picloram, le 2,4-D et le MCPA. Nous n'avons pas observé de différence significative entre les deux cytokinines (cf tableau 23). 10 % des cals ont donné des racines sur milieu d'organogenèse. Aucune néoformation de tige n'a été observée sur ce milieu après 90 jours mais 12 mois après le

Tableau 23 : Influence de diverses auxines sur le pourcentage de callogenèse d'explants P1 de *D. trifida* cv Moengo V et INRA 5-20 après 50 jours.

Les explants P1 ont été placés sur les milieux de callogenèse MB + sac 40 g/l additionnés des auxines et des cytokinines mentionnées dans le tableau.

| Auxine dans le milieu de callogenèse | Cytokinine dans le milieu de callogenèse | |
|--------------------------------------|--|-------------------------|
| | Kin $5 \cdot 10^{-6}$ M | BAP $5 \cdot 10^{-6}$ M |
| 2,4-D 10^{-5} M | MOENGO V : 40 % * | D N S 40 % |
| | INRA 5-20 : 35 % | D N S 35 % |
| 3,4-D 10^{-5} M | MOENGO V : 8 % | D N S 10 % |
| | INRA 5-20 : 4 % | D N S 4 % |
| Pi 10^{-5} M | MOENGO V : 35 % | D N S 25 % |
| | INRA 5-20 : 35 % | D S 20 % |
| α 2,4 T 10^{-5} M | MOENGO V : 10 % | D N S 10 % |
| | INRA 5-20 : 10 % * | D N S 10 % |
| MCPA 10^{-5} M | MOENGO V : 30 % | D N S 35 % |
| | INRA 5-20 : 35 % | D N S 30 % |
| ANA 10^{-5} M | MOENGO V : 15 % | D N S 25 % |
| | INRA 5-20 : 10 % | D N S 10 % |

* Après 3 repiquages sur le milieu organogène MR, les cals ont été transférés sur le milieu organogène MB + sac 30 g/l + AIB 0,5 mg/l :

- Deux cals de INRA 5-20 initiés sur MB + α 2,45 T 10^{-5} M + Kin $5 \cdot 10^{-6}$ M ont donné une néoformation de tige 11 mois après la mise sur milieu organogène.
- Un cal de Moengo V initié sur MB + 2,4-D 10^{-5} M + Kin $5 \cdot 10^{-6}$ M a donné une néoformation de tige 12 mois après la mise sur milieu organogène. . .

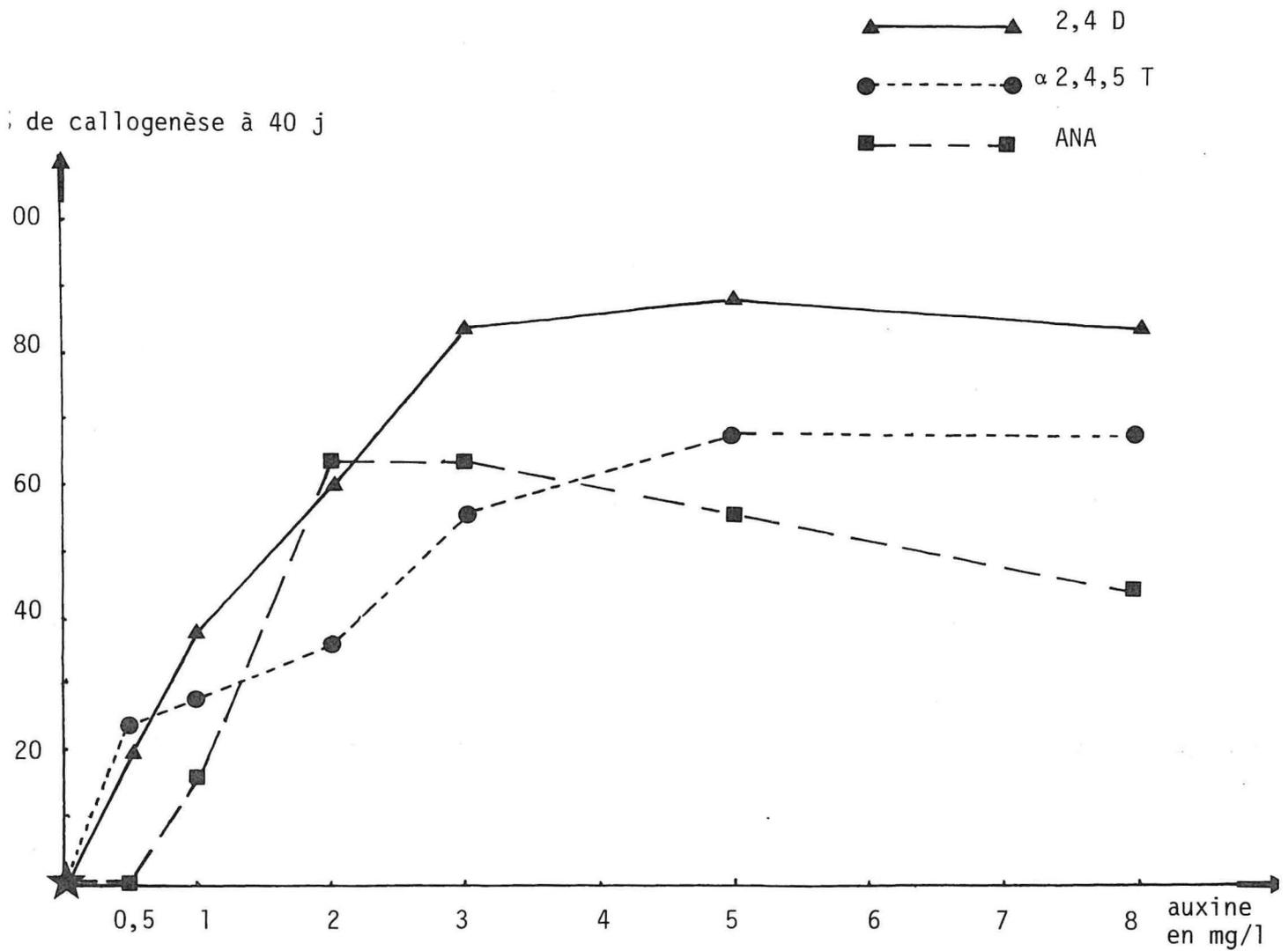


Figure 6 : Influence de la concentration en différentes auxines sur le % de callogenèse de pétiole P1 de *Dioscorea alata*.

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

Tableau 24 : Influence de la nature et de la concentration de l'auxine dans le milieu de callogenèse sur le pourcentage de néoformations de tiges ou de racines après 120 jours sur le milieu organogène S 30

| Niveau de 2,4-D dans le milieu de callogenèse | % de néoformation sur le milieu MR | |
|---|------------------------------------|------------|
| | de tiges | de racines |
| 0 | 0 % | 0 % |
| 0,5 | 4 % | 4 % |
| 1,0 | 4 % | 4 % |
| 2,0 | 4 % | 4 % |
| 3,0 | 2 % | 2 % |
| 5,0 | 4 % | 4 % |
| 8,0 | 0 % | 0 % |

| Niveau d' α 2,45 I dans le milieu de callogenèse | % de néoformation sur le milieu MR | |
|---|------------------------------------|------------|
| | de tiges | de racines |
| 0 | 0 % | 0 % |
| 0,5 | 4 % | 8 % |
| 1,0 | 0 % | 8 % |
| 2,0 | 0 % | 0 % |
| 3,0 | 0 % | 4 % |
| 5,0 | 4 % | 12 % |
| 8,0 | 0 % | 0 % |

| Niveau d'ANA dans le milieu de callogenèse | % de néoformation sur le milieu MR | |
|--|------------------------------------|------------|
| | de tiges | de racines |
| 0 | 0 % | 0 % |
| 0,5 | 4 % | 12 % |
| 1,0 | 4 % | 12 % |
| 2,0 | 2 % | 2 % |
| 3,0 | 0 % | 0 % |
| 5,0 | 0 % | 0 % |
| 8,0 | 0 % | 0 % |

Des explants P1 de *D. alata* cv Brazo Fuerte ont été placés sur le milieu MB + sac 40 g/l + Kin 1 mg/l + auxines (0,0 - 0,5 - 2,0 - 3,0 - 5,0 - 8,0 mg/l). Après 40 jours de callogenèse, les explants ont été transférés sur le milieu MR. Deux répétitions de 25 explants par traitement ont été réalisées.

passage sur milieu organogène, deux cals du cultivar INRA 5-20 et un cal du cultivar Moengo V ont néoformé des tiges. Ces néoformations s'étant produites sur les cals initiés avec le 2,4-D ou l' α 2,4,5-T, il semble préférable de choisir ces auxines pour la callogenèse chez D. trifida.

1.1.3. - Conclusion

Le picloram semble une auxine très rémanente qui oriente le cal vers un programme de croissance qui continue à se dérouler plusieurs mois après la mise sur milieu organogène. Les cals initiés avec l' α 2,4,5-T continuent également à croître sur le milieu organogène pendant 2 à 3 mois, mais leur croissance est plus réduite et certains d'entre eux ont formé des tiges. Au contraire, les cals formés sur des milieux contenant du 2,4-D, du MCPA ou de l'ANA noircissent après deux à trois mois quand ils sont placés sur le milieu organogène MR. Il se forme, sur certains de ces cals noircis, des cals généralement blancs parfois chlorophylliens qui peuvent régénérer des tiges.

Le 2,4-D, le picloram et le MCPA permettent l'induction de la callogenèse chez les deux espèces étudiées. Au contraire, le 3,4-D et l'ANA se sont révélés moins efficaces à la dose testée.

1.2. - Comparaison de l'ANA, de l' α 2,4,5-T et du 2,4-D à différentes concentrations

1.2.1. - Expérience

Afin de pouvoir comparer plus précisément les différentes auxines, nous avons étudié une gamme de concentration (de 0 à 8 mg/l). Nous nous sommes limités aux trois auxines qui ont permis l'apparition de néoformations de tiges sur le milieu organogène : le 2,4-D, l' α 2,4,5-T et l'ANA. Après 40 jours de callogenèse, les explants ont été transférés sur le milieu d'organogène MR.

1.2.2. - Résultats

Les résultats de la figure 6 montrent que le meilleur pourcentage de callogenèse est obtenu avec le 2,4-D à partir de 3 mg/l. Ce niveau de 2,4-D ne bloque pas les possibilités de néoformations sur milieu organogène : les cals initiés en présence de 2,4-D entre 0,5 et 5 mg/l ont montré un taux de néoformations supérieur à celui des cals initiés avec l'ANA et l' α 2,4,5-T (cf tableau 24).

1.3. - Conclusion

Ces deux expériences montrent que le 2,4-D en association avec la kinétine assure une bonne callogenèse sans inhiber totalement les possibilités de néoformation de cals d'explants P1 de D. alata et D. trifida.

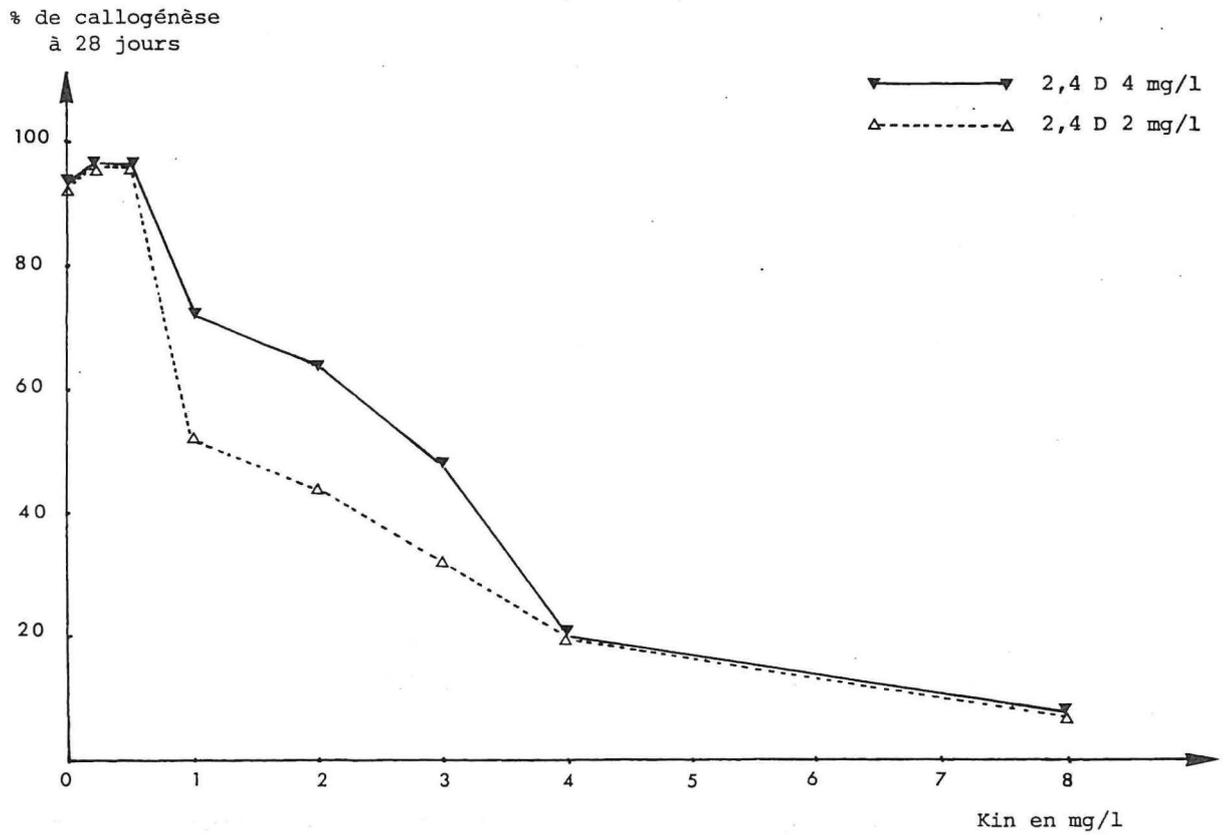


Figure 7 : Influence de la concentration en Kinétine sur le % de callogénèse de pétiole P1 de *Dioscorea alata*.

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.

Aucune des autres auxines étudiées n'ayant donné de meilleurs résultats, nous avons essayé par la suite d'améliorer le milieu de callogenèse en gardant le 2,4-D comme auxine et la kinétine comme cytokinine.

2 - AMELIORATION DU MILIEU DE CALLOGENESE CHEZ D. ALATA CV BRAZO FUERTE

2.1. - Recherches du niveau optimal de kinétine dans le milieu de callogenese

2.1.1. - Expérience et résultats

Huit niveaux de kinétine (de 0 à 8 mg/l) ont été étudiés en association avec 2 ou 4 mg/l de 2,4-D (cf figure 7).

Des concentrations de kinétine supérieures à 1 mg/l réduisent la callogenèse pour les deux niveaux de 2,4-D testés et elles s'accompagnent d'un rejet important de substances colorées dans le milieu.

Quand on augmente la teneur en kinétine de 1 à 8 mg/l on observe une nette diminution de la grosseur des cals initiés et une intensification de la pigmentation anthocyanique : les cals initiés en présence de 3 à 8 mg/l de kinétine forment des petites boules sombres violet foncé tandis qu'en présence de 0 à 2 mg/l de kinétine ils forment des cals rose clair assez bien développés.

Des racines se développent sur les cals initiés en l'absence de kinétine. L'élévation du niveau d'auxine de 2 à 4 mg/l réduit l'organogenèse de racines (de 50 à 30 %) sans les faire disparaître totalement ; mais de faibles concentrations de kinétine (0,25 à 0,5 mg/l) suffisent pour inhiber leur formation.

2.1.2. - Discussion

Dans certains cas les cytokinines sont indispensables à la callogenèse mais, chez les Monocotylédones, leur utilité a été contestée (YAMADA, 1977 ; HUANG et MURASHIGE, 1983) et elles sont peu employées pour la callogenèse et l'entretien des cals (cf tableau 11 p. 44). Les milieux publiés pour les Dioscoreae ne contiennent généralement pas de cytokinine (cf tableau 2 p. 13). ABROSHNIKOVA et al. (1971) ont signalé un effet inhibiteur de la kinétine à la concentration de 2 mg/l sur la croissance des cals de plantule de D. deltoidea. Certains auteurs préconisent d'élever légèrement le taux d'auxine afin de faire disparaître l'organogenèse de racines. (KAUL et STABA, 1968 ; KHANNA et al., 1977, 1980) ; Research Group of Plant Morphology, 1978). Et effectivement le développement des racines est plus faible avec 4 mg/l de 2,4-D qu'avec 2 mg/l. Il est cependant trop abondant sur l'explant Pl et le cal pour être éliminé par une simple élévation

% de callogénèse
à 28 jours

- 72 -

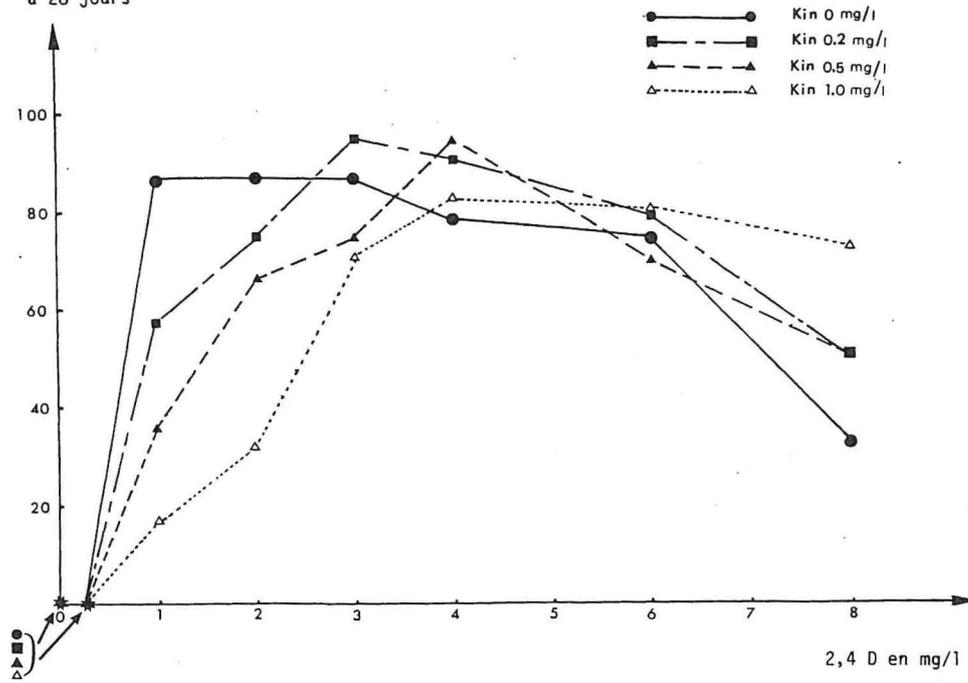


Figure 8 : Influence de la concentration en 2,4 D et en Kinetine sur le % de callogénèse de pétiole P2 de *Dioscorea alata*.

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 8. Les pourcentages correspondent à 2 répétitions de 25 explants par traitement.

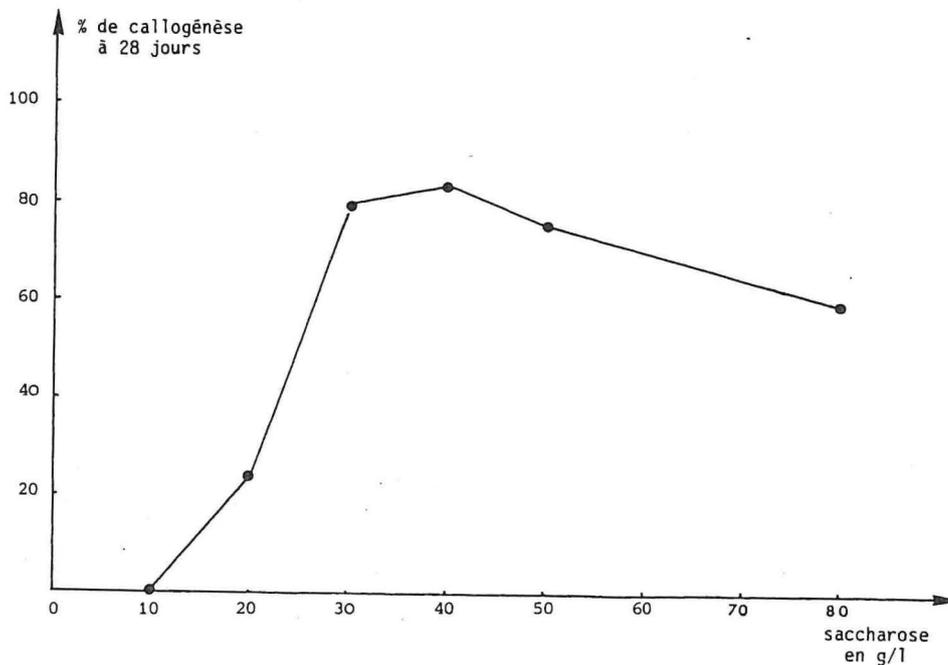


Figure 9 : Influence de la concentration en sucre sur le % de callogénèse de pétiole P1 de *Dioscorea alata*.

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.

du taux d'auxine et la présence d'une cytokinine à faible dose est nécessaire.

2.2. - Recherche du niveau optimal de 2,4-D dans le milieu de callogenèse en fonction de différentes concentrations de kinétine

Huit niveaux de 2,4-D (de 0 à 8 mg/l) ont été étudiés en association avec différentes concentrations en kinétine (cf figure 8).

Aucune callogenèse n'a été observée avec 0 ou 0,2 mg/l de 2,4-D. L'optimum se situe entre 3 et 6 mg/l pour toutes les concentrations de kinétine testées. A partir de 8 mg/l on observe une diminution du pourcentage de callogenèse.

Les résultats montrent une interaction entre la kinétine et le 2,4-D. Plus le niveau de kinétine est élevé dans le milieu de callogenèse plus le niveau de 2,4-D doit être élevé pour obtenir le même pourcentage de callogenèse.

Une telle interaction n'a pas été étudiée chez Dioscorea à notre connaissance mais elle a été observée chez Asparagus (YAKUVA et al., 1971). Les Asparaginacées sont une famille très proche des Dioscoreacées (BURKILL, 1960), (cf tableau 1 p. 4).

2.3. - Recherche du niveau optimal de saccharose dans le milieu de callogenèse

L'effet de doses croissantes de saccharose (10 - 20 - 30 - 40 - 50 - 80 g/l) a été étudié sur des explants P1 du cultivar Brazo Fuerte (cf figure 9).

Il faut au moins 20 g/l de saccharose dans le milieu pour observer la callogenèse (cf figure 9).

Les cals initiés en présence de 50 et 80 g/l de saccharose se forment plus rapidement mais ils se nécrosent très vite : après 28 jours, les cals formés sur le milieu contenant 80 g/l de saccharose prennent une teinte grisâtre et cessent de se développer ; ceux initiés sur le milieu contenant 50 g/l de saccharose se nécrosent après 2 ou 3 repiquages sur le milieu ME.

L'optimum se situe donc vers 30 à 40 g/l. Ces doses permettent un pourcentage de callogenèse élevé et une bonne croissance des cals par la suite.

Des doses élevées de sucre au delà de 50 g/l semblent être associées à une sénescence précoce. L'étude cytologique (cf paragraphe 6.2 p.88) confirme cette observation. L'association d'une forte teneur en 2,4-D et d'une forte teneur en sucre semble responsable de ce phénomène.

Tableau 25 : Relation entre les niveaux codés des facteurs et les concentrations expérimentales des facteurs étudiés.

| Niveaux codés des facteurs | - α | - 1 | 0 | + 1 | + α |
|----------------------------|------------|------|------|------|------------|
| Facteurs | | | | | |
| X1 = 2,4-D en mg/l | 0,636 | 2,0 | 4,0 | 6,0 | 7,364 |
| X2 = Kin en mg/l | 0,154 | 0,5 | 1,0 | 1,5 | 1,841 |
| X3 = sac en g/l | 13,18 | 20,0 | 30,0 | 40,0 | 46,82 |

Tableau 26 : Résultats de l'influence du 2,4-D, de la Kinétine et du saccharose sur le pourcentage de callogenèse après 30 jours de pétioles P1 de D. alata cv Brazo Fuerte.

| Milieu | X1 | X2 | X3 | % de callogenèse |
|--------|------------|------------|------------|------------------|
| 1 | - 1 | - 1 | - 1 | 40 |
| 2 | + 1 | - 1 | - 1 | 45 |
| 3 | - 1 | + 1 | - 1 | 30 |
| 4 | + 1 | + 1 | - 1 | 20 |
| 5 | - 1 | - 1 | + 1 | 25 |
| 6 | + 1 | - 1 | + 1 | 85 |
| 7 | - 1 | + 1 | + 1 | 60 |
| 8 | + 1 | + 1 | + 1 | 95 |
| 9 | - α | 0 | 0 | 10 |
| 10 | + α | 0 | 0 | 75 |
| 11 | 0 | - α | 0 | 80 |
| 12 | 0 | + α | 0 | 85 |
| 13 | 0 | 0 | - α | 2 |
| 14 | 0 | 0 | + α | 90 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 95 |
| 16 | 0 | 0 | 0 | 85 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 90 |
| 18 | 0 | 0 | 0 | 95 |
| 19 | 0 | 0 | 0 | 85 |
| 20 | 0 | 0 | 0 | 80 |

2.4. - Etude de 3 facteurs à la fois : 2,4-D, kinétine et saccharose

On a réalisé un plan centré composé complet à 3 variables ($X_1 = 2,4-D$; $X_2 = \text{kinétine}$; $X_3 = \text{saccharose}$) testées à 5 niveaux. Le tableau 25 indique les concentrations expérimentales correspondant aux niveaux codés. Nous avons utilisé 50 explants par traitement. Les résultats obtenus sur les différents milieux sont notés au tableau 26.

Le modèle théorique suivant a pu être établi :

$$y = 123,0 + 12,4 X_1 - 3,3 X_2 + 27,4 X_3 + 2,7 X_1 X_2 + 7,5 X_1 X_3 + 2,3 X_2 X_3 - 12,5 X_1^2 - 2,4 X_2^2 - 14,9 X_3^2$$

L'adéquation au modèle a été vérifiée (cf tableau 27). Les courbes individuelles de réponse de chaque facteur sont représentées sur la figure 11. Les niveaux optimum des facteurs donnés par le plan centré composé sont : 40 g/l de saccharose, 5 mg/l de 2,4-D et 1 mg/l de kinétine ; mais les courbes de la figure 12 montrent que les niveaux de saccharose compris entre 30 et 45 mg/l, de 2,4-D entre 3 et 6 mg/l et de kinétine entre 0,1 et 1,7 permettent une bonne callogénèse (c'est-à-dire un pourcentage de callogénèse supérieur à 87 %).

3 - MILIEU OPTIMAL DE CALLOGENESE CHEZ LES QUATRE CULTIVARS

Nous avons fait quelques expériences de callogénèse chez les autres cultivars étudiés dans ce travail afin de comparer leurs conditions optimales de callogénèse à celle de Brazo Fuerte.

3.1. - Niveau optimal de 2,4-D pour la callogénèse d'explant P1

On a comparé les comportements des quatre cultivars sur une gamme de 2,4-D (de 0 à 12 mg/l) associé ou non à 1 mg/l de kinétine.

Les résultats (cf figures 13 à 16) montrent que pour toutes les variétés testées, l'optimum de 2,4-D se situe entre 2 et 6 mg/l. Dans tous les cas, en l'absence de kinétine, des racines se développent sur le cal ou sur l'explant. Pour des niveaux faibles en auxine (2,4-D = 0,5 ou 1,0 mg/l), la callogénèse est plus forte dans le milieu sans kinétine. Ce phénomène est plus marquée chez D. alata cv Brazo Fuerte que chez les autres cultivars.

Les courbes de réponse sont assez semblables chez les deux espèces et les seuils de réactions sont les mêmes, cependant chez D. trifida : les cals se développent plus lentement, et plus rarement que chez D. alata.

Tableau 27 : analyse de variance du modèle proposé

| Source de variation | | ddl |
|----------------------|---------------------------------------|-----|
| Ecart au modèle | $\Sigma (y_o - y_m)^2 = 2003,21$ | 10 |
| Erreur expérimentale | $\Sigma (y_c - \bar{y}_c)^2 = 484,14$ | 5 |
| Inadéquation | $\Delta = 1519,07$ | 5 |

$$F_{obs} = \frac{\text{inadéquation}}{\text{erreur expérimentale}} = 3,13 < F_{5/5} \text{ théorique}$$

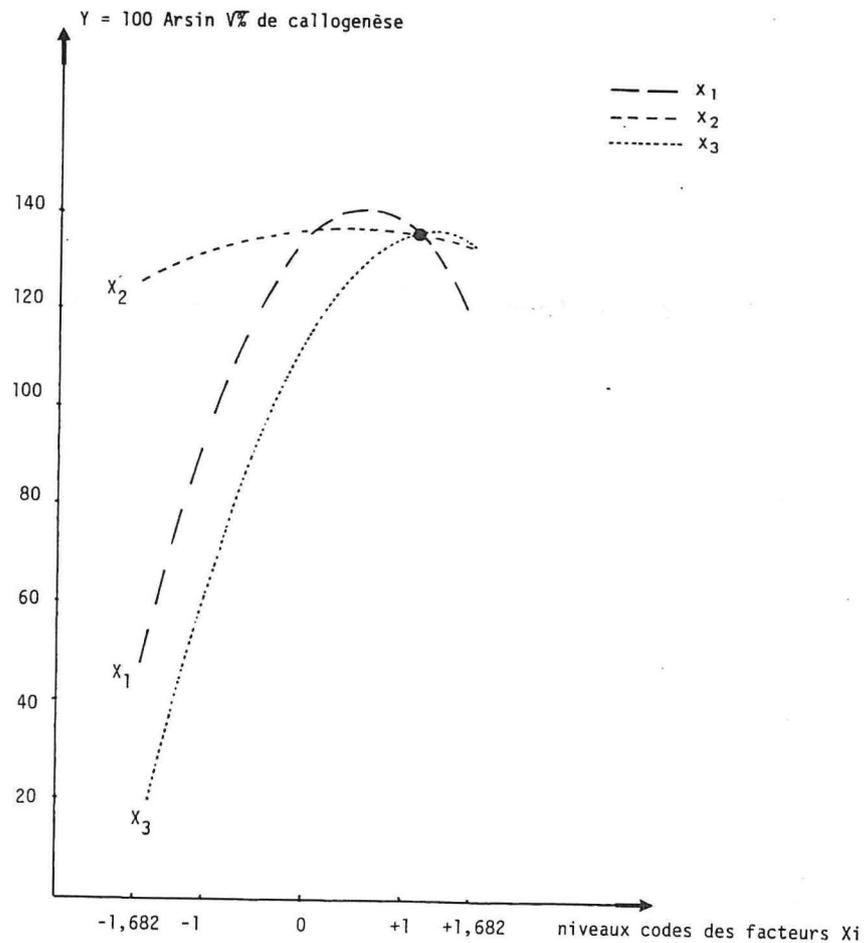


Figure 11 : Influence de la concentration du milieu en 2,4 D (X_1), kinetine (X_2) et saccharose (X_3) sur le % de callogenèse des pétioles PI de D. alata (les valeurs de Y sont calculées en fonction des variations de X_i , les deux autres variables étant à l'optimum).

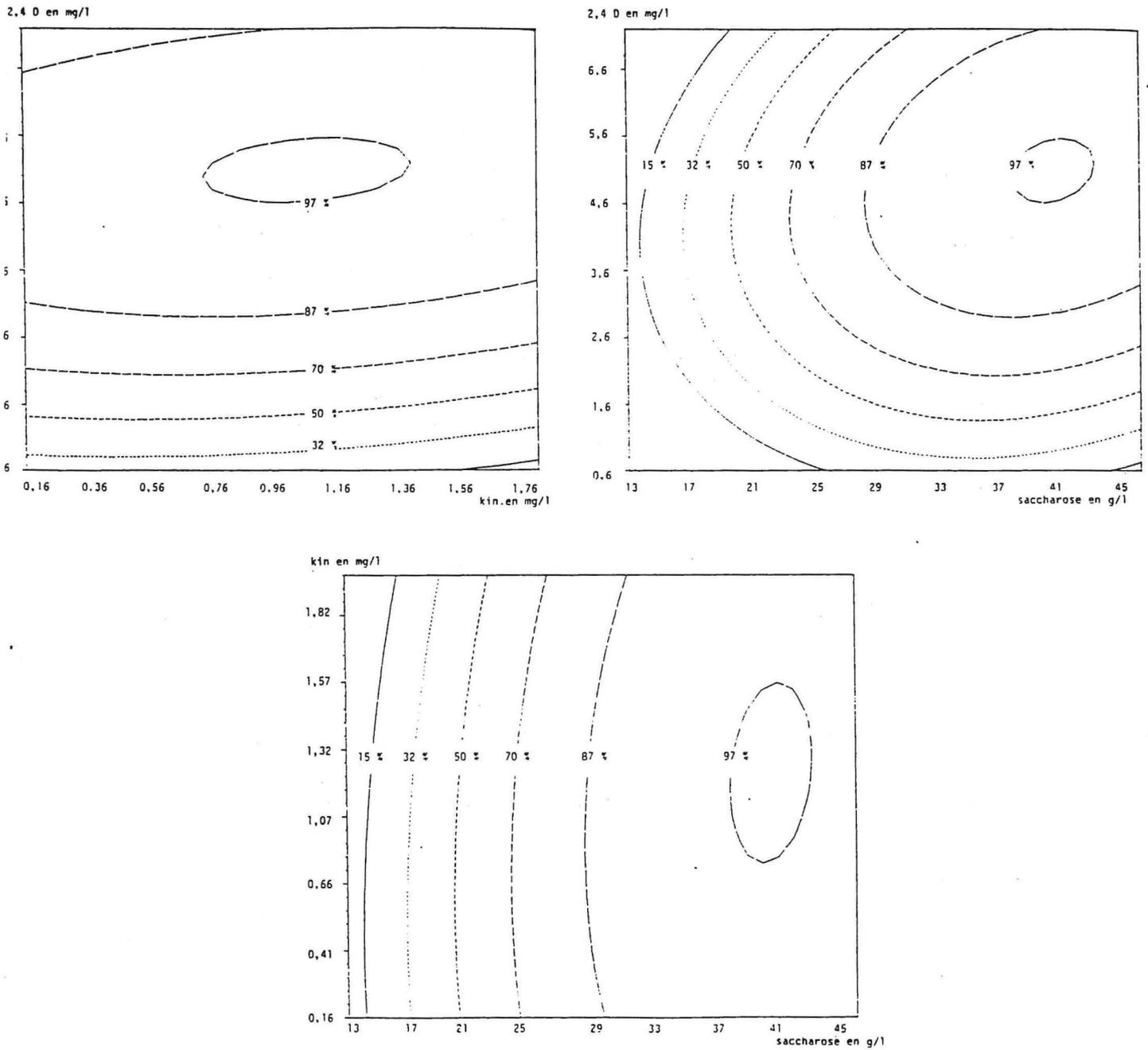


FIGURE 12 : Influence du 2,4-D, de la kinétine et du saccharose sur le pourcentage de callogenèse de pétiole P1 de Dioscorea alata cv Brazo Fuerte.

Pourcentage de callogénèse à 40 jours

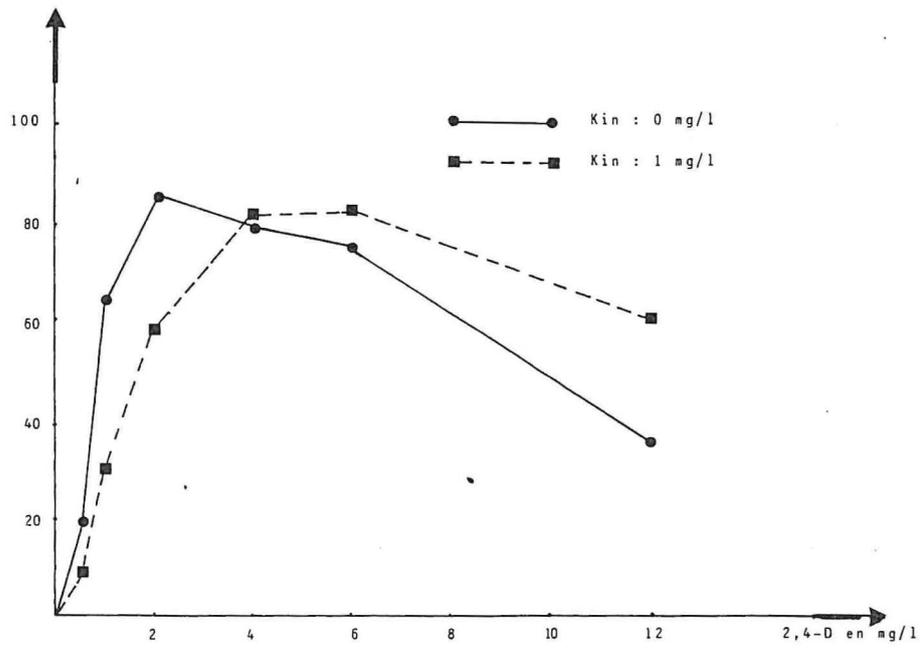


FIGURE 13 : Influence de la concentration 2,4-D sur le pourcentage de callogénèse d'explants Pl de D. alata cv Brazo Fuerte.

Pourcentage de callogénèse à 40 jours

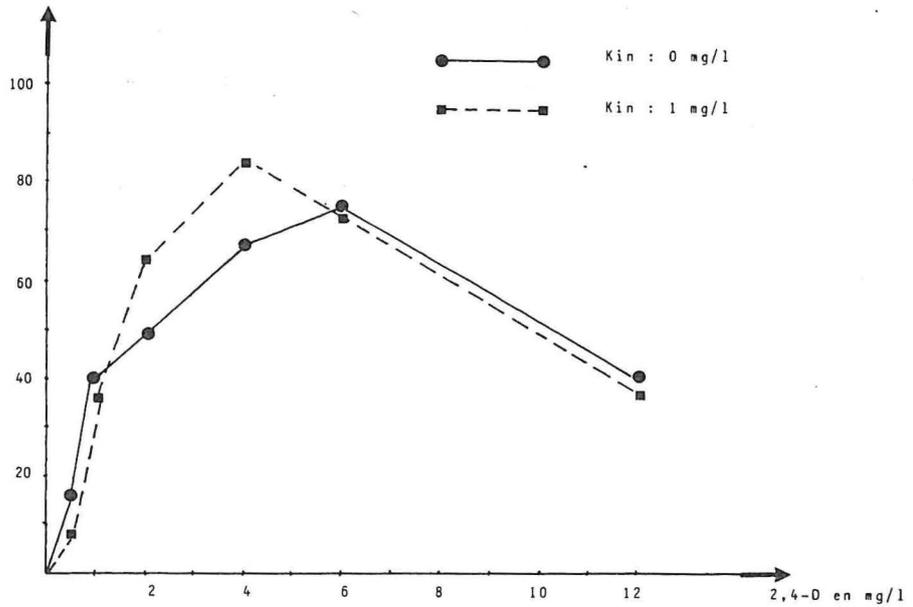


FIGURE 14 : Influence de la concentration en 2,4-D sur le pourcentage de callogénèse d'explants Pl de D. alata cv Florida.

Pourcentage de callogenèse à 50 jours

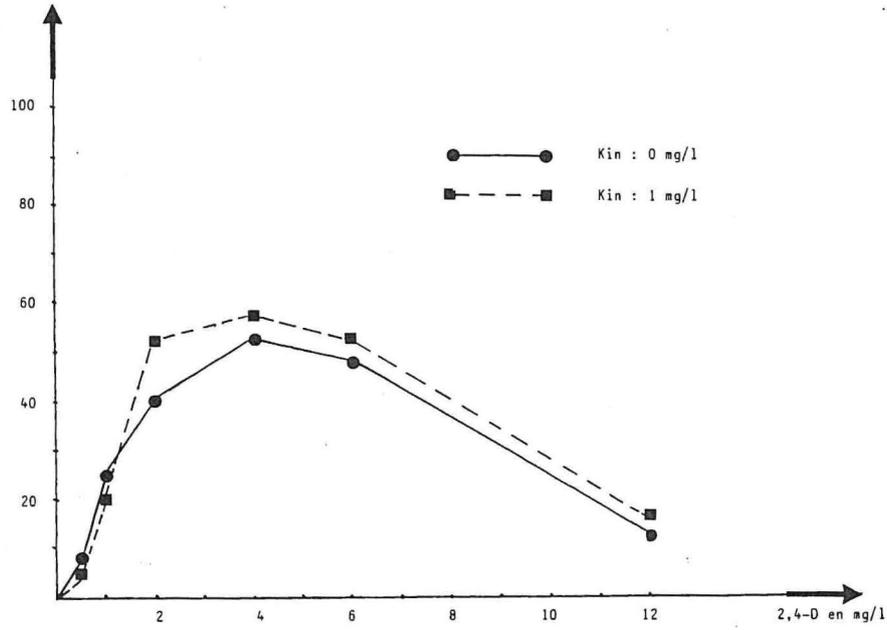


FIGURE 15 : Influence de la concentration en 2,4-D sur le pourcentage de callogenèse d'explants P1 de D. trifida cv Moengo V.

Pourcentage de callogenèse à 50 jours

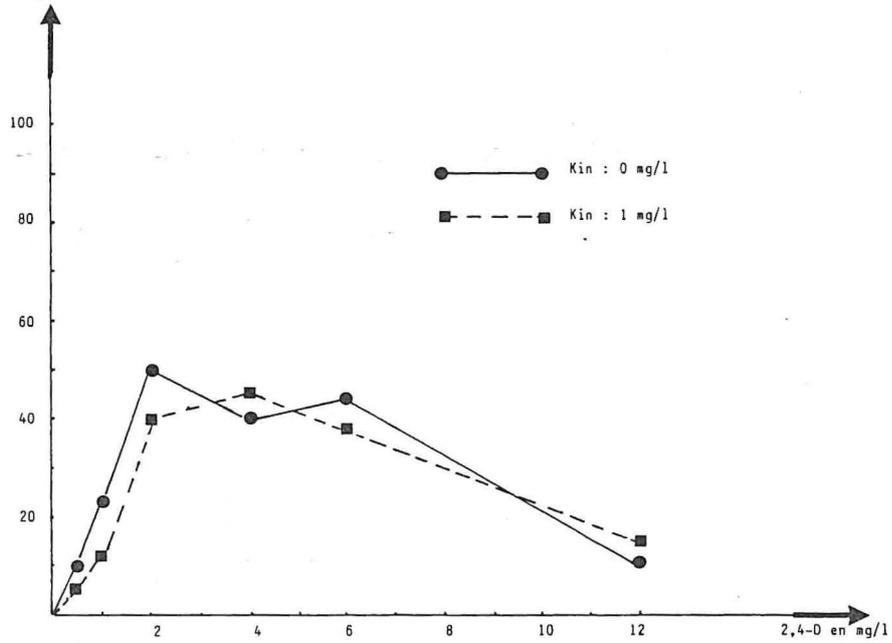


FIGURE 16 : Influence de la concentration en 2,4-D sur le pourcentage de callogenèse d'explants P1 de D. trifida cv INRA 5-20.

Des explants P1 de D. alata (figures 13 et 14) et de D. trifida (figures 15 et 16) ont été placés sur le milieu MB + sac 30 g/l + 2,4-D (0 à 12 mg/l) + kin (0 et 1 mg/l). 2 répétitions de 25 explants par traitement ont été faites.

TABLEAU 28 : Relation entre les niveaux codés des facteurs et les concentrations expérimentales.

| Facteurs \ Niveaux codés des facteurs | - 1 | 0 | + 1 |
|---------------------------------------|--------------------|------|-----|
| | X1 = 2,4-D en mg/l | 2,0 | 4,0 |
| X2 = Kin en mg/l | 0,5 | 1,25 | 2,0 |
| X3 = sac en g/l | 30 | 50 | 70 |

TABLEAU 29 : Influence du 2,4-D, de la Kinétine et du saccharose sur le pourcentage de callogenèse après 50 jours d'explants Pl de D. trifida cv MOENGO V et INRA 5-20.

| Milieu | X1 | X2 | X3 | % de callogenèse chez | |
|--------|-----|-----|-----|-----------------------|----------|
| | | | | INRA 5-20 | MOENGO V |
| 1 | - 1 | - 1 | - 1 | 0,75 | 0,85 |
| 2 | + 1 | - 1 | - 1 | 0,56 | 0,67 |
| 3 | - 1 | + 1 | - 1 | 0,85 | 0,80 |
| 4 | + 1 | + 1 | - 1 | 0,80 | 0,56 |
| 5 | - 1 | - 1 | + 1 | 0,45 | 0,60 |
| 6 | + 1 | - 1 | + 1 | 0,35 | 0,50 |
| 7 | - 1 | + 1 | + 1 | 0,40 | 0,46 |
| 8 | + 1 | + 1 | + 1 | 0,30 | 0,60 |
| 9 | 0 | 0 | 0 | 0,35 | 0,36 |
| 10 | 0 | 0 | 0 | 0,40 | 0,40 |
| 11 | 0 | 0 | 0 | 0,35 | 0,48 |
| 12 | 0 | 0 | 0 | 0,45 | 0,36 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 0,30 | 0,44 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 0,35 | 0,48 |

3.2. - Etude simultanée des trois facteurs 2,4-D, kinétine saccharose chez D. trifida

Afin d'étudier 3 facteurs à la fois nous avons réalisé un plan factoriel à 2 niveaux sur des explants P1 de D. trifida cv Moengo V et INRA 5-20. Nous avons utilisé 50 explants par traitement. Le tableau 28 indique les concentrations expérimentales correspondant aux niveaux codés. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 29. On peut en déduire que le facteur kinétine dans l'intervalle testé (0,5 à 2,0) ainsi que le 2,4-D (entre 2 et 4 mg/l) ont une faible influence sur le pourcentage de callogenèse contrairement au sucre. Les niveaux 70 g/l et 50 g/l sont trop élevés pour toutes les concentrations de kinétine et de 2,4-D avec lesquelles ils sont associés. Ils provoquent la formation de cals hyperhydriques qui se nécrosent très vite comme dans le cas de D. alata.

Afin de préciser l'optimum de ces 3 facteurs, nous avons fait un plan centré composé complet mais nous n'avons pas obtenu d'adéquation au modèle et les résultats ne sont donc pas interprétables.

3.3. - Influence du milieu minéral

Nous avons voulu vérifier si la nature du milieu minéral utilisé (le milieu MS) n'était pas responsable du faible niveau de réponse observé chez D. trifida : les milieux MS et N30 K (MARGARA, 1978) ont été expérimentés chez D. alata et D. trifida. Le milieu N30K qui contient 30 millimoles d'azote est moins riche en azote que le milieu MS qui en contient 60 millimoles (cf tableau 5 p 26). Les résultats (cf tableau 30) montrent que ces deux milieux ne donnent pas des pourcentages de callogenèse significativement différents sauf pour D. alata où le milieu de callogenèse MS + 2,4-D 4 mg/l + Kin 1 mg/l + sac 30 g/l s'est révélé significativement meilleur que le milieu N30K avec la même combinaison hormonale.

3.4. - Discussion

La callogenèse d'explants P1 présente des variations importantes suivant l'espèce et la variété.

- Les cals de l'espèce D. alata se développent rapidement, au contraire, ceux de D. trifida croissent lentement. Ceci pourrait être lié à la vigueur des lianes au champ : D. alata présente un grand développement végétatif alors que D. trifida a une croissance réduite. Ce même phénomène se retrouve dans le microbouturage in vitro : le taux de multiplication de D. alata est d'environ X 3 en 2 mois (trois boutures peuvent être prélevées à partir d'une bouture) et celui de D. trifida est de X 3 en 4 mois (d'après des observations faites sur le milieu M50).

TABLEAU 30 : Influence du milieu minéral sur le pourcentage de callogenèse d'explant P1 de D. alata cv Brazo Fuerte

| MACROELEMENTS HORMONES en mg/l | D. ALATA | | D. TRIFIDA | | | |
|--------------------------------------|----------|----------|-------------|----------|--------------|----------|
| | MS | N 30K | cv Moengo V | | cv INRA 5-20 | |
| | | | MS | N 30K | MS | N 30K |
| 2,4-D 5mg/l Kin 1mg/l | 90 % | D S 60 % | 38 % | DNS 44 % | 62 % | DNS 48 % |
| ANA 5 BAP 1mg/l | 16 % | DNS 20 % | 68 % | DNS 78 % | 50 % | DNS 50 % |

augmentation relative du poids frais après 28 jours

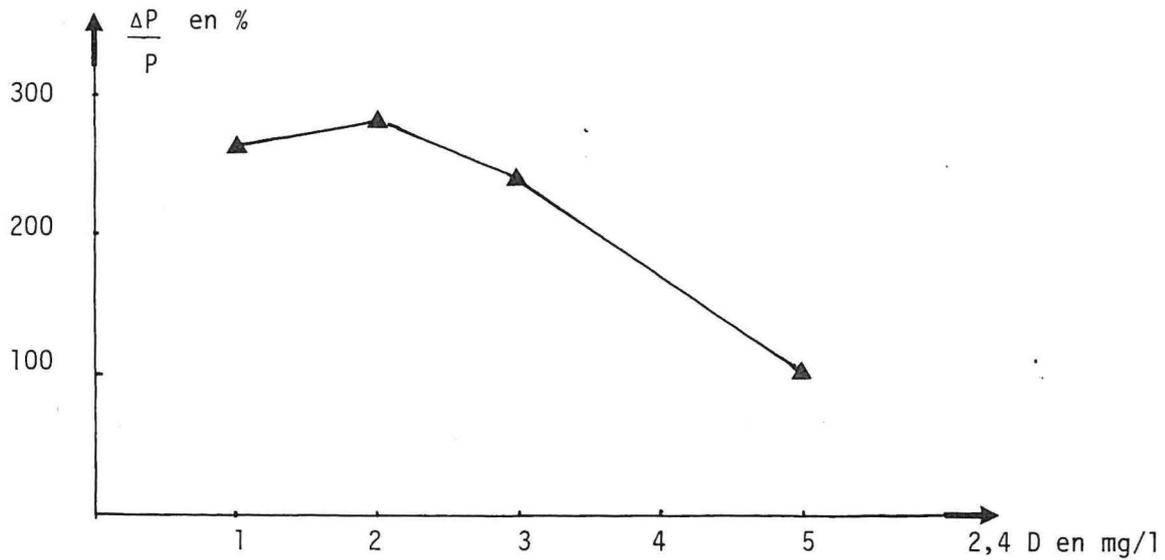


Figure 18 : Influence de la teneur en 2,4 D sur la croissance pondérale des cals de pétiole P1 de Dioscorea alata.

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

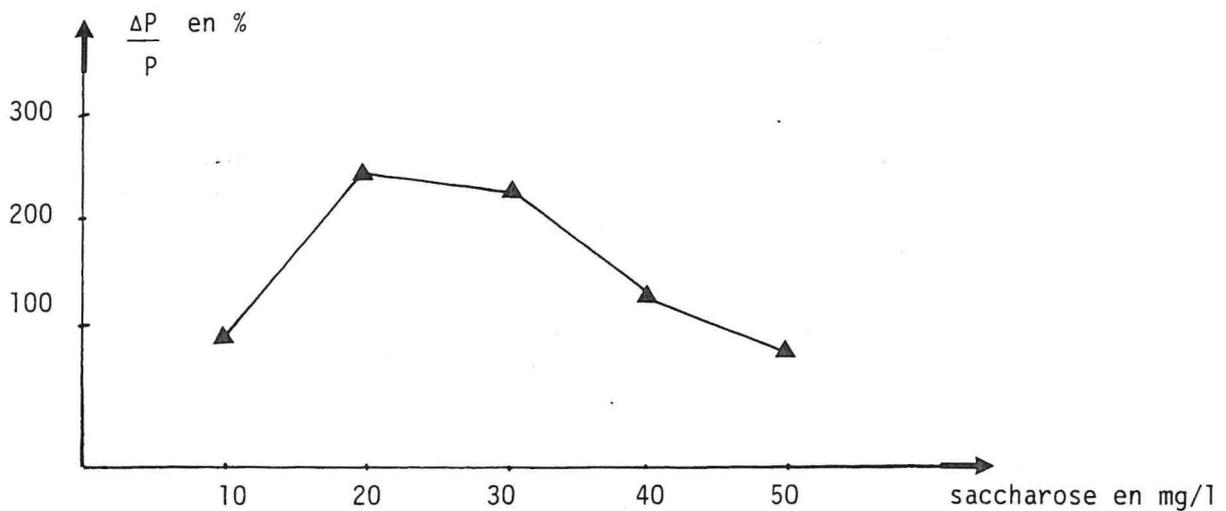


Figure 19 : Influence de la teneur en saccharose sur la croissance pondérale des cals de pétiole P1 de Dioscorea alata.

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.

4 - CHOIX D'UN MILIEU POUR LA CROISSANCE DES CALS

4.1. - Croissance de l'ensemble du cal et de l'explant initial

Après une phase de callogenèse de 30 jours, des explants P1 du cv Brazo Fuerte ont été transférés sur différents milieux d'entretien.

Plusieurs concentrations en 2,4-D (de 0,5 à 5 mg/l) et en saccharose (de 10 à 50 g/l) ont été expérimentées et l'augmentation relative du poids de matière fraîche a été mesurée. Les résultats (cf figures 18 et 19) montrent que le 2,4-D entre 1 et 3 mg/l et le saccharose entre 20 et 30 g/l permettent une bonne croissance du cal.

4.2. - Croissance du cal séparé de l'explant initial

L'influence de diverses concentrations en saccharose sur des cals séparés de l'explant initial a été étudiée. Les résultats (cf figure 20) montrent que le niveau optimum de saccharose se situe entre vers 20 et 30 g/l (la différence n'est pas significative).

ABROSHNIKOVA et al. (1971) avaient noté une moins bonne croissance des cals de D. deltoidea en présence de 50 g/l de saccharose par rapport au milieu témoin qui en contenait 30 g/l. Par contre TAL et GOLDBERG (1982) ont observé, chez D. deltoidea également une augmentation linéaire de la croissance cellulaire (évaluée en poids de matière sèche) entre 20 et 60 g/l de saccharose. Nos résultats précisent ceux d'ABRASHNIKOVA et al, par contre ils sont totalement différents de ceux de TAL et GOLDBERG. Une explication pourrait être qu'un niveau élevé de sucre provoque la synthèse d'amidon et de substance de réserve qui influencent plutôt le poids sec que le poids frais (GAUTHERET, 1959). Ces accumulations augmentent le poids de matière sèche mais ne mesurent pas la prolifération cellulaire.

4.3. - Conclusion

La mesure du poids de matière fraîche des cals n'est peut être pas le meilleur critère de croissance des cals. Il faudrait également étudier l'azote protéique. Cependant nous avons noté que les cals qui croissaient lentement à des niveaux élevés de sucre et de 2,4-D prenaient une teinte grisâtre et se nécrosaient progressivement. Au contraire, ceux qui croissaient rapidement gardaient un aspect sain.

Le milieu ME que nous avons choisi (ME + sac 30 g/l + 2,4-D 2 mg/l + Kin 0,5 mg/l) permet une bonne croissance des cals de D. alata cv Brazo Fuerte avec et sans explant initial. Des expériences non mentionnés dans ce chapitre nous ont montré qu'il

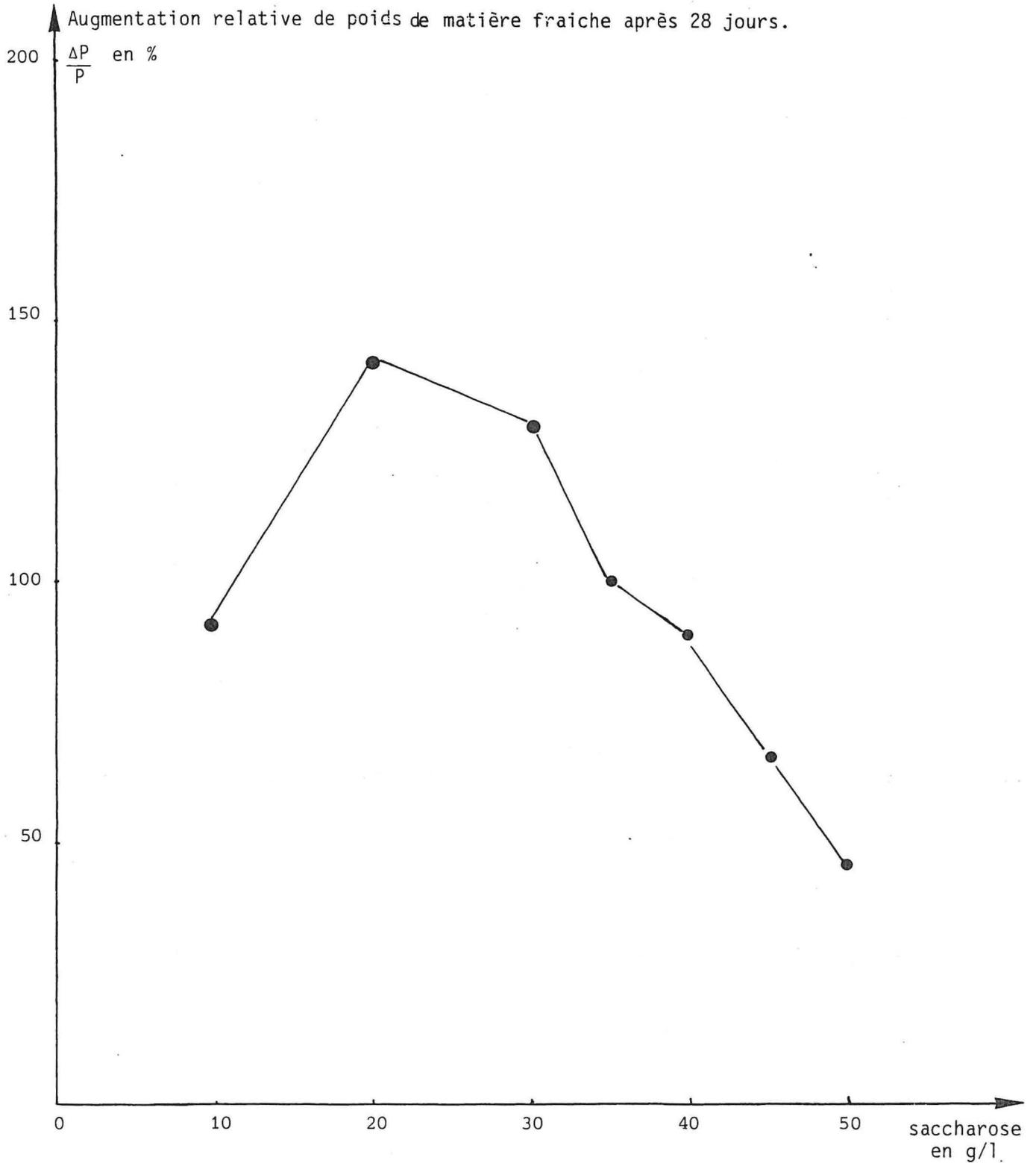


Figure 20 : Influence de la teneur en saccharose sur la croissance pondérale des cals de pétiole P1 de Dioscorea alata isolés de l'explant initial.

Des cals d'explants P1 de *D. alata* cv Brazo Fuerte initié, sur le milieu MC et entretenus sur le milieu ME ont été placés sur le milieu MB + 2,4-D 2 mg/l + kin 0,5 mg/l + sac (10 - 20 - 30 - 35 - 40 - 45 - 50 g/l). Nous avons utilisé 30 explants par traitement.

TABLEAU 31 : Influence de la température sur le pourcentage de callogenèse d'explant P1 de D. alata et D. trifida.

| Températures | | 25° | 27° | 30° |
|-----------------------------|---|------|------|------|
| cv | | | | |
| D. alata cv Brazo Fuerte | MB + ANA 5 Kin 1mg/l sac 30 g/l | 35 % | 66 % | 42 % |
| | MC | 67 % | 97 % | 83 % |
| D. trifida Moengo V | MB + ANA 5 mg/l Kin 1 mg/l sac 30 g/l | 0 % | 42 % | 83 % |
| | MC | 0 % | 48 % | 92 % |

Des explants P1 de D. alata cv Brazo Fuerte et D. trifida cv Moengo V ont été placés sur les milieux de callogenèse MC et MB + sac 30 g/l + kin 1 mg/l + ANA 5 mg/l.

TABLEAU 32 : Influence de la température sur la croissance pondérale des cals d'explant P1 de D. alata cv Brazo Fuerte.

| Température en °C | | 25° | 27° | 30° |
|---|--|--------|---------|---------|
| Poids en mg | | | | |
| Poids initial en mg | | 9,8 | 9,1 | 8,7 |
| (σ n) | | (2,7) | (2,5) | (2,4) |
| Poids en mg de l'ensemble cal + explant initial | | 49,7 | 120,5 | 68,1 |
| (σ n) | | (14,4) | (55,3) | (39,2) |
| Poids en mg de l'ensemble cal + explant initial après 60 jours | | 103,7 | 309,9 | 184,1 |
| (σ n) | | (36,6) | (214,5) | (139,8) |

Des explants P1 de D. alata cv Brazo Fuerte ont été placés sur le milieu de callogenèse MB + 2,4-D 3 mg/l + kin 0,5 mg/l + sac 30. Ils ont été reniqués sur le même milieu après 30 jours. Nous avons utilisé 24 explants par traitement. Cette expérience a été menée en tube. On a mesuré le poids de matière fraîche des explants initiaux et de l'ensemble cal + explant initial après 30 jours et 60 jours. Le milieu employé ici a permis à la fois l'initiation et l'entretien du cal.

permet également la croissance des cals de D. alata cv Brazo Fuerte et D. trifida cv INRA 5-20 et Moengo V.

Nous n'avons pas cherché à optimiser ce milieu, notre but n'étant pas la recherche d'un milieu de croissance rapide des cals. En effet, il ne semble pas y avoir de corrélation entre la rapidité de croissance du cal et son aptitude à l'organogenèse. Dans certains cas au contraire, les cals à croissance rapide ne sont pas organogènes (CHATURVEDI et al., 1974).

5 - INFLUENCE DES FACTEURS PHYSIQUES SUR LA CALLOGENÈSE ET LA CROISSANCE DES CALS

5.1. - Influence de la température

5.1.1. - Influence de la température sur la callogenèse

L'influence de trois températures : 25, 27 et 30° C + 1° C sur le pourcentage de callogenèse a été étudiée chez D. alata et D. trifida. Les résultats du tableau 31 montrent que si la température de 27° C semble optimale pour la callogenèse de D. alata, elle est nettement sous optimale pour la callogenèse de D. trifida qui s'exprime beaucoup mieux à 30° C. Cependant même à 30° C la callogenèse de D. trifida est plus lente que celle de D. alata. Malheureusement, dans la suite de ce travail, les expériences ont été menées à 27° C pour des raisons pratiques. Il est possible que les faibles résultats de la callogenèse et de la néoformation chez D. trifida puissent être partiellement attribués à un besoin d'une température plus élevée que 27° C.

5.1.2. - Influence de la température sur la croissance des cals

On a mesuré l'influence de la température sur l'augmentation du poids de matière fraîche d'explants Pl. Les résultats du tableau 32 confirment que, chez D. alata cv Brazo Fuerte, la température de 27° C + 1° C est optimale. Les écarts-types très élevés des résultats après 60 jours sont dus au fait que quelques explants de l'échantillon de départ n'ont pas initié de cal, leurs poids a donc peu évolué comparativement à l'ensemble des autres. Cependant l'observation des cals et la moyenne de leur poids indiquent clairement qu'ils se développent mieux à 27° C.

5.2. - Influence de la lumière

Le but de cette expérience était d'étudier l'influence de la lumière sur la callogenèse mais également le noircissement du milieu. Des observations antérieures semblaient montrer que le niveau de cytokinine et de sucre dans le milieu ainsi que la lumière intervenaient dans le phénomène de rejet de substances colorées. Celles-ci seraient dues à l'oxydation des composés

TABLEAU 33 : Relation entre les niveaux codés des facteurs et les conditions expérimentales.

| Niveaux codés des facteurs | - 1 | 0 | 1 |
|----------------------------|-----------|----|---------|
| X 1 = saccharose | 20 | 30 | 40 |
| X 2 = Kin | 0,5 | 1 | 1,5 |
| X 3 = lumière | Obscurité | - | Lumière |

TABLEAU 34 : Influence du saccharose, de la Kinétine et de la lumière sur le pourcentage de callogenèse et sur le noircissement du milieu au cours de la callogenèse d'explant P1 de D. alata cv Brazo Fuerte.

| Milieu | X1 | X2 | X3 | % de callogenèse | Noircissement du milieu |
|--------|-----|-----|-----|------------------|-------------------------|
| 1 | - 1 | - 1 | - 1 | 9 % | 1,5 |
| 2 | + 1 | - 1 | - 1 | 22 % | 1,5 |
| 3 | - 1 | + 1 | - 1 | 3 % | 1,2 |
| 4 | + 1 | + 1 | - 1 | 50 % | 1,5 |
| 5 | - 1 | - 1 | + 1 | 16 % | 1,5 |
| 6 | + 1 | - 1 | + 1 | 25 % | 2,0 |
| 7 | - 1 | + 1 | + 1 | 6 % | 1,6 |
| 8 | + 1 | + 1 | + 1 | 75 % | 1,4 |
| 9 | 0 | 0 | + 1 | 50 % | 1,4 |
| 10 | 0 | 0 | + 1 | 53 % | 1,8 |
| 11 | 0 | 0 | + 1 | 56 % | 1,6 |
| 12 | 0 | 0 | + 1 | 62 % | 1,5 |
| 13 | 0 | 0 | + 1 | 60 % | 1,2 |
| 14 | 0 | 0 | + 1 | 58 % | 2,4 |

Des explants P1 de D. alata ont été soumis aux différentes conditions expérimentales indiquées dans les tableaux 33 et 34 . La callogenèse a été évaluée à 30 jours . 30 explants par traitement ont été utilisés. Le noircissement du milieu a été noté de 0 à 4, les chiffres indiqués dans le tableau correspondent à une moyenne sur 10 boîtes de Pétri (3 explants par boîtes).

phénoliques et auraient un effet toxique (CHEVRE, 1985). La lumière agit sur certaines enzymes intervenant dans le métabolisme des composés phénoliques et favorise le rejet de composés phénoliques oxydés (DURAND-CRESSWELL et NITSCH, 1977).

Un plan factoriel à 2 niveaux a été réalisé à partir d'explants P1 de D. alata cv Brazo Fuerte. Le tableau 33 indique les conditions expérimentales correspondant aux niveaux codés. Nous avons étudié 3 facteurs à la fois : le saccharose (X1), la kinétine (X2) et la lumière (X3) avec le milieu MB + sac 2,4-D 4mg/l. Les résultats du tableau 34 montrent que le noircissement est à peu près le même dans tous les traitements. Ainsi, ni le saccharose ou la kinétine aux doses testées, ni la présence ou l'absence de lumière n'influence significativement le noircissement du milieu. Par contre, la lumière semble avoir une influence positive sur le pourcentage de callogenèse mais la différence n'est significative que dans un des traitements et pour des raisons pratiques les expériences de callogenèse ont toutes été menées à l'obscurité.

6 - ETUDE CYTOLOGIQUE DE LA CALLOGENESE

6.1. - Etude de la callogenèse sur milieu MC

Des explants P1 de D. alata cv Florido ont été placés sur le milieu de callogenèse MC et des coupes cytologiques ont été faites sur l'explant initial et après 5, 10, 15, 20 et 40 jours de callogenèse. Ces coupes montrent que l'explant initial ne contient pas de méristèmes primaires ni secondaires et que le cal se développe à partir des cellules périvasculaires (cf photos 11 à 16). Après 20 jours sur le milieu de callogenèse, on observe la désorganisation de l'explant initial et la multiplication des cellules à partir des restes de vaisseaux libero ligneux. Des coupes de cals après 40 jours sur le milieu MC montrent une structure peu organisée formée de petites cellules en division (cf photos 17 et 18).

La même étude menée sur le cultivar Brazo Fuerte montre que le cal se développe également à partir des cellules périvasculaires.

6.2. - Etude de la callogenèse sur milieux riches en saccharose et en 2,4-D

Des explants P1 de D. alata cv Brazo Fuerte ont été placés sur le milieu MB + saccharose 50 g/l + 2,4-D 5 mg/l + kin 1 mg/l. Des coupes ont été faites à 10, 20 et 30 jours. Elles montrent un gonflement des cellules du parenchyme corticale sans que la structure interne de l'explant soit profondément modifiée. L'augmentation de volume de l'explant initial qui correspond à un cal soufflé hyperhydrique peut s'expliquer par le gonflement isodiamétrique des cellules contenues dans l'explant initial et non par une prolifération cellulaire. Les photos 19 et 20 montrent l'aspect dégénéré de ce cal après 30 jours.

PHOTO 11 : explant P1 de *D. alata* cv Florido (G : x 50)

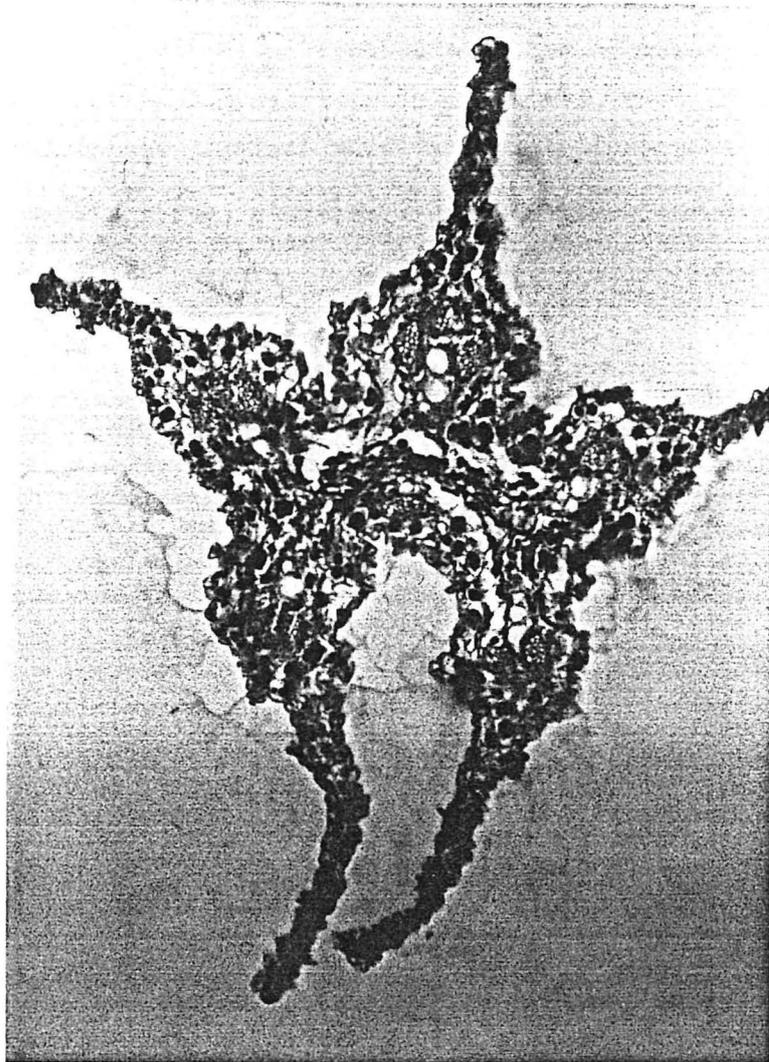


PHOTO 12 : vaisseau libero ligneux de l'explant P1 (G x 120)

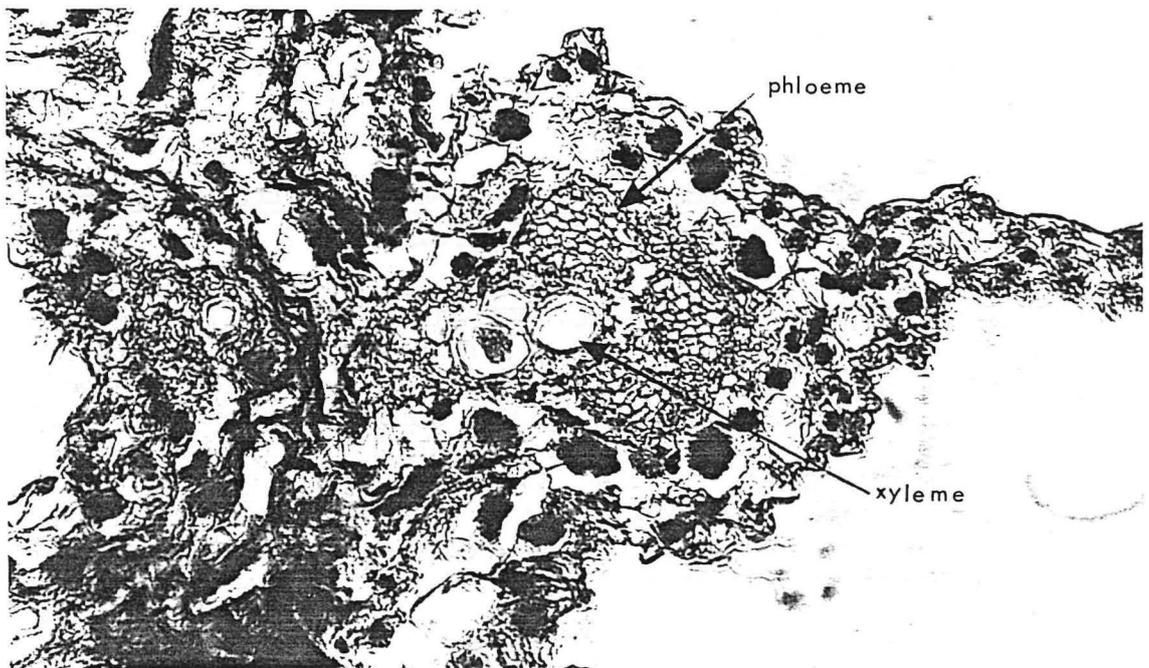


PHOTO 13 : Explant P1 après un passage de 10 jours sur le milieu MC
(G: x 50)

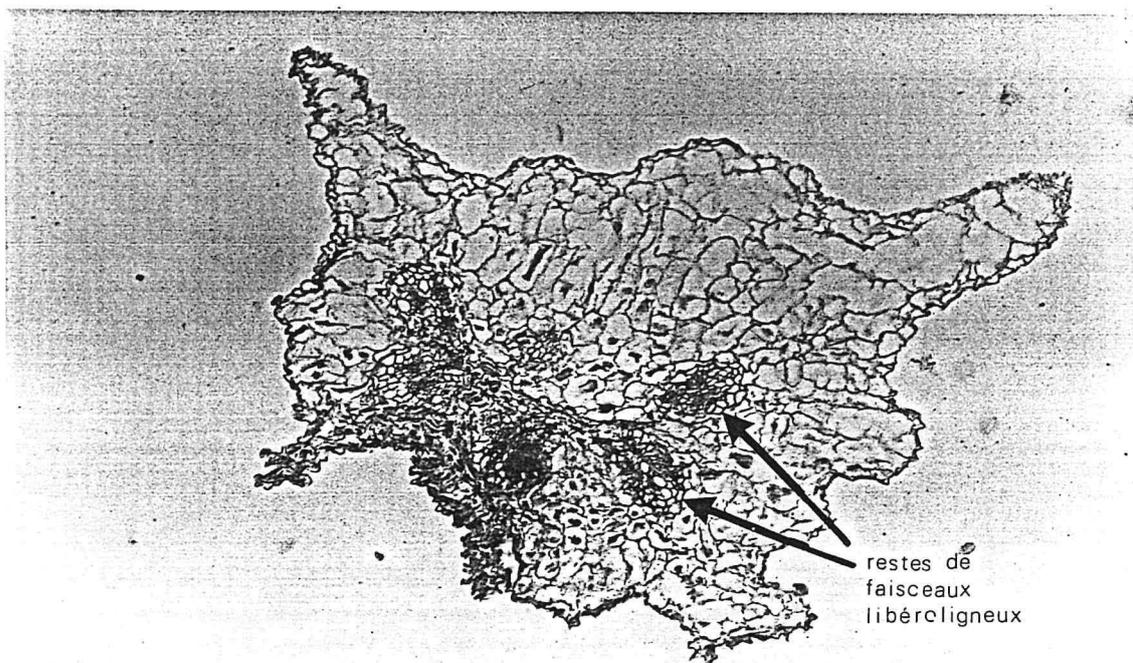


PHOTO 14 : Explant P1 après un passage de 15 jours sur le milieu MC
(G : x 50)

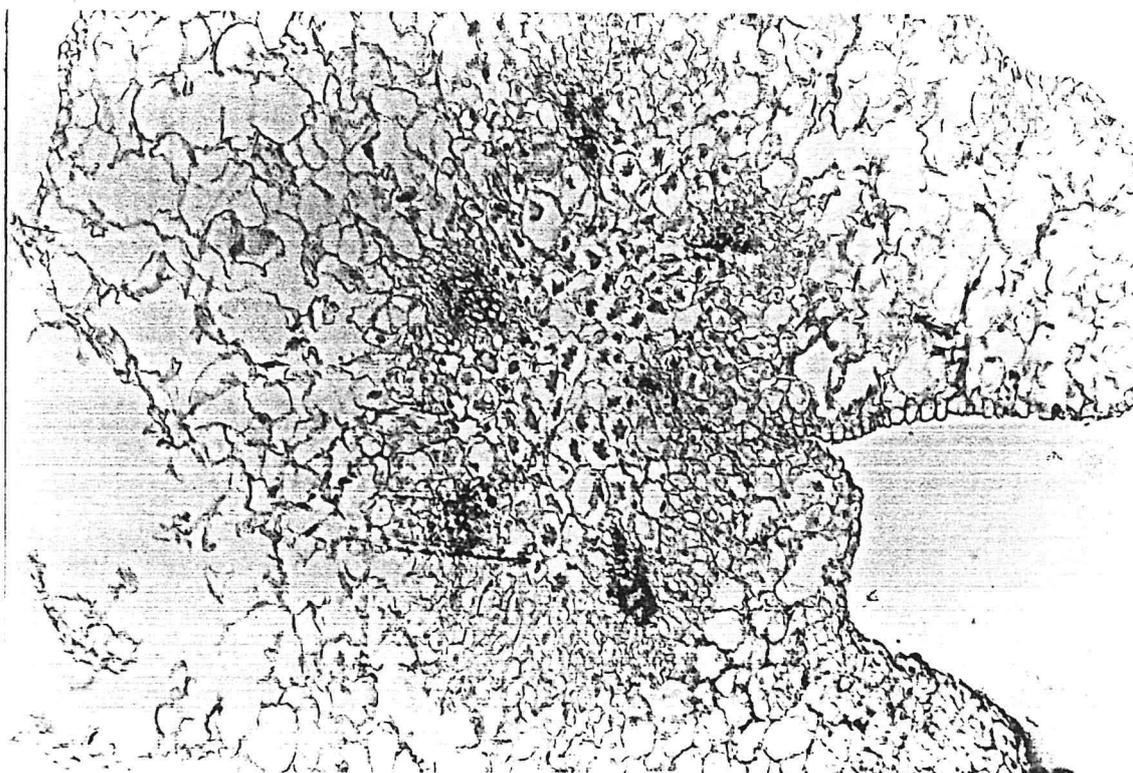


PHOTO 15 : Début de callogenèse après 20 jours (G : x 50)

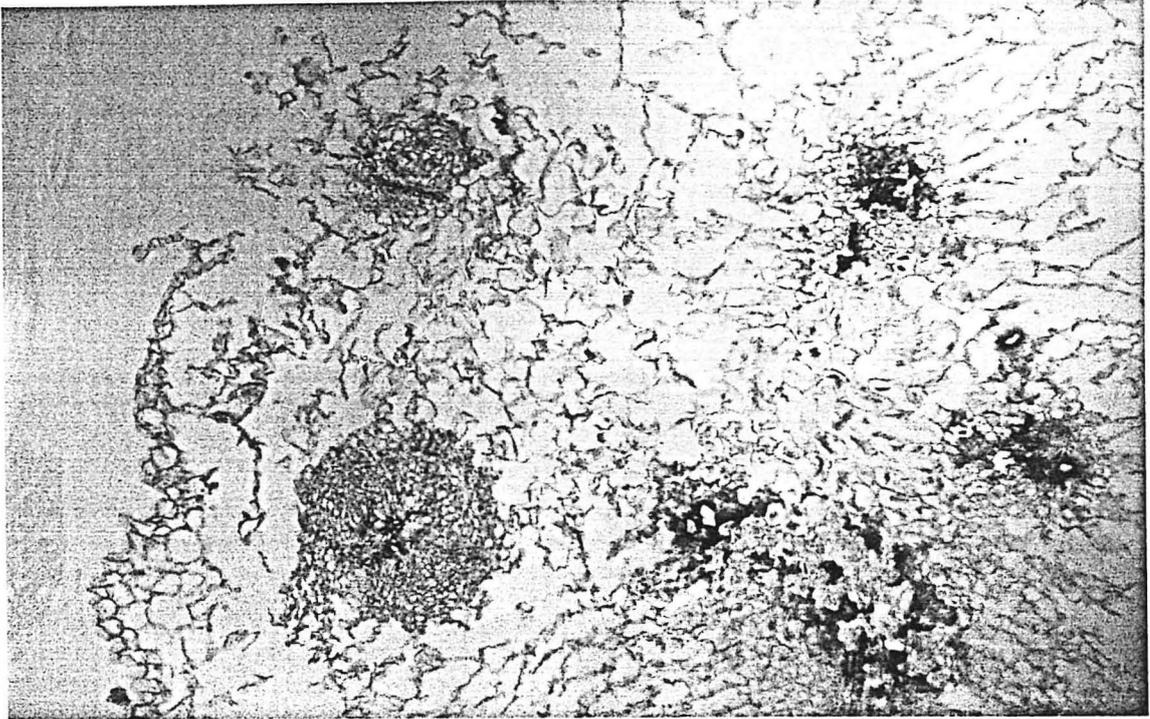
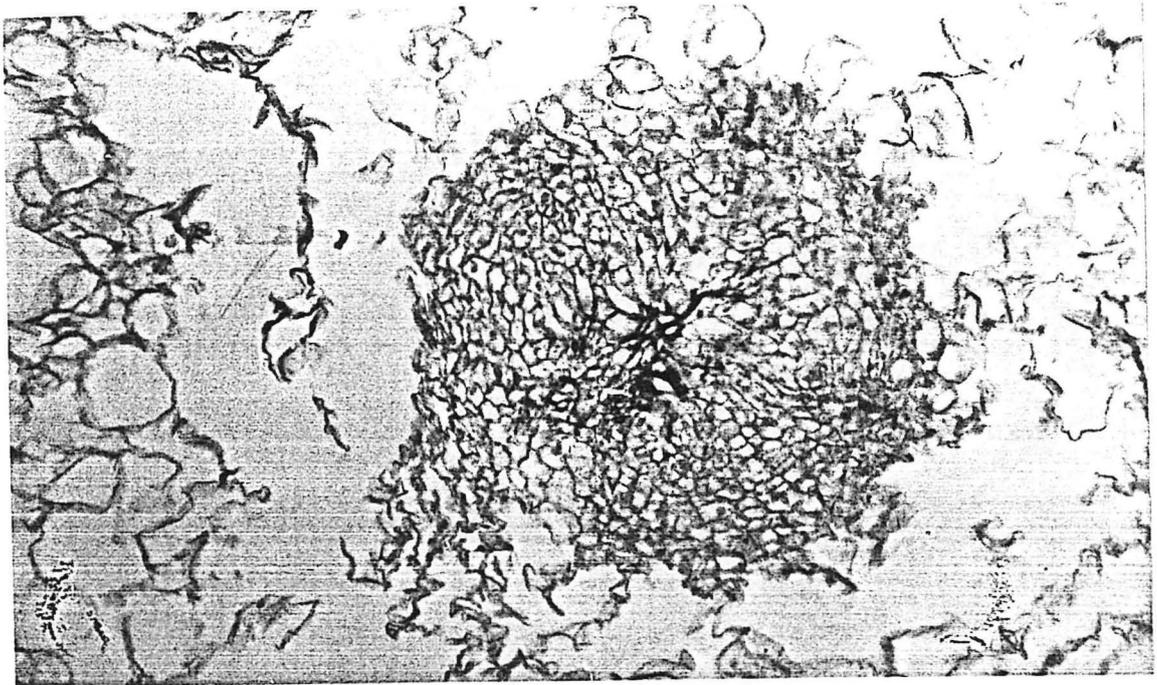


PHOTO 16 : Détail d'un nodule (G x 120)



Des explants P1 du cv Florido ont été placés sur le milieu MC. Après 20 jours, des coupes ont été faites dans la région du départ des nervures où se développe un cal visible.

Cette observation confirme les mauvais résultats obtenus pour l'initiation et l'entretien des cals avec les milieux riches en saccharose associés à de fortes teneurs en 2,4-D.

6.3. - Discussion

Le 2,4-D à des doses élevées provoque l'hyperhydrie des cellules (GAUTHERET, 1959) et nous avons effectivement observé que la première réaction des explants P1 de D. alata placés sur milieu riche en 2,4-D est une augmentation de volume des cellules du parenchyme cortical. Si la concentration en saccharose est forte (50 g/l) le gonflement des cellules est intense alors que la multiplication cellulaire est très réduite, les cellules sont hypertrophiées avec une grosse vacuole centrale et elles tendent à se séparer les unes des autres. Si la concentration en sucre est plus faible, la prolifération des cellules périvasculaires est activée au bout d'une vingtaine de jours et le passage des cals après 4 semaines sur le milieu ME, moins riche en 2,4-D réduit la réaction hyperhydrique.

Aucune étude cytologique de la callogenèse n'a été publiée à notre connaissance sur les Dioscoreae mais il en existe sur des familles proches : HUNAUULT (1979 d) note que les besoins en hormones de croissance des cals dépendent du tissu dont ils proviennent. Ainsi les cals issus des parenchymes libérien peuvent se former en présence d'auxine seule (cas des fragments de tige de Sanseveria et Dracaena) tandis que ceux issus des parenchymes corticaux et médullaires nécessitent l'association d'une auxine et d'une cytokinine (cas des cals issus de fragments d'entre-nœuds d'asperge). Nous avons également pu constater que les cals de pétiole de D. alata qui sont issus des parenchymes entourant les faisceaux libéro ligneux peuvent se développer en l'absence de cytokinine. Dans ce cas, les explants présentent à la fois une prolifération cellulaire de l'organogenèse de racines et des réactions hyperhydriques sur le milieu de callogenèse. Ceci rappelle les travaux de GAUTHERET (1959) qui avait mis en évidence que l'induction de cals et de racines ainsi que la transformation hyperhydrique étaient provoquées par les auxines et que les trois phénomènes pourraient se produire simultanément (par exemple chez Parthenocissus quinquefolia).

7 - CONCLUSION

Les différentes expériences que nous avons réalisées nous ont permis de cerner les conditions de callogenèse d'explants P1 : nous avons retenu le milieu MB + 2,4-D 5 mg/l + kin 1 mg/l + saccharose 30 g/l (appelé milieu MC). Nous avons choisi un niveau légèrement sous optimal de sucre en raison de la réaction hyperhydrique indésirable que nous avons observé en présence de niveaux élevés d'auxine et de saccharose. Mais nous avons gardé de fortes concentrations en 2,4-D et kinétine. En effet l'objet de notre étude est de mettre au point les conditions de culture in

in vitro des cals en vue d'obtenir des variations somaclonales. Or des teneurs élevées en régulateur de croissance sont susceptibles de provoquer des bouleversements cellulaires générateurs de variations. Par ailleurs, les résultats du tableau 24 montrent que le pourcentage d'organogenèse est identique pour des cals induit en présence de 0,5 à 5 mg/l de 2,4-D.

Des mesures du poids de matière fraîche des cals ont mis en évidence la nécessité de réduire le 2,4-D dans les milieux d'entretien. Nous avons également baissé le niveau de kinétine en raison de l'interaction mise en évidence entre ces deux facteurs. Nous avons donc retenu comme milieu d'entretien des cals (ME) le milieu MB = sac 30 g/l + 2,4-D 2 mg/l + kin 0,5 mg/l.

Dans la suite de ce travail nous avons essayé de mettre au point les conditions de néoformations des cals cultivés sur les milieux MC et ME.

8 -RESUME

Des milieux qui permettent l'induction et l'entretien des cals formés à partir de fragments de feuilles P1 ont été mis au point chez D. alata et D. trifida. Le 2,4-D, le MCPA, le picloram et l' α 2,4,5-T se sont révélés efficaces pour induire la callogenèse. Les cals cultivés en présence de 2,4-D ont présenté un meilleur pourcentage de néoformations ultérieures et cette auxine a donc été utilisée pour tenter d'optimiser les conditions de callogenèse. De faibles teneurs en cytokinine (entre 0,25 et 1,0 mg/l) sont nécessaires pour inhiber le développement de racines. Une étude de trois facteurs variant simultanément (2,4-D, sucre et kinétine) a été réalisée à l'aide d'un plan centré composé et les combinaisons optimales ont été précisées : 2,4-D (3 à 5 mg/l) + kinétine (0,5 à 1 mg/l) + sac (30 à 40 mg/l). Le milieu MC a été retenu. Des mesures du poids de matière fraîche des cals ont permis de définir un milieu d'entretien des cals (milieu ME).

Par ailleurs, la température influence de façon significative la callogenèse, le rôle de la lumière est moins net.

L'étude histologique montre que les cals sont issus des cellules périvasculaires.

CHAPITRE 5 : ORGANOGENESE DE TIGES

Tableau 36 : Influence de diverses phytohormones sur le pourcentage de néoformations de tiges à partir de cals d'explants P1 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 4 mois).

| Cultivar \ phytohormones (mg/l) | AIA 0,5 BAP 2 | AIB 0,5 BAP 2 | NOA 0,5 BAP 2 | ANA 0,5 BAP 2 | 2,4-D 0,5 BAP 2 | BAP 2 | Kin 1 BAP 1 | Kin 2 | 2,4-D 0,02 | | | témoin sans hor- mones |
|---------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|--------------------|-------|----------------|-------|------------|--------|--------|---------------------------------|
| | | | | | | | | | kin 8 | Kin 10 | Kin 20 | |
| D. trifida cv Moengo V | 0 % | 0 % | 0 % | 0 % | 0 % | 0 % | 0 % | 0 % | 0 % | 0 % | 0 % | 0 % |
| D. trifida cv INRA 5.20 | 0 % | 0 % | 0 % | 0 % | 0 % | 0 % | 0 % | 0 % | 0 % | 0 % | 0 % | 0 % |
| D. alata cv Brazo Fuerte | * | 4 % | 8 % | 4 % | 4 % | 4 % | 4 % | 4 % | 0 % | 0 % | 0 % | 4 % |

* 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.

Des cals d'explants P1 initiés sur le milieu MC et entretenus sur le milieu ME ont été transférés sur le milieu MB + sac 30 g/l additionné de diverses phytohormones. Nous avons utilisé 25 cals par traitement pour cet essai.

CIDARC - BIBLIOTHEQUE

Dans un premier temps on a cherché à mettre au point des milieux d'organogenèse à partir des cals initiés et entretenus sur les milieux à forte teneur en auxine. Puis on a essayé d'induire des néoformations de tiges après une courte phase callogène. Une étude cytologique a été faite pour tenter d'éclaircir ces phénomènes.

1 - ORGANOGENESE DE TIGE A PARTIR DE CALS INITIES ET ENTRETENUS SUR DES MILIEUX RICHES EN AUXINE

1.1. - Influence des phytohormones sur la néoformation de tige

1.1.1. - Etude préliminaire

Les milieux d'organogenèse trouvés dans la bibliographie sur Dioscorea sont variés (cf tableau 3 p 15) : certains contiennent une très forte teneur en kinétine (6 à 12 mg/l) associée à 0,01 mg/l de 2,4-D (MASCARENHAS et al., 1976 ; SINGH, 1978, 1982) ; ASOKAN et al., 1983) ; d'autres ne renferment que des cytokinines à des concentrations plus faibles, 2 à 3 mg/l (MASCARENHAS et al., 1976 ; AMIRATO, 1982, 1984) ; d'autres encore présentent l'association d'une cytokinine (de 0,25 à 2 mg/l) et d'une auxine (ANA, AIB ou 2,4-D) (GREWAL et ATAL, 1976 ; SINHA et CHATURVEDI, 1979 ; DATTA et al., 1981 ; SENGUPTA et al., 1984 ; KOUASSI et al., 1984).

Nous avons donc expérimenté divers combinaisons hormonales qui reprennent toutes ces données (cf tableau 36).

Chez D. alata, seuls les milieux contenant 8 à 12 mg/l de kinétine n'ont pas permis la régénération. Tous les autres milieux, même le témoin sans hormone, ont donné un faible pourcentage de néoformation. Aucun résultat positif n'a été observé sur D. trifida. Les cals placés sur ces milieux noircissent petit à petit et des cals secondaires se développent sur les cals primaires et parfois sur des restes d'explants initiaux. Les néoformations apparaissent sur ces cals secondaires après 60 jours (cf photo 21).

On a par la suite recherché à améliorer les concentrations d'auxine et de cytokinine dans le milieu de néoformation.

1.1.2. - Influence de la concentration en AIB sur le pourcentage d'organogenese

Une auxine qui avait donné une néoformation dans l'essai préliminaire, l'AIB, a été utilisée dans cette expérience en association avec la BAP. Les résultats du tableau 37 montrent que la présence d'AIB entre 0,5 et 1 mg/l améliore le pourcentage d'organogenèse. Une concentration de 0,5 mg/l d'AIB a donc été retenue pour l'étude suivante.

Tableau 37 : Influence de la concentration en AIB sur le pourcentage de néoformation de tiges à partir de cals d'explants 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 |
|-------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| 0,5 | 2 % | 8 % | 4 % | 0 % | 0 % |
| 2 | 2 % | 4 % | 6 % | 2 % | 0 % |

Des cals d'explants P1 initiés sur le milieu MC et entretenus sur le milieu ME ont été placés sur le milieu MB + sac 30 g/l + BAP (0 - 2 mg/l) + AIB (0 - 0,5 - 1,0 - 1,5 - 2,0 - mg/l). Deux répétitions de 25 explants par traitement ont été réalisés.

Tableau 38 : Influence de la concentration en kinétine et en BAP sur le pourcentage de néoformations de tiges d'explants P1 de D. alata cv Brazo Fuerte.

| Niveau de cytokinine (mg/l) | Cytokinine | | | | | | |
|-----------------------------|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 0 | 0,5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 12 |
| kin | 8 % | 4 % | 4 % | 2 % | 0 % | 0 % | 0 % |
| BAP | 6 % | 4 % | 2 % | 4 % | 0 % | 0 % | 0 % |

Les cals d'explants P1 initiés sur le milieu MC et entretenus sur le milieu ME ont été placés sur les milieux MB + sac 30 g/l + AIB 0,5 mg/l + kin (0 à 12 mg/l) ou BAP (0 à 12 mg/l) 2 répétitions de 25 cals par traitement ont été faites. (observation après 4 mois).

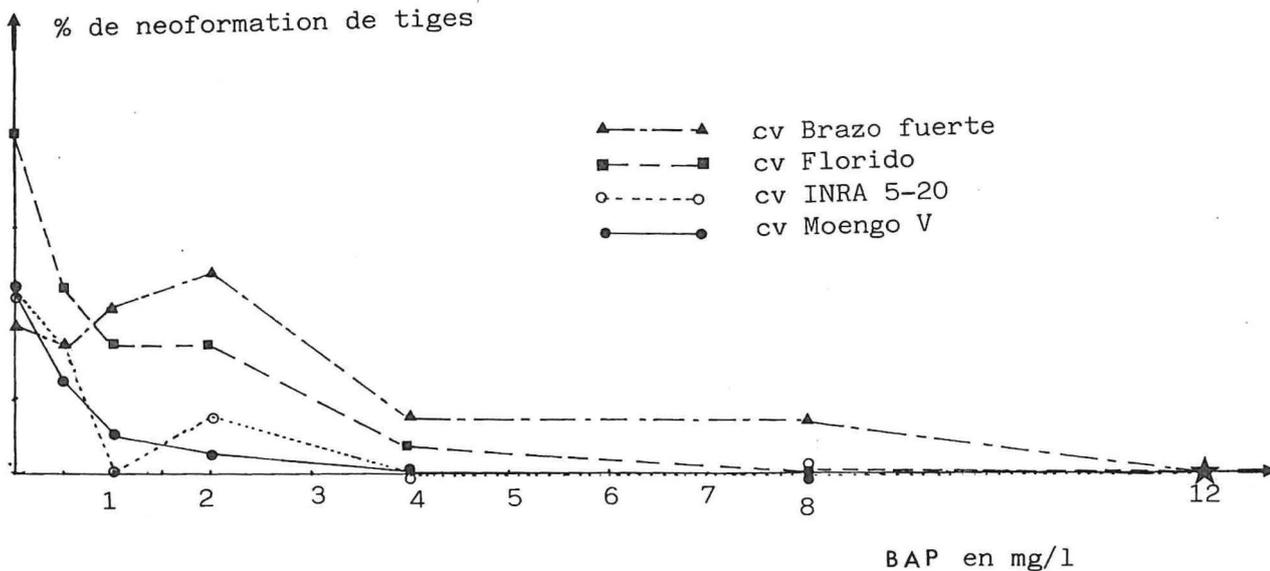


FIGURE 21 : Influence de la concentration en BAP sur le pourcentage de néoformations à partir de cals de noeuds.

Les cals de noeuds initiés sur milieu MC et entretenus sur milieu ME pendant 3 repiquages (90 jours) ont été placés sur les milieux MB + sac 30 g/l + AIB 0,5 mg/l + BAP (0 - 0,5 - 1,0 - 2,0 - 4,0 - 8,0 - 12,0 mg/l). Deux répétitions de 25 cals par traitement ont été réalisées sur D. trifida cv MOengo V et INRA 5-20 et sur D. alata cv Brazo Fuerte et Florido (observations après 4 mois).

1.1.3 - Influence de la concentration en cytokinines sur l'organogenèse

Dans une première phase, on a comparé les effets de la kinétine et de la BAP sur l'organogenèse des cals d'explants P1 de D. alata. Les résultats du tableau 33 montrent que les deux cytokinines donnent des pourcentages d'organogenèse très semblables. En l'absence de cytokinines, des racines se développent sur le cal mais cela n'empêche pas la formation de tiges qui apparaissent après les racines et souvent dans la même région du cal. Sur les milieux plus riches en cytokinines (à partir de 1 mg/l), on n'observe plus de rhizogenèse.

Nous avons tenté de vérifier si ces résultats se confirmaient sur les autres cultivars. Etant donné les échecs rencontrés avec les cals d'explants P1 chez D. trifida dans les essais préliminaires, cette expérience a été réalisée avec des cals de noeuds. D'après les résultats obtenus au chapitre 3, ce type de cal donne un pourcentage d'organogenèse élevé chez les quatre cultivars étudiés. Pour éviter le développement plus ou moins direct des méristèmes primaires contenus dans les noeuds, on a utilisé des cals séparés de l'explant initial après 120 jours de culture. Les résultats de la figure 21 montrent que chez les quatre cultivars testés les pourcentages de néoformation diminuent nettement au delà de 2 mg/l de BAP. Il est à noter que les tiges développées dans le milieu contenant 3 mg/l de BAP se sont nécrosées ainsi que le cal qui leur avait donné naissance, 45 jours après leur apparition.

On peut donc conclure de ces deux expériences que la présence d'une cytokinine dans le milieu d'organogenèse n'est pas indispensable. Des niveaux élevés de cytokinine (au delà de 2 mg/l) inhibent presque totalement les possibilités de néoformation chez les quatre cultivars étudiés. Ces résultats rappellent ceux obtenus sur de nombreuses Monocotylédones chez lesquelles la production de tiges est plutôt due à la réduction ou à l'élimination de l'auxine dans ce milieu (CHENG et SMITH, 1974 ; NABORS, 1980).

Cependant les milieux d'organogenèse qui ont été publiés sur les Dioscoreae contiennent tous des cytokinines à un niveau parfois très élevé. A notre connaissance, seuls GREWAL et ATAL (1976) ont essayé des milieux totalement dépourvus de cytokinines et ils ont montré que la présence de BAP entre 0,25 et 0,5 mg/l augmentait considérablement la fréquence des néoformations.

Il se pourrait que certaines variétés soient plus sensibles aux cytokinines. Chez la variété Brazo Fuerte de D. alata par exemple, des doses de cytokinine supérieures à 1 mg/l dans le milieu de microbouturage inhibent très fortement la croissance des vitroplants (IBOKA, 1985).

Tableau 39 : Influence de la concentration en sucre sur le pourcentage de néoformation de tiges à partir de cals d'explants P1 de D. alata cv Brazo Fuerte. (observations après 5 mois).

| Sac (g/l) | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 80 |
|---------------------|-----|------|------|-----|-----|-----|
| Milieu | | | | | | |
| Témoin sans hormone | 0 % | 8 % | 8 % | 0 % | 0 % | 0 % |
| AIB 0,5 | 2 % | 16 % | 20 % | 4 % | 2 % | 0 % |
| AIB 0,5 BAP 2 | 0 % | 8 % | 10 % | 2 % | 0 % | 0 % |

Des cals de pétioles P1 Initiés sur milieu MC et entretenus sur le milieu ME ont été placés sur le milieu MB + sac (10 - 20 - 30 - 40 - 50 - 80 g/l) + AIB 0,5 mg/l + BAP (0 - 2 mg/l). Deux répétitions de 25 explants par traitement ont été réalisées.

TABLEAU 40 : Influence de la forme et de la quantité totale d'azote sur le pourcentage de néoformation de tiges chez D. alata cv Brazo Fuerte.

| Différentes formes d'azote dans les milieux utilisés | N 30 K N total = 30 mM $\frac{N \text{ réduit}}{N \text{ oxydé}} = \frac{6}{24} = 0,25$ | MS normal N total = 58 mM $\frac{N \text{ réduit}}{N \text{ oxydé}} = \frac{20}{38} = 0,5$ | MS normal + glutamine 7 mM N total = 65 mM $\frac{N \text{ réduit}}{N \text{ oxydé}} = \frac{27}{38} = 0,7$ | MS modifié N total = 60 mM $\frac{N \text{ réduit}}{N \text{ oxydé}} = \frac{25}{3} = 0,7$ | Milieu de SINGH N total = 36 mM $\frac{N \text{ réduit}}{N \text{ oxydé}} = 1,0$ | Milieu de SINGH + glutamine 7 mM N total = 43 mM $\frac{N \text{ réduit}}{N \text{ oxydé}} = 1,4$ |
|--|---|--|---|--|--|---|
| Cals formant des tiges | | | | | | |
| Cals formant des tiges en pourcentage | 4 % | 4 % | 2 % | 4 % | 34 % | 4 % |

Des cals d'explants P1 de *D. alata* cv Brazo Fuerte initiés sur MB + sac 30 g/l + ANA 4 mg/l + kin 0,5 mg/l ont été placés sur différents milieux de façon à tester une gamme de rapport N réduit/N oxydé (de 0,25 à 1,4). Ces milieux de régénération contenaient 30 g/l de saccharose, 0,5 mg/l d'AIB et 2 mg/l de BAP. Deux répétitions de 25 explants par traitement ont été effectuées. On compte le nombre de cals ayant donné au moins une tige après 6 mois de culture.

1.2. - Influence de la concentration en sucre sur le pourcentage de callogenèse

Diverses concentrations de saccharose ont été expérimentées sur des cals cultivés en présence de 30 g/l de sucre.

Les pourcentages d'organogénèse les plus élevés sont obtenus avec 20 et 30 g/l de saccharose (cf tableau 39).

Ceci confirme les observations faites sur l'induction et la croissance des cals qui ont une meilleure structure sur les milieux contenant un niveau moyen de saccharose (20 à 30 g/l). Les chocs osmotiques (repiquage sur milieu contenant 10 ou 50 g/l de saccharose) n'ont donné aucun résultat positif dans les deux répétitions de cette expérience, contrairement aux résultats obtenus sur d'autres plantes (KOCHBA et BUTTON, 1974).

1.3. - Influence de l'azote

1.3.1. - Influence de la forme et de la quantité d'azote

SINGH (1978) a montré que la présence simultanée d'ions ammonium et d'ions nitrates était indispensable dans le milieu d'organogénèse pour obtenir des embryons à partir de cals de D. deltoidea. Mais, à notre connaissance, aucune étude n'a été faite sur les rapports entre azote oxydé et azote réduit ainsi que sur la quantité d'azote total à apporter au milieu d'organogénèse chez les Dioscoreacées. Et en particulier il n'a pas été publié de comparaison entre le milieu minéral de SINGH et le milieu MS.

Nous avons donc expérimenté différents rapports N oxydé/N réduit. Les résultats du tableau 40 montrent que le milieu MS modifié avec 500 mg/l d'azote proposé par SINGH, (1978) a donné les meilleurs résultats. Les régénérations apparaissent très lentement sur ce milieu (entre 135 et 250 jours après la mise sur milieu organogène) alors qu'elles étaient apparues entre 60 et 90 jours sur les autres.

Le milieu de SINGH (1978) se caractérise à la fois par un rapport : N réduit/N oxydé plus élevé que le milieu MS et par un niveau d'azote plus faible. Ces deux aspects pourraient expliquer une réponse différente des cals sur ce milieu. Mais le milieu N30K, qui possède un niveau d'azote comparable à celui du milieu de SINGH a donné un très faible pourcentage de néoformation. Et les milieux présentant un rapport N réduit / N oxydé de 0,7 et 1,4 n'ont pas fourni de meilleurs résultats. La quantité d'azote total (entre 30 et 60 mM) et l'équilibre entre l'azote oxydé et l'azote réduit (entre 0,25 et 1,4) ne semblent donc pas avoir une influence déterminante sur l'organogénèse de tiges.

Tableau 41 : Comparaison des pourcentages d'organogenèse de tiges après 6 mois sur les milieux MR et S30.

| Milieux | MR | S30 |
|--|------|------|
| Nombre de cals ayant régénéré une tige | 3/50 | 4/50 |

Des cals d'explants P1 de *D. alata* cv Brazo Fuerte initiés sur MC et entretenus sur ME ont été placés sur les milieux MR (milieu minéral MS) et S 30 (milieu minéral de SINGH, 1978).

Ces milieux renferment du saccharose 30 g/l et deux phytohormones, une auxine (AIB = 0,5 mg/l) et une cytokinine (BAP = 2 mg/l).

TABLEAU 42 . Influence de l'adénine sur la néoformation de tiges à partir de cals de pétioles P1 de *D. alata* cv Brazo Fuerte.

| Ads en mg/l | 0 | 25 | 50 | 100 |
|---|-----|-----|-----|-----|
| Milieu organogène | | | | |
| MB + sac 30 g/l IBA 0,5 mg/l + BAP 0,5 mg/l | 3 % | 0 % | 0 % | 0 % |
| MB + sac 30 g/l ANA 0,5 mg/l + BAP 0,5 mg/l | 3 % | 3 % | 0 % | 0 % |

TABLEAU 43 : Influence de la glutamine sur la néoformation de tiges à partir de cals de pétioles P1 de *D. alata* cv Brazo Fuerte.

| Glutamine mg/l | 0 | 100 | 200 | 500 | 800 |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|
| Milieu organogène | | | | | |
| MB + sac 30 g/l ANA 0,5 mg/l + BAP 0,5 mg/l | 6 % | 3 % | 0 % | 0 % | 0 % |

Des cals de pétioles P1 initiés sur MC et entretenus sur ME ont été placés sur des milieux organogènes additionnés de diverses concentrations d'adénine (cf tableau 42) ou de glutamine (cf tableau 43). Dans les deux cas une répétition de 30 cals par traitement a été réalisée.

Une autre particularité du milieu de SINGH est sa très faible teneur en potassium qui joue peut-être un rôle dans l'apparition des néoformations. Le rapport K/Ca (en milliéquivalents par litre) est d'environ 3 dans les milieux N30K et MS, alors qu'il n'est que de 0,2 dans le milieu de SINGH. Cependant, le milieu de SINGH, additionné de glutamine qui renferme le même rapport K/Ca de 0,2 n'a pas donné de meilleurs résultats que les milieux MS ou N30K.

D'autre part, si la première répétition avait donné des résultats très élevés sur le milieu S30 (14 calcs sur 25 ayant régénéré des tiges) la deuxième répétition a donné un pourcentage de néoformations beaucoup plus faible (3 calcs sur 25). De plus, une deuxième expérience comparant le milieu MR et le milieu S30 n'a pas confirmé les résultats du premier essai (cf tableau 41).

1.3.2. - Influence de l'azote sous forme organique

De l'adénine entre 25 et 100 mg/l ou de la glutamine entre 100 et 800 mg/l ont été ajoutées aux milieux d'organogénèse. Les résultats des tableaux 42 et 43 montrent qu'aucun des deux composés n'a eu une influence positive sur la néoformation de tige.

L'apport d'azote sous forme organique semble nécessaire à l'apparition du phénomène d'embryogénèse somatique chez Dioscorea floribunda et D. bulbifera (AMMIRATO, 1982-1984) et la régénération de tige chez D. composita (DATTA et al., 1981) et D. floribunda (SINHA et CHATURVEDI, 1979). Mais ni l'adénine, ni la glutamine aux doses testées dans nos expériences n'ont permis la formation d'embryons et elles semblent plutôt avoir eu un effet dépressif sur la néoformation de tiges.

1.4. - Influence du génotype sur le pourcentage d'organogénèse de tiges

On a comparé les réactions des 4 cultivars sur divers milieux organogènes. Les résultats mentionnés dans les tableaux 44, 45 et 46 montrent une importante différence de réponse entre D. alata et D. trifida.

Chez D. trifida, trois néoformations ont été obtenues sur des milieux sans cytokinine (cf tableau 46). L'observation a été faite après 7 mois et l'apparition d'autres néoformations plus tardives aurait peut-être été possible. Les calcs induits sur milieu riche en auxine, évoluent très lentement sur les milieux d'organogénèse. Ils ne se nécrosent pas et dans certains cas des calcs secondaires se développent. Les tiges néoformées sont apparues sur ces calcs.

TABLEAU 44 : Influence de diverses combinaisons hormonales sur le pourcentage de néoformation de tiges à partir de cals d'explants P1 de D. alata cv Brazo Fuerte (observations après 5 mois)

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

TABLEAU 45 : Influence de diverses combinaisons hormonales sur le pourcentage de néoformation de tiges à partir de cals d'explants P1 de D. alata cv Florido (observations après 5 mois).

| auxine (mg/l) BAP (mg/l) | ANA 0,5 | AIB 0,5 | NOA 0,5 | témoin sans auxine |
|-----------------------------|---------|---------|---------|-----------------------|
| 0 | 24 % | 28 % | 14 % | 6 % |
| 2 | 0 % | 4 % | 0 % | 0 % |

TABLEAU 46 : Influence de diverses auxines sur le pourcentage de néoformation de tige à partir de cals d'explants P1 de D. trifida (observations après 7 mois).

| cvs auxine mg/l | ANA 0,5 | AIB 0,5 | NOA 0,5 | témoin sans hormones |
|--------------------|---------|---------|---------|----------------------------|
| INRA 5.20 | 2 % | 2 % | 0 % | 0 % |
| MOENGO V | 2 % | 0 % | 0 % | 0 % |

Des cals d'explants P1 de D. alata et de D. trifida initiés sur le milieu MB + 2,4-D 3 mg/l + kin 0,5 Mg/l + sac 30 g/l et entretenus pendant 60 jours sur le milieu ME ont été placés sur le milieu minéral de SINGH (19 additionné des vitamines de MOREL, de 30 g/l de saccharose et des divers combinaisons hormonales mentionnées dans les tableaux 44, 45 et 46. Les résultats portés dans les tableaux 44 à 46 correspondent à deux répétitions de 25 cals par traitement.

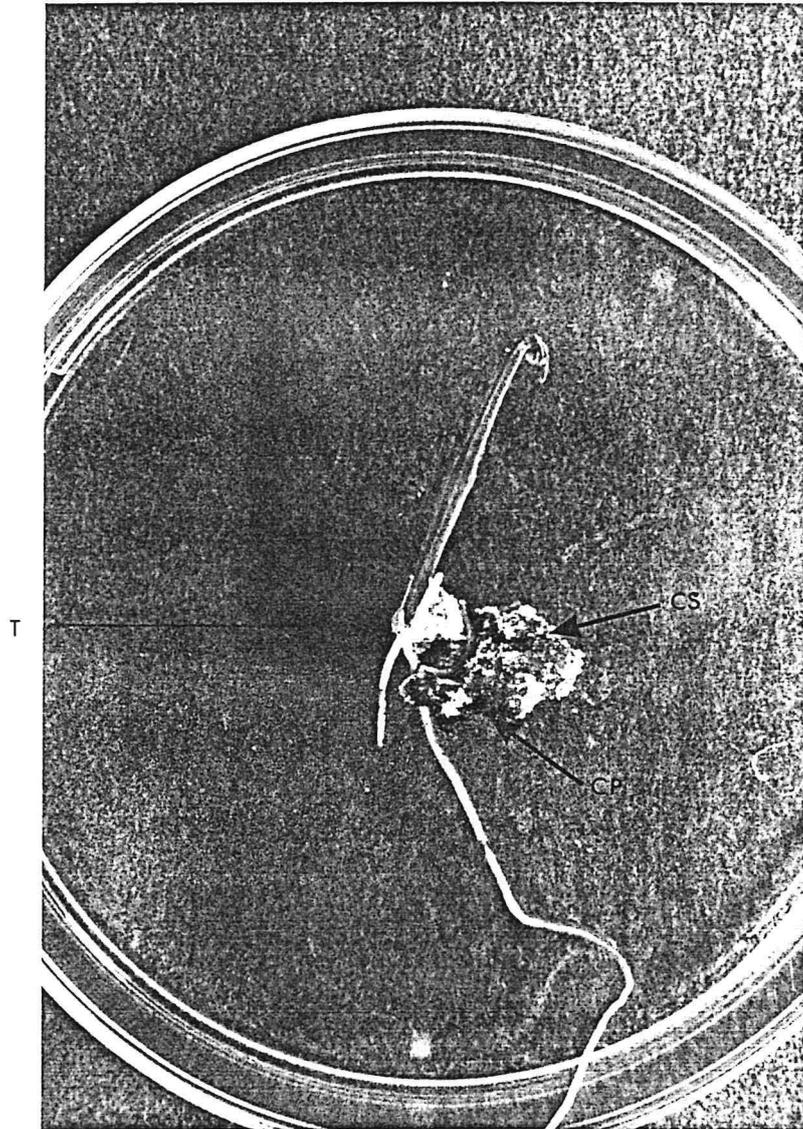


PHOTO 21 : Néof ormation sur un cal secondaire chez D. alata cv Brazo Fuerte.
On peut observer le cal primaire noirci (CP), le cal secondaire blanc (CS) et un début de tubérisation à la base de la néof ormation (T).

Chez D. alata, les cultivars Brazo Fuerte et Florido ont montré un comportement différent. Les cals du cultivar Brazo Fuerte noircissent lentement, tandis que des cals secondaires se développent. Les néoformations apparaissent sur ces cals secondaires (cf. photo 21 et tableau 44). Chez le cultivar Florido, les régénérations se développent à partir du cal primaire dont seules certaines parties noircissent ; elles sont plus fréquentes et elles apparaissent plus rapidement (cf. tableau 45).

De nombreuses études montrent que l'initiation, l'entretien des cals et leur aptitude à régénérer varient de manière significative selon le génotype de la plante dont ils sont issus, par exemple : chez le maïs (BECKERT et POLLACSEK, 1979), le blé (SEAR et DECKARD, 1982), la canne à sucre (CHAGVARDIEFF et al., 1981), la patate douce (TEMPLETON SOMMERS et COLLINS, 1985)... Nos résultats mettent également en évidence l'importance du génotype sur les potentialités organogènes des cals, chez Dioscorea.

Cette étude a par ailleurs confirmé le rôle inhibiteur de la BAP sur l'organogenèse des cals. Et elle a montré que les trois auxines (ANA, NOA et AIB) avaient des actions assez semblables.

1.5. - Influence du milieu de callogenèse sur l'organogenèse ultérieure

Au cours des expériences relatées au chapitre précédent concernant la mise au point des milieux de callogenèse on s'est assuré que ces milieux n'inhibent pas totalement les potentialités d'organogenèse ultérieure des cals. Mais il a été difficile de conclure à cause des très faibles pourcentages de néoformation obtenus. Après avoir mieux défini les conditions d'organogenèse, cette étude a été reprise.

Les résultats du tableau 49 montrent que des concentrations élevées d'ANA (de 3 à 5 mg/l) dans le milieu de callogenèse n'inhibent pas les potentialités d'organogenèse des cals. Elles sont mêmes plus favorables que des concentrations moins fortes, dans le cas du cultivar Florido qui a donné les meilleurs résultats.

1.6. - Organogenèse de cals après 120 jours en condition non morphogène

Pour obtenir des résultats rapidement, nous avons utilisé dans la plupart des expériences sur l'organogenèse, des cals ayant subi une phase de callogenèse et un repiquage sur milieu d'entretien. IL reste parfois des fragments d'explants initiaux sur ces cals. Afin de s'assurer que l'organogenèse provient effectivement du cal, nous avons entretenu des cals isolés de l'explant initial pendant deux repiquages avant des les passer sur le milieu organogène.

TABLEAU 49 : Influence du milieu de callogenèse sur l'organogénèse ultérieure.

| Cultivars Milieu de callogenèse | Brazo Fuerte | Florido | Moengo V | INRA 5-20 |
|---------------------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| ANA 0,5 Kin 1,0 | rac : 20 % tige : 0 % | rac : 24 % tige : 8 % | rac : 8 % tige : 0 % | rac : 8 % tige : 0 % |
| ANA 1,0 Kin 1,0 | rac : 20 % tige : 8 % | rac : 24 % tige : 12 % | rac : 8 % tige : 0 % | rac : 12 % tige : 0 % |
| ANA 2,0 Kin 1,0 | rac : 16 % tige : 2 % | rac : 48 % tige : 24 % | rac : 12 % tige : 0 % | rac : 8 % tige : 0 % |
| ANA 3,0 Kin 1,0 | rac : 16 % tige : 4 % | rac : 40 % tige : 24 % | rac : 40 % tige : 0 % | rac : 24 % tige : 0 % |
| ANA 5,0 Kin 1,0 | rac : 12 % tige : 2 % | rac : 60 % tige : 28 % | rac : 12 % tige : 0 % | rac : 16 % tige : 0 % |
| ANA 8,0 Kin 1,0 | rac : 12 % tige : 8 % | rac : 52 % tige : 24 % | rac : 16 % tige : 0 % | rac : 12 % tige : 0 % |

Des cals d'explants P1 de D. alata cvs Brazo Fuerte et Florido et de D. trifida cvs MoengoV et INRA 5.20 initiés sur MB + sac 30 g/l + ANA (0,5 - 1,0 - 2,0 - 3,0 - 5,0 - 8,0 mg/l) + kin 1 mg/l ont été transférés sur le milieu organogène : MB + sac 30 g/l + ANA 1 mg/l. Deux répétitions de 25 explants par traitement ont été réalisées. Le pourcentage d'organogénèse de racine (rac) et de tiges (tige) a été noté après 110 jours.

TABLEAU 50: Organogenèse de tige à partir de cals cultivés pendant 120 jours en conditions non morphogènes (% d'organogenèse de tige après 150 jours)

| Origine du cal | Cultivars | | | |
|----------------|--------------|---------|----------|-----------|
| | Brazo Fuerte | Florido | Moengo V | INRA 5-20 |
| Limbe L1 | 0 % | 0 % | 0 % | 0 % |
| Explant P1 | 6 % | 16 % | 0 % | 0 % |
| Noeud N2 | 33 % | 53 % | 12 % | 15 % |
| Bulbille | 20 % | 30 % | 9 % | 12 % |
| Racines | 0 % | 0 % | 0 % | 0 % |

Des cals, séparés de l'explant initial et entretenus pendant 90 jours sur le milieu ME, ont été placés sur le milieu MB + sac 30 g/l + ANA 1 mg/l. Ces cals proviennent de différents explants : limbes L1, explants P1, noeuds N2, racines et microbulbilles dont le cortex a été ôté. Une répétition de 30 cals par type d'explant a été faite sur les cultivars Brazo Fuerte et Florido de D. alata et sur les cultivars Moengo V et INRA 5.20 de D. trifida.

TABLEAU 51: Comparaison des plantes issues de microbouturage et des plantes issues d'un cycle de callogenèse et de néoformation du point de vue du pourcentage de callogenèse et du pourcentage de néoformation.

| | Plantes issues de microbouturage | Plantes ayant subi un cycle de callogenèse et néoformation |
|--|----------------------------------|--|
| Pourcentage de callogenèse sur MC | 80 % | 96 % |
| Pourcentage de néoformation de tige sur MR | 6 % | 8 % |

Des explants P1 de D. alata cv Brazo Fuerte issus de plantes néoformées à partir de cals et issus de plantes obtenues par microbouturage ont été placés sur le milieu MC. Après 40 jours de callogenèse, ils ont été placés sur le milieu MR. Une répétition de 40 explants a été faite.

Nous avons poursuivi, dans cette expérience, l'étude amorcée au chapitre 3. Divers types d'explants ont été utilisés. Ils ont été soumis à une phase de callogenèse et d'entretien du cal de 120 jours ; puis les cals ont été placés sur un milieu organogène mis au point dans les expériences précédentes.

Les résultats du tableau 50 confirment l'effet déterminant de l'explant initial sur l'aptitude à régénérer des cals. Les néoformations sont plus nombreuses sur les cals de noeuds et de bulbilles. Cependant, il a été mis en évidence des possibilités d'organogenèse des cals d'explant P1 après 120 jours de culture en conditions non morphogènes, chez D. alata.

Ce résultat est particulièrement intéressant dans l'optique d'une recherche de variabilité. En effet, la culture de cal pendant une longue période en condition non morphogène est favorable à l'obtention de variabilité (SKIRVIN et JANICK, 1976 ; CHALEFF, 1983) . D'autre part, il est nécessaire de pouvoir cultiver les cals pendant suffisamment de temps pour faire agir des pressions de sélection capables d'orienter la variation.

1.7. - Comparaison des plantes issues de microbouturage et des plantes issues d'un cycle de callogenèse et de neoformation

On a fait subir un deuxième cycle de callogenèse et de néoformation à des vitroplants issus de régénération. Les résultats du tableau 51 montrent que le pourcentage de néoformation chez ces plantes est du même ordre que celui des plantes issues de microbouturage. Par contre la callogenèse est plus active.

1.8. - Conclusion

1.8.1. - Chez D. alata

Il a été obtenu suffisamment de néoformations de tiges sur D. alata pour pouvoir tirer certaines conclusions sur les facteurs affectant ce phénomène :

- en l'absence totale d'hormones, le milieu de base (MB) additionné de 30 g/l de saccharose permet l'organogenèse de tiges. Cependant la présence d'auxines (en particulier l'ANA et l'AIB aux concentrations de 0,5 à 1 mg/l) donne de meilleurs résultats. Les cytokinines entre 1 et 12 mg/l ont une influence négative sur l'organogenèse.

- différents milieux minéraux : MS (1962), N30K (MARGARA, 1978) ; milieu de SINGH (1978), ont permis l'organogenèse de tiges. Le milieu de SINGH (1978) a donné des résultats très supérieurs à tous les autres dans l'expérience sur les équilibres azotés. D'autres essais n'ont pas confirmé ce fait, mais il serait intéressant d'approfondir ce problème.

- le génotype et la nature de l'explant initial exercent une influence prépondérante sur les potentialités organogènes.

Nous proposons donc comme milieu d'organogenèse, le milieu MB additionné de 20 à 30 g/l de saccharose et d'une auxine, l'ANA ou l'AIB aux concentrations de 0,5 à 1,0 mg/l.

Les néoformations se développent lentement sur des cals d'explant P1 (entre 2 et 12 mois) mais on observe des variations de ce phénomène : chez le cultivar Florido, qui est plus réactif, l'organogenèse est plus rapide. Par contre, sur D. trifida, elle est très lente (7 à 12 mois). La lenteur de ce phénomène pourrait s'expliquer de plusieurs manières :

. par l'inadéquation du milieu organogène : la présence ou l'absence de certains facteurs dans le milieu pourrait ralentir l'organogenèse :

+ par exemple nous avons observé que la présence d'une cytokinine à partir de 1 mg/l retarde de plusieurs semaines l'apparition des tiges sur les cals par rapport aux milieux sans cytokinine.

+ peut être l'usage du charbon actif dans nos milieux aurait pu accélérer l'apparition des néoformations. WEATHERHEAD et al. (1978) ont montré que la présence de charbon actif diminuait le temps de développement des néoformations chez le tabac.

. par la présence simultanée dans la même boîte de Petri de cals organogènes et de cals non organogènes. Il pourrait y avoir un effet inhibiteur des cals non morphogènes sur les cals morphogènes comme celui noté par HANOVER et HANOVER (1984) où la présence de cals non morphogènes ralentissait de 4 à 7 semaines l'apparition d'embryoïdes sur les cals morphogènes d'explants foliaires de Palmier à huile.

1.8.2. - Chez D. trifida

Nous n'avons obtenu que 3 néoformations de tiges à partir de cals de pétiole dans les expériences relatées dans ce chapitre. Une des causes de cet échec est l'extrême lenteur d'apparition du phénomène (7 à 12 mois après la mise sur milieu organogène). Les premières expériences n'ont pas été poursuivies après 3 mois, et les suivantes ont été arrêtées après 5 mois. Seules, quelques expériences ont été poursuivies suffisamment de temps pour donner des résultats. Peut être, la température sous optimale des chambres de culture expliquerait, en partie, la lenteur du développement des néoformations chez ces espèces.

TABLEAU 52 : Influence des cytokinines sur la formation de cals, de racines et de tiges à partir d'explants P1 de D. alata cv Brazo Fuerte.

| Résultats | | cals formés en % | racines formées en % | Tiges formées en % |
|-----------------------|------|---------------------|-------------------------|-----------------------|
| Cytokinine en mg/l | | | | |
| Kinétine | 0,0 | 68 % | 40 % | 16 % |
| | 0,1 | 76 % | 44 % | 18 % |
| | 1,0 | 30 % | 2 % | 2 % |
| | 10,0 | 0 % | 0 % | 0 % |
| BAP | 0,0 | 70 % | 44 % | 20 % |
| | 0,1 | 64 % | 36 % | 16 % |
| | 1,0 | 26 % | 2 % | 4 % |
| | 10,0 | 0 % | 0 % | 0 % |

TABLEAU 53 : Influence des cytokinines sur la formation de cals, de racines et de tiges à partir d'explants P1 de D. trifida cv Moengo V.

| Résultats | | cals formés en % | racines formées en % | Tiges formées en % |
|------------------------|------|---------------------|-------------------------|-----------------------|
| Cytokinines en mg/l | | | | |
| Kinétine | 0,0 | 8 % | 80 % | 0 % |
| | 0,1 | 8 % | 16 % | 0 % |
| | 1,0 | 0 % | 0 % | 0 % |
| | 10,0 | 0 % | 0 % | 0 % |
| BAP | 0,0 | 6 % | 12 % | 0 % |
| | 0,1 | 2 % | 4 % | 0 % |
| | 1,0 | 0 % | 0 % | 0 % |
| | 10,0 | 0 % | 0 % | 0 % |

Des explants P1 de D. alata (tableau 52) et D. trifida (tableau 53) ont été placés sur le milieu MB additionné de 30 g/l de saccharose, de 1 mg/l d'ANA et de kinétine ou de BAP. Deux répétitions de 25 explants par traitement ont été réalisées. Les observations ont été faites après 150 jours.

2 - ORGANOGENESE APRES UNE COURTE PHASE CALLOGENE

Les cals du cv Brazo Fuerte initiés et entretenus sur des milieux riches en auxine se nécrosent petit à petit sur des milieux de néoformations et des cals organogènes se développent lentement sur ces cals primaires ou parfois sur des restes d'explants initiaux. Nous avons cherché à induire un développement direct de ces cals secondaires organogènes en plaçant les explants initiaux sur le milieu de néoformation soit directement, soit après un court passage (de quelques jours) sur le milieu de callogenèse MC. Cette étude a été faite sur des explants P1 qui n'ont pas de méristèmes.

2.1. - Influence de la concentration en cytokinine

ASOKAN et al., (1983) ont obtenu des cals et des néoformations sur des fragments de bulbilles avec une combinaison de 8 à 12 mg/l de kinétine et de 0,01 mg/l de 2,4-D. Et nous avons voulu vérifier l'action des cytokinines sur l'organogenèse directe.

Les résultats du tableau 52 indiquent clairement qu'elles inhibent à la fois la formation de cals de racines et de tiges. On n'a pas observé de différence entre les niveaux 0 et 0,1 mg/l de kinétine et de BAP. Il y a d'abord apparition d'un cal, puis de racines et après 2 mois des tiges commencent à se former. Au niveau de la blessure du pétiole et du départ des nervures. Des concentrations de 1 mg/l de kinétine inhibent la formation de racine et ralentissent considérablement l'apparition de tiges.

Chez D. trifida (cf tableau 53) on n'a pas observé de tige mais la formation de racines très puissantes. Les racines se développent d'abord, puis, dans certains cas, des cals apparaissent autour des racines.

Cette expérience confirme les résultats obtenus sur l'organogenèse à partir de cals entretenus sur milieux non morphogènes : la présence de cytokinines à des doses supérieures à 1 mg/l est inhibitrice, elle ralentit et réduit le phénomène de néoformation.

2.2. - Influence de la concentration en auxine

Nous avons expérimenté 4 concentrations en ANA : de 0,0 à 3,0 mg/l (cf tableaux 54 et 55).

Une concentration de 3,0 mg/l d'ANA permet la callogenèse et l'entretien du cal chez les deux cultivars étudiés. Des racines se développent sur les cals mais pas de tiges. En l'absence d'auxine, les explants ne montrent aucune réaction sur le milieu de base, cependant les explants du cultivar Brazo Fuerte qui est anthocyané perdent peu à peu leur pigmentation anthocyanique et ils sont restés verts jusqu'à la fin de l'expérience.

TABLEAU 54 : Influence de la concentration en ANA sur la formation de cals, de racines et de tiges à partir d'explants P du cv Brazo Fuerte.

| ANA \ Résultats | Cals formés | racines formées | tiges formées |
|-----------------|-------------|-----------------|---------------|
| 0,0 | 0 % | 0 % | 0 % |
| 0,5 | 52 % | 40 % | 8 % |
| 1,0 | 68 % | 48 % | 10 % |
| 3,0 | 80 % | 64 % | 0 % |

TABLEAU 55 : Influence de la concentration en ANA sur la formation de cals, de racines et de tiges à partir d'explants P du cv Florido.

| ANA \ Résultats | Cals formés en % | racines formées en % | tiges formées en % |
|-----------------|------------------|----------------------|--------------------|
| 0,0 | 0 % | 0 % | 0 % |
| 0,5 | 64 % | 40 % | 16 % |
| 1,0 | 80 % | 76 % | 32 % |
| 3,0 | 86 % | 32 % | 0 % |

Des explants P1 de *D. alata* ont été placés sur le milieu MB additionné de 30 g/l de saccharose et de 0 à 3 mg/l d'ANA. 25 explants par traitement ont été utilisés pour cette étude. Les observations sont faites après 120 jours.

TABLEAU 56 : Influence de la lumière sur le pourcentage de callogenèse et d'organogenèse d'explant P1 de D. alata cv Brazo Fuerte (après 6 mois).

| Conditions de culture | | Cals formés en % | Racines formées en % | Tiges formées en % |
|--|-----------------------------|---------------------|-------------------------|-----------------------|
| concentration du milieu en phytohormones | conditions d'éclairement | | | |
| ANA 1 | lumière | 70 % | 56 % | 20 % |
| | obscurité | 76 % | 30 % | 18 % |
| ANA 1 + BAP 0,1 | lumière | 72 % | 52 % | 20 % |
| | obscurité | 70 % | 26 % | 16 % |
| ANA 1 + BAP 2 | lumière | 20 % | 2 % | 0 % |
| | obscurité | 30 % | 16 % | 6 % |
| AIB 1 | lumière | 60 % | 40 % | 16 % |
| | obscurité | 68 % | 40 % | 16 % |
| AIB 1 + BAP 0,1 | lumière | 66 % | 38 % | 12 % |
| | obscurité | 58 % | 36 % | 14 % |
| AIB 1 + BAP 2 | lumière | 4 % | 0 % | 0 % |
| | obscurité | 10 % | 0 % | 0 % |

Des explants P1 de D. alata cv Brazo Fuerte ont été mis sur différents milieux d'organogenèse : MB + sac 30 g/l + BAP (0 - 0,1 ou 1 mg/l) +(ANA 1 mg/l ou AIB 1 mg/l). Les boîtes de Petri ont été placées soit à la lumière, soit à l'obscurité. L'éclairement est de 12 heures de jours et l'intensité lumineuse de $20 \text{ mE m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Les résultats correspondent à deux répétitions de 25 explants par traitement.

Les concentrations de 0,5 et 1 mg/l d'ANA permettent l'apparition de cals, de racines et de tiges. La meilleure aptitude à l'organogenèse du cultivar Florido se confirme pour ce type de néoformations.

2.3. - Influence de la lumière sur l'organogenèse directe

Certains cals chlorophylliens se sont formés dans les expériences précédentes chez les deux cultivars. Ces cals sont très organogènes. Ils ont formé des tiges après 2 ou 3 mois. Nous avons donc pensé que la lumière pourrait avoir une influence sur l'organogenèse (cf tableau 56).

Les pourcentages de callogenèse et d'organogenèse après 6 mois ne diffèrent pas significativement entre les deux situations d'éclairément quels que soient les milieux organogènes employés. Mais d'autres différences existent :

- les cals et les néoformations se développent plus rapidement à la lumière qu'à l'obscurité,

- la lumière permet l'apparition en faible proportion, 5 à 10 %, de cals chlorophylliens qui ont néoformé des tiges. Une corrélation positive entre la présence de tâches chlorophylliennes dans les cals et leur aptitude à régénérer a été observée chez d'autres Monocotylédones (EAPEN et RAO, 1982 ; NABORS et al., 1982 et 1983).

Cette expérience a par ailleurs permis de vérifier que l'AIB est aussi efficace que l'ANA pour induire l'organogenèse directe de tige.

2.4. - Organogenèse après un court temps de passage sur le milieu de callogenèse MC

D'après les expériences précédentes, des cals réduits se développent sur les explants placés directement sur un milieu d'organogenèse. Nous avons cherché à étudier l'influence sur ce phénomène d'un court temps de passage sur un milieu à forte teneur en auxine. Des explants P1 du cv Brazo Fuerte ont donc été placés sur le milieu de callogenèse MC pendant une période variant de 0 à 50 jours (cf tableau 57).

Les cals ayant passé 50 jours sur le milieu de callogenèse se sont totalement nécrosés sur le milieu d'organogenèse après avoir donné quelques racines peu développées qui ont noirci en même temps que les cals.

Les cals ayant passé 20 à 35 jours sur le milieu MC se sont nécrosés lentement sur le milieu d'organogenèse et certains cals secondaires ont néoformé des tiges.

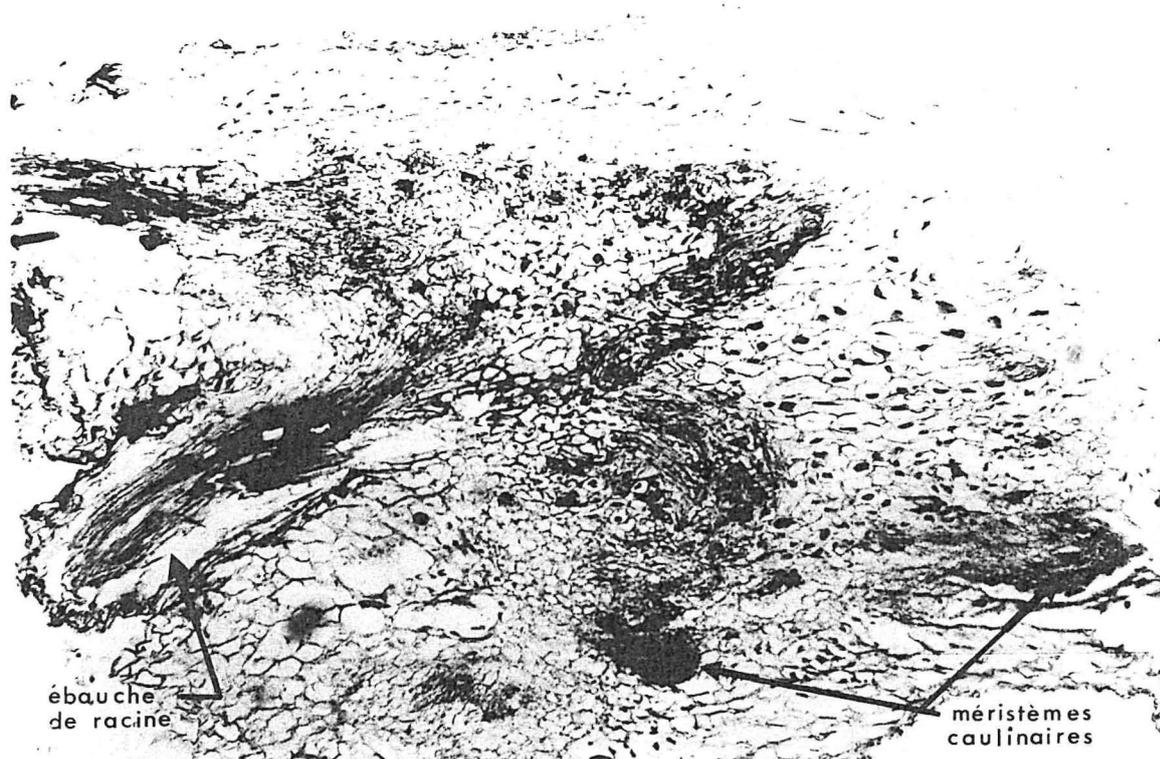
Les explants ayant passé 2 à 15 jours sur le milieu MC présentent un pourcentage d'organogenèse élevé. Deux types de proliférations cellulaires se forment, un cal mou et hyperhydrique

TABLEAU 57 : Influence de la durée d'induction de la callogenèse sur la callogenèse et l'organogenèse ultérieure chez *D. alata* cv Brazo Fuerte.

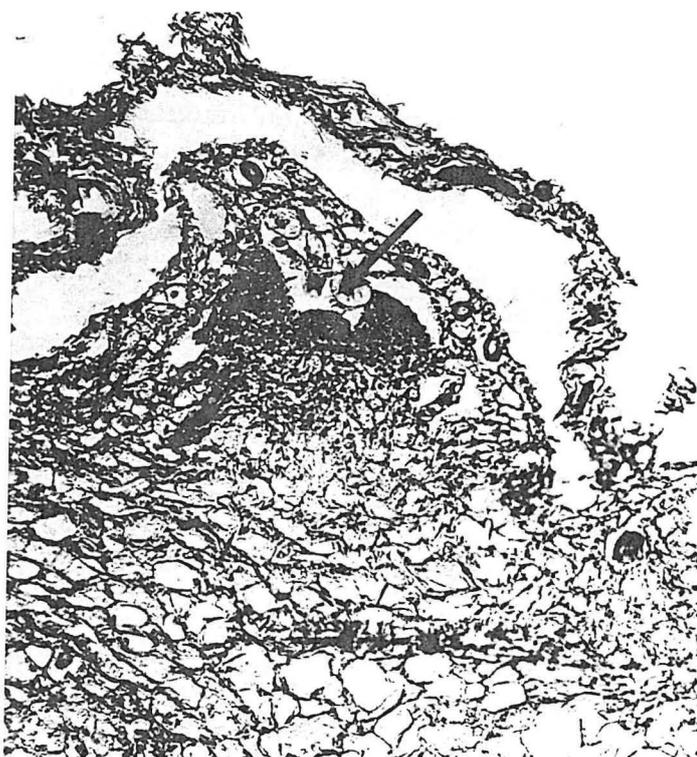
| Temps de passage sur le milieu de callogenèse MC | Pourcentage de callogenèse après 60 jours | Pourcentage d'organogenèse | | | |
|--|---|----------------------------|--------------------------|-----------------|--|
| | | Après 60 jours | | Après 120 jours | |
| 0 j | 40 % | tige 10 % racine 20 % | tige 18 % racine 24 % | | |
| 2 j | 96 % | tige 16 % racine 44 % | tige 30 % racine 48 % | | |
| 5 j | 92 % | tige 2 % racine 36 % | tige 28 % racine 36 % | | |
| 10 j | 94 % | tige 0 % racine 32 % | tige 18 % racine 30 % | | |
| 15 j | 98 % | tige 0 % racine 28 % | tige 8 % racine 30 % | | |
| 20 j | 98 % | tige 0 % racine 28 % | tige 4 % racine 34 % | | |
| 25 j | 94 % | tige 0 % racine 24 % | tige 4 % racine 28 % | | |
| 30 j | 96 % | tige 0 % racine 24 % | tige 4 % racine 28 % | | |
| 35 j | 98 % | tige 2 % racine 26 % | tige 4 % racine 26 % | | |
| 50 j | 94 % | tige 0 % racine 30 % | tige 0 % racine 30 % | | |

Des explants P1 de *D. alata* cv Brazo Fuerte ont été placés sur le milieu de callogenèse MC pendant des temps variables (0 - 2 - 5 - 10 - 20 - 25 - 30 - 35 - 50 jours) avant d'être transférés sur le milieu MB + sac 30 g/l + ANA 1 mg/l. Les résultats du tableau 57 correspondent à deux répétitions de 25 explants par traitement. Nous avons noté la callogenèse et l'organogenèse de tiges et de racines 60 jours après le passage sur milieu organogène puis l'organogenèse après 120 jours.

PHOTO 22 : Organogenèse dans un cal de D.alata, cv Brazo Fuerte (G x 50).



PHOTOS 23 et 24 : méristèmes caulinaires issus du même cal (G x 120).



Des cals d'explants P1 de *D. alata* cv Brazo Fuerte, cultivés pendant 60 jours sur milieu riche en auxine ont été placés sur le milieu MR. Les coupes ont été faites après 75 jours.

qui entoure la néoformation sans en être à l'origine et un cal plus dense mais assez réduit qui est à la base des néoformations. Ces cals se développent lentement sur le milieu organogène.

Par ailleurs on peut remarquer que l'organogenèse se manifeste plus tôt (après 60 jours) sur des explants ayant subi une phase de callogenèse de 0 à 2 jours. Il semblerait que le passage sur milieu MC ralentisse l'organogenèse.

L'étude histologique de la callogenèse (cf chapitre 4 p. 88) a montré que les cals commencent à se former environ 20 jours après la mise sur le milieu MC. Or, dans cette expérience, on a observé un pourcentage d'organogenèse très faible sur les explants ayant passé plus de 20 jours sur le milieu MC. Par contre, ceux qui y ont passé moins de 15 jours présentent un cal plus réduit et un pourcentage de néoformation plus élevé, comme ceux placés directement sur le milieu organogène. L'optimum semble être 2 à 5 jours sur milieu MC.

3 - ETUDE CYTOLOGIQUE DES NEOFORMATIONS

Cette étude a été faite sur D. alata cv Brazo Fuerte. Deux types de néoformations ont été observées :

- sur des cals ayant passé 30 jours sur le milieu MC, 30 jours sur le milieu ME et au moins 90 jours sur un milieu de néoformation,

- sur des cals développés sur un milieu pauvre en auxine pendant 60 à 90 jours. Ces cals sont petits et rattachés à l'explant initial.

3.1. - Néoformations à partir de cals développés et entretenus en conditions non morphogènes

La photo 22 montre que les tiges et les racines se développent séparément. Généralement plusieurs bourgeons se développent simultanément à divers endroits du cal, comme le montrent les coupes histologiques (cf photos 23 et 24). Cependant, le plus souvent, une seule tige apparaît et les autres bourgeons restent dormants. Mais, si les cas sont laissés plus de deux mois sur le milieu de néoformation, après l'apparition de la première tige, une tubérisation se développe à la base de la tige. Ce tissu est tout à fait semblable à celui des microbulbilles avec les faisceaux libéro ligneux disséminés dans une masse parenchymateuse, mais la morphologie externe est différente et variable d'un cal à l'autre. Ces tubérisations produisent de nombreuses tiges simultanément : 6 à 10 et parfois plus (cf photos 25 et 26).

PHOTO 25 : Tissu tubérisé se développant à la base des néoformations (G x 50).

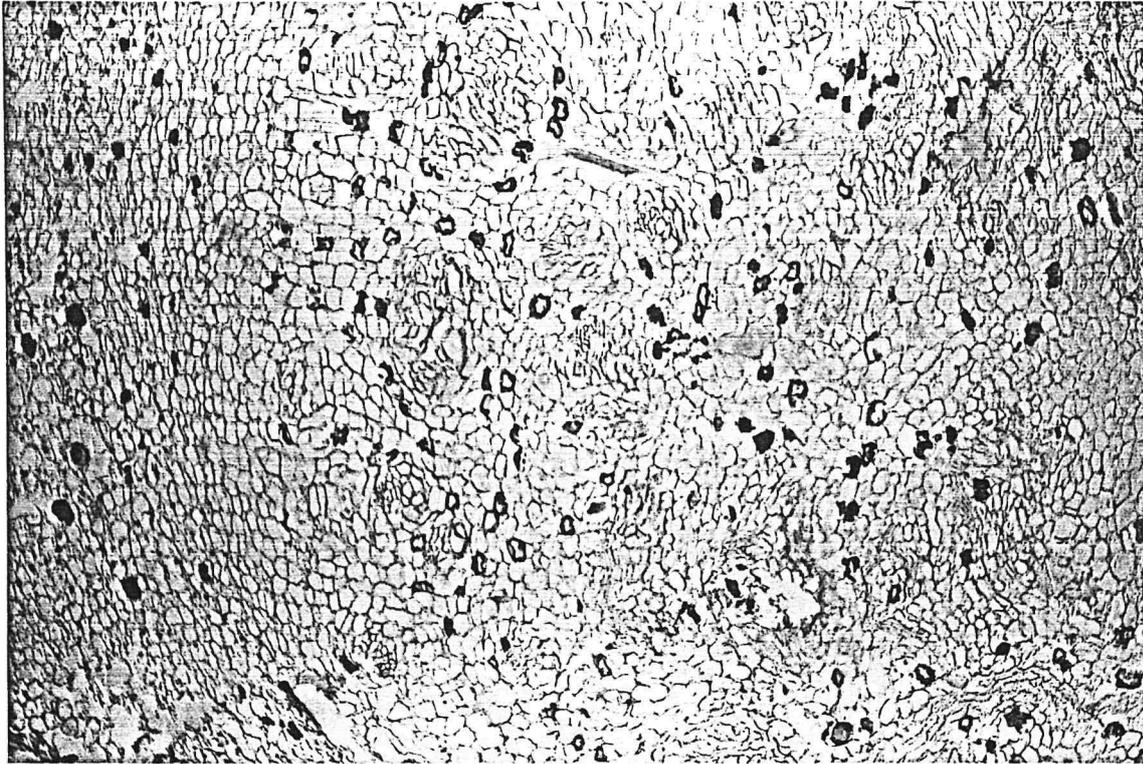
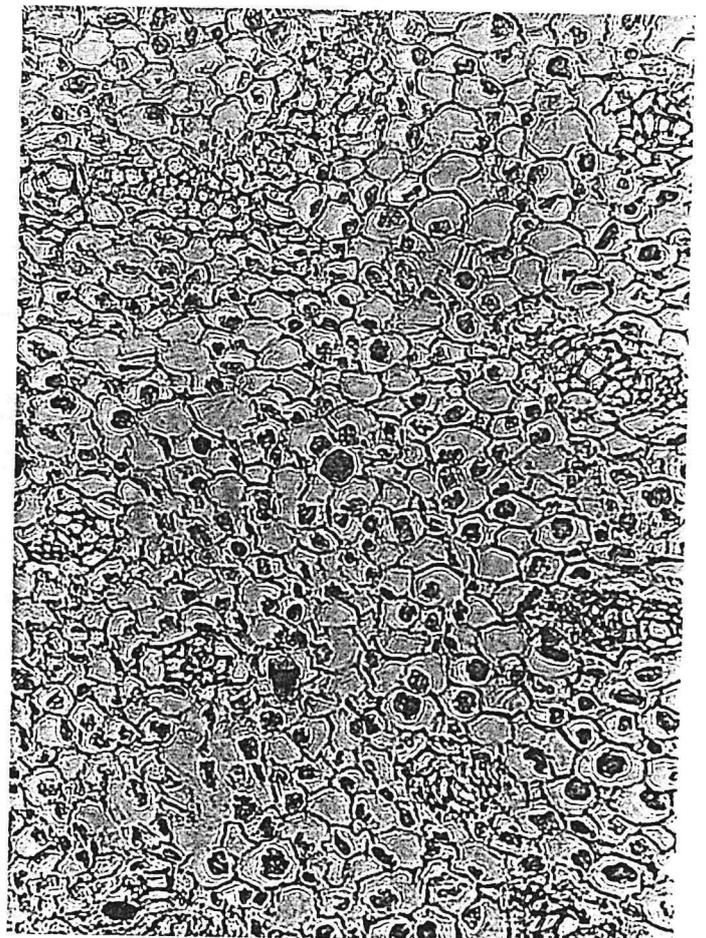
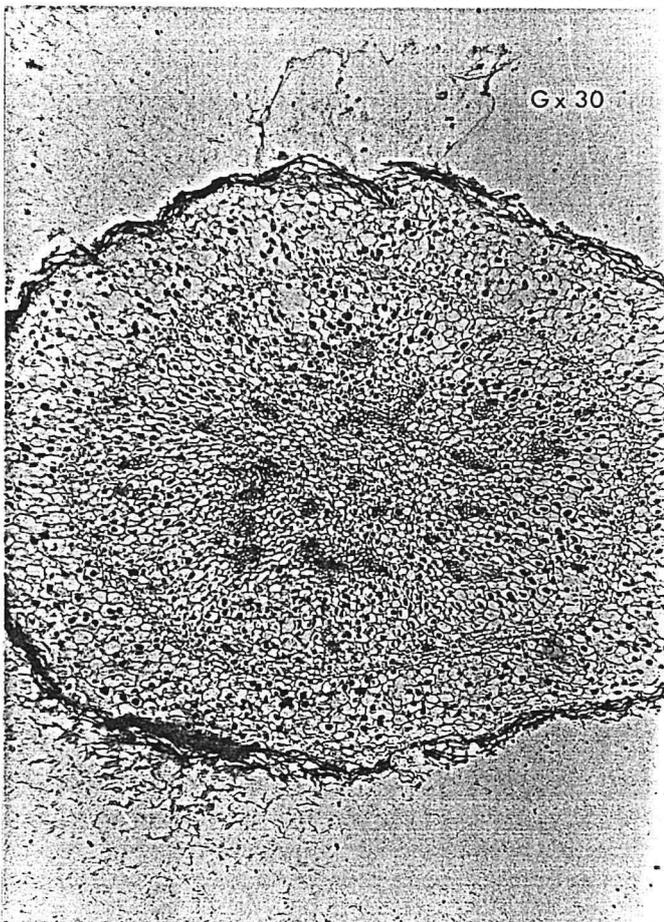


PHOTO 26 : Coupe d'une microbulbille de D. alata cv Brazo Fuerte. (G x 50)



ETUDE HISTOLOGIQUE DES NEOFORMATIONS DIRECTES :

Des explants P1 de *D. alata* cv Brazo Fuerte ont été placés sur le milieu MB + ANA 1 mg/l + sac 30g/l. Les observations cytologiques ont été faites après 90 jours.

PHOTO 27 : Cal situé à la base des néoformations directes (G x 50).

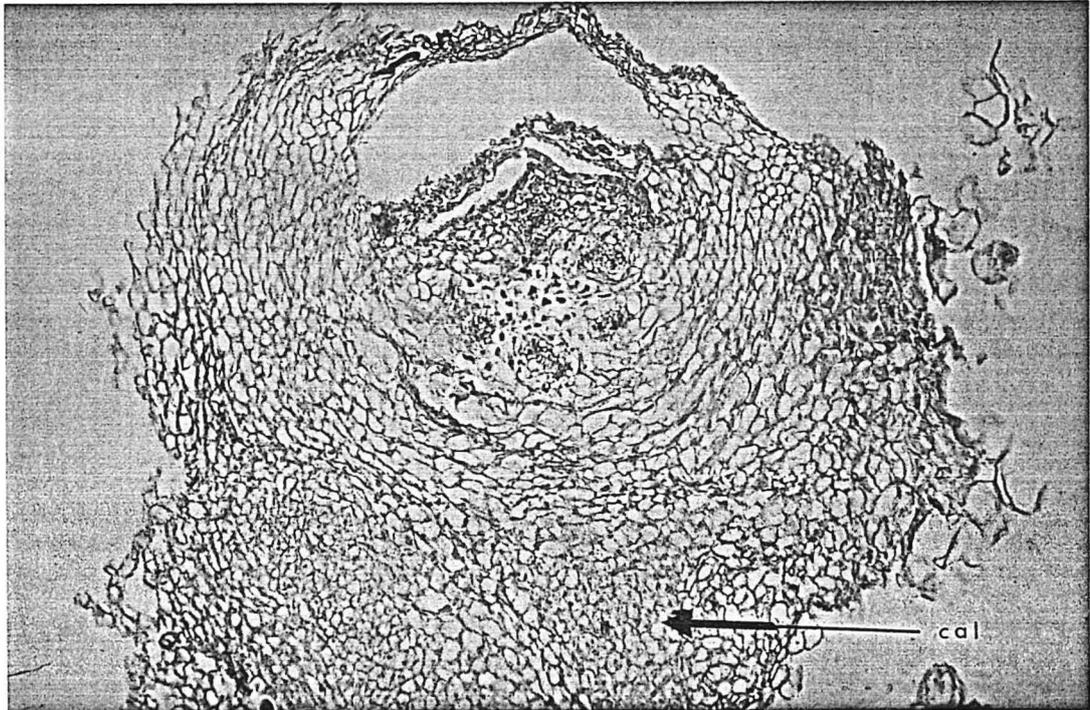
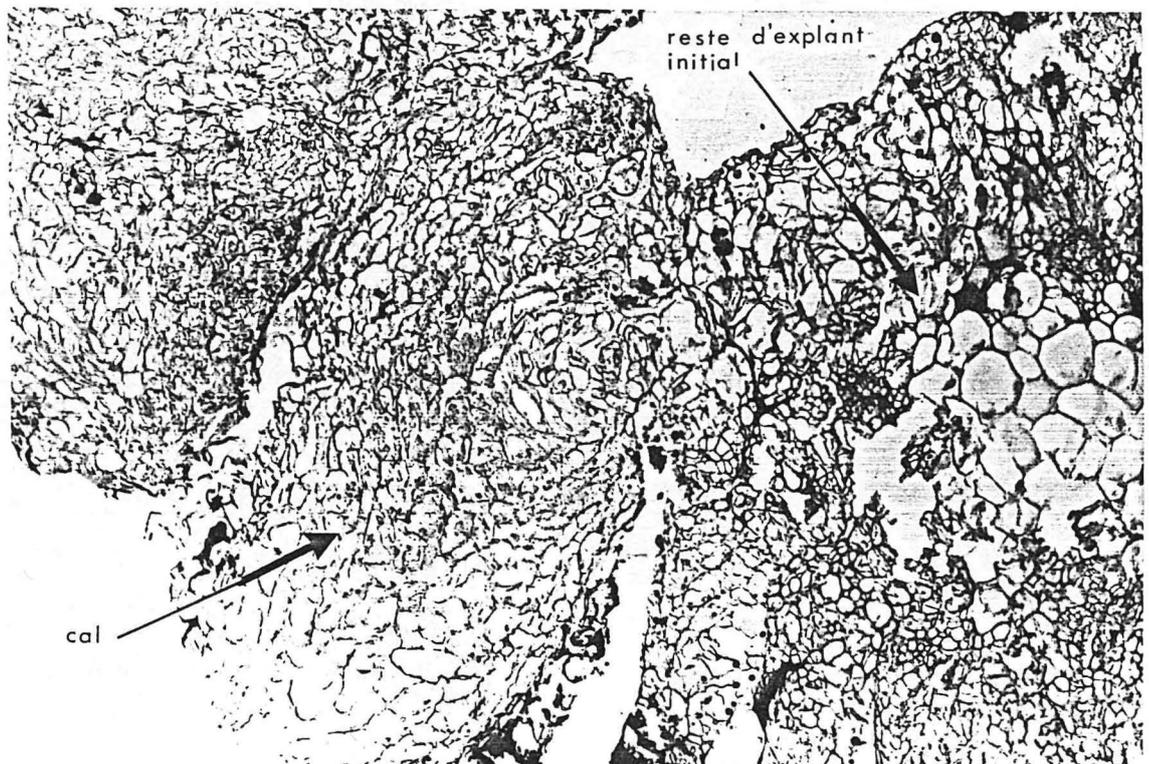


PHOTO 28 : Cal reliant les néoformations à l'explant initial dont la structure est peu modifiée. (G x 50)



3.2. - Cal avec explant initial s'étant développé sur milieu pauvre en auxine

Un cal mou et hyperhydrique entoure les tiges néoformées. Ce cal est composé de grande cellules très différenciées avec une large vacuole ; ceci rappelle les phénomènes décrits par KING et al. (1978) et POTRYKUS (1980) qui ont observé que, chez de nombreuses céréales, les néoformations proviennent de l'explant initial et que les cals se développent tout autour de la néoformation sans en être à l'origine (cf planche 2).

Cependant dans le cas des néoformations directes que nous avons observées sur D. alata, une prolifération cellulaire est toujours à la base des régénérations. Ce cal est relié vasculairement à l'explant initial dont la structure est peu modifiée : on reconnaît les six faisceaux libero ligneux au centre de l'explant P1 qui n'est pas désorganisé après 90 jours de culture (cf photos 27 à 28).

4 - CONCLUSION

La majorité des travaux entrepris sur l'organogenèse des Dioscoreae concerne la régénération de cals initiés et entretenus en culture non morphogène sur du 2,4-D. Certains auteurs ont obtenu de l'organogenèse de tiges (GREWAL et ATAL, 1976 ; MASCARENHAS et al., 1976 ; DATTA et al., 1981) et d'autres de l'embryogenèse somatique (SINGH, 1978 ; AMIRATO, 1982). Les deux phénomènes peuvent apparaître sur la même espèce et parfois avec les mêmes équilibres hormonaux.

Les cals des différents explants qui ont été expérimentés dans notre travail ont présenté de l'organogenèse de tige.

Il a été mis en évidence une influence déterminante du cultivar sur l'aptitude à la néoformation. Les 4 cultivars employés dans ce travail ont été choisis totalement au hasard et ils ont montré une grande diversité de réponse. Si aucune comparaison entre des génotypes différents n'a été publiée chez les Dioscoreae, il a été prouvé chez de nombreuses espèces que certains cultivars réagissent très bien et d'autres pas du tout, par exemple chez le blé (FLICK et al., 1983).

La nature de l'explant initial influe également de manière très nette sur l'organogenèse des cals. Tous les explants possédant un méristème que nous avons pu expérimenté ont donné des cals organogènes même les cultivars INRA 5.20 et Moengo V qui sont peu réactifs in vitro. Il se pourrait que ces néoformations proviennent de la dérégulation des méristèmes contenus dans l'explant initial comme l'a suggéré KING et al. (1978) pour les céréales. En effet, les noeuds et les bulbilles émettent des tiges durant les phases de callogenèse et d'entretien des cals sur des milieux très riches en 2,4 D.

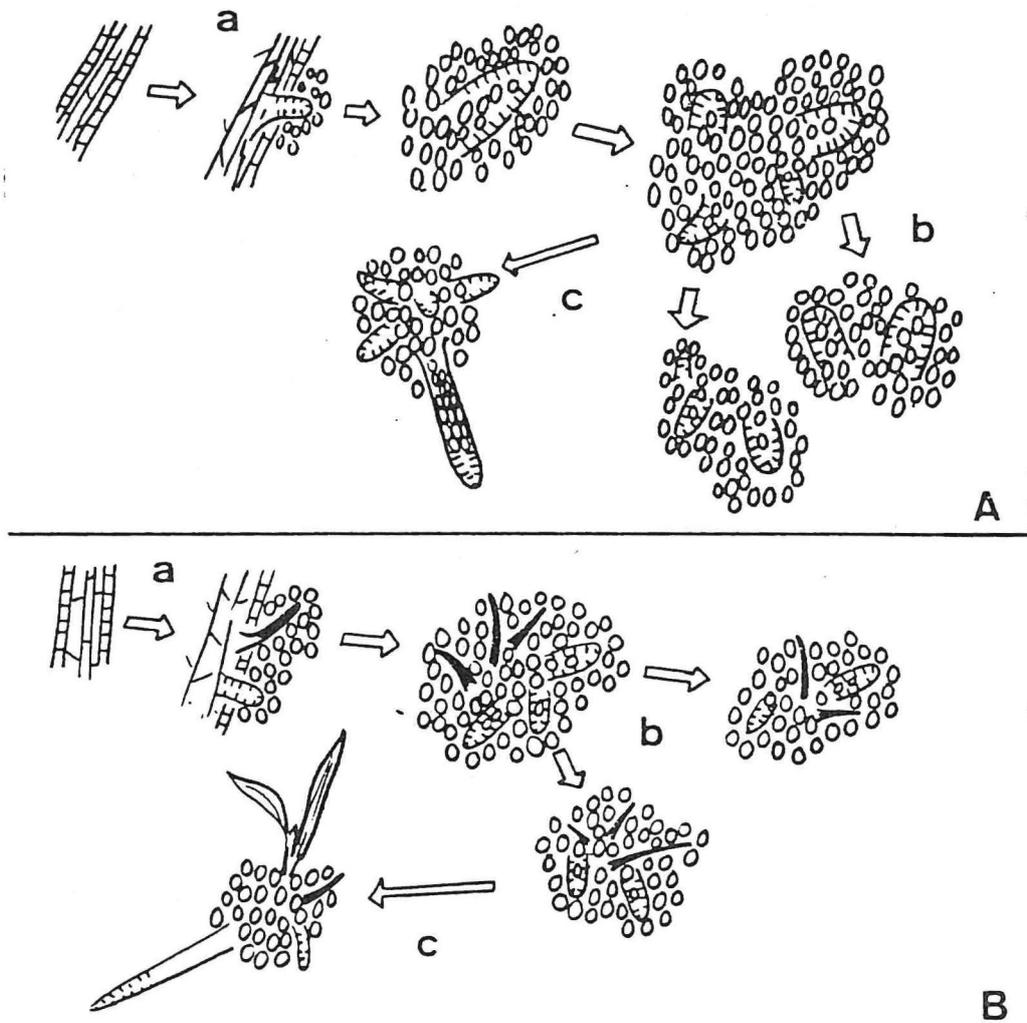


PLANCHE 2 : Représentation schématique de l'initiation et de la croissance du cal (A) et des néoformations (B) chez de nombreuses céréales (d'après KING et al., 1978).

L'équilibre et les quantités de phytohormones dans le milieu de différenciation sont importantes. Un faible niveau d'auxine est nécessaire bien que quelques néoformations aient été obtenues sur le milieu de base.

Par ailleurs, certains travaux ont obtenu de l'organogénèse directe : à partir de pulvinus proximal de feuille (SINHA et CHATURVEDI, 1979) ou de tubercule (ASOKAN et al., 1983). Dans les deux cas une légère prolifération cellulaire est à la base des néoformations. Notre étude a confirmé cette possibilité d'organogénèse directe des explants Pl de *D. alata* et elle a mis en évidence la présence d'un cal à la base des tiges néoformées.

Bien qu'il y ait une masse cellulaire peu organisée à la base des bourgeons néoformés, ce phénomène relève plutôt de la néoformation directe et présente un intérêt faible dans le cadre de notre travail qui est la recherche d'une variabilité génétique par la culture de cal. Et effectivement, nous n'avons pas observé de différence morphologique entre les vitroplants issus des néoformations directes et ceux issus de microbouturage.

Par contre, parmi les plantes régénérées à partir des cals et multipliées in vitro, certaines montrent des variations phénotypiques par rapport aux individus issus de microbouturage (cf photo 29) :

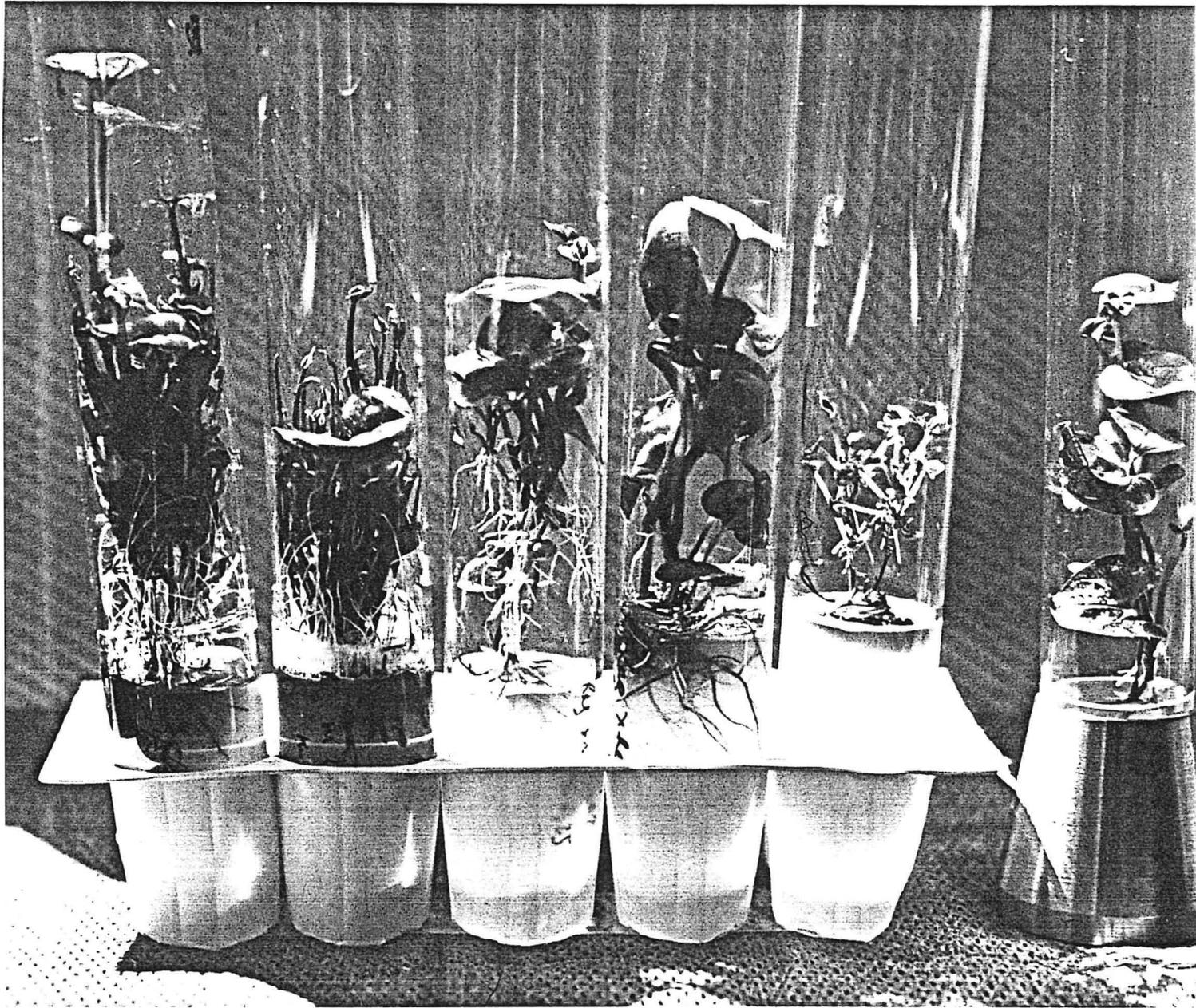
. pigmentation : certains plants sont beaucoup plus anthocyanés que d'autres : nous avons observé une influence de la présence de kinétine dans le milieu sur l'intensité de la pigmentation.

. vigueur : d'importantes différences de croissance ont été observées sur les plantes néoformées.

. ramification : les néoformations obtenues sur un milieu contenant du 2,4-D présentent un raccourcissement des tiges et un port ramifié et buissonnant. D'autre part, un passage prolongé sur milieu contenant 2 mg/l de BAP favorise la multiplication des tiges et donne une architecture plus dense.

Afin de vérifier si les différences morphologiques observées in vitro se prolongeaient après la sortie de tube, nous avons sevré 20 vitroplants issus de néoformations et présentant des architectures différentes. Nous les avons comparés à 20 vitroplants issus de microbouturage. Dans cette expérience les différences très importantes observées in vitro se sont atténuées in vivo à mesure que les plantes se développaient. Cet essai effectué sur 20 vitroplants était limité et afin de faire un criblage des variations qui pourraient être apparues, parmi toutes les néoformations que nous avons obtenues, des microboutures de plantes néoformées seront envoyées en observation à la station de Bouaké en Côte d'Ivoire et à la station INRA de Guadeloupe : 250 néoformations issues de cals différents des cultivars Brazo Fuerte et Florido seront ainsi suivies au champ et comparées à 250 témoins issus de microbouturage.

Photo 30 : Néoformations issues de cals d'explant Pl de D. alata cv Brazo Fuerte



Des néoformations ont été placées sur le milieu M50. La photo est prise après 3 mois. Le témoin issu de microbouturage est à droite. On peut observer une grande variation de vigueur et d'architecture des vitroplants.

5. RESUME

On a étudié les conditions permettant l'organogenèse à partir de cals ayant passé au moins 60 jours sur un milieu riche en 2,4D. Diverses combinaisons d'auxines et de cytokinines ont été expérimentées : l'ANA, l'AIB ou le NOA, aux concentrations de 0,5 à 1 mg/l donnent les meilleurs résultats. La présence d'une cytokinine n'est pas nécessaire. Deux facteurs se sont révélés déterminants : la nature de l'explant initial qui est à l'origine du cal et le cultivar. D'autres facteurs étudiés (la forme et la quantité d'azote dans le milieu d'organogenèse, le passé des vitroplants et la quantité d'auxine dans le milieu de callogenèse) semblent moins importants.

Il a été possible d'obtenir des néoformations de tiges directement à partir des explants P1 chez D. alata. Les milieux utilisés dans ce cas sont identiques à ceux qui ont été mis au point pour l'organogenèse à partir de cals.

Une étude histologique a été faite : les néoformations directes proviennent d'un cal réduit relié vasculairement à l'explant initial dont la structure est peu modifiée. Les néoformations à partir de cal proviennent d'un cal plus développé dans lequel la structure de l'explant initial n'est plus reconnaissable.

CONCLUSION

La sélection par hybridation chez les ignames comestibles est très limitée à cause de la déficience de leur reproduction sexuée. La culture de tissus pourrait permettre d'échapper à ces contraintes : en effet chez de nombreuses espèces polyploïdes (pomme de terre, canne à sucre...), les plantes néoformées à partir de cals ont présenté des variations somaclonales utilisables en amélioration des plantes (LARKIN et SCOWCROFT, 1981). Mais avant de pouvoir exploiter de telles possibilités chez les ignames, il était nécessaire de définir les conditions favorables à la réussite de la culture de cals et de l'organogénèse. C'est ce que nous avons réalisé chez D. alata et D. trifida.

L'étude de la callogénèse et de l'organogénèse dans un but de diversification génétique n'a pas encore été abordée chez les Dioscoreae. De nombreux auteurs, ayant obtenu des néoformations de tiges à partir de cals, se proposent d'étudier par la suite la présence de variants (MASCARENHAS et al., 1976) ; DATTA et al., 1981 ; AMMIRATO, 1984 ; SENGUPTA et al., 1984), mais aucun résultat n'a été publié, à notre connaissance.

L'obtention de cals chez diverses espèces non comestibles de Dioscorea a fait l'objet de nombreux travaux mais principalement dans le but d'évaluer et d'améliorer la production de diosgénine. Peu d'auteurs se sont intéressés à la mise au point de milieux d'induction et de croissance optimale des cals : ABROSHNIKOVA et al. (1971), CHATURVEDI et CHOWDHURY (1980) pour la croissance sur milieu solide ; KAUL et STABA (1969), TAL et GOLDBERG (1982)

pour la culture en milieu liquide).

Chez les espèces comestibles de Dioscorea, la callogénèse et l'organogénèse ont été peu étudiées : certains travaux ont montré la possibilité d'obtenir des cals à partir des noeuds et des jeunes feuilles immatures, mais sans organogénèse (ARNOLIN, 1980 ; AMMIRATO, 1982). D'autre part, dans un but de multiplication conforme rapide, des néoformations de tiges ont été obtenues à partir de tubercule ou de bulbille après une courte phase callogène (ASOKAN et al., 1983 et KOUASSI et al. 1984) et directement à partir de feuilles dressées (SINHA et CHATURVEDI, 1979).

Notre étude est donc un travail de "défrichage" dont les résultats tant négatifs que positifs devraient permettre d'orienter des recherches ultérieures afin de déboucher sur l'obtention et l'utilisation de variations somaclonales.

Les explants employés dans cette étude ont été prélevés sur des vitroplants car ce type de matériel présente, chez de nombreuses espèces, des capacités organogènes supérieures à celles d'organes prélevés in vivo (PANNETIER et al., 1981).

Dans une première partie nous avons expérimenté l'aptitude à la callogénèse et à la néoformation de tiges de divers organes. Certains d'entre eux, les noeuds, les microbulbilles, les fragments de feuilles avec pulvinus et les hypocotyles de graines germées in vitro ont permis à la fois la callogénèse, puis

l'organogenèse de tiges. Parmi ceux-ci, les seuls explants, dépourvus de méristème sont, d'après les études anatomiques faites sur Dioscoreae (AYENSU, 1972 ; ESPIAND, 1983), les fragments de feuilles. L'explant P, formé du pulvinus distal et d'un fragment de limbe comprenant le départ des nervures a été choisi pour la poursuite de ce travail. Une étude anatomique a confirmé qu'il ne contient ni méristème primaire, ni méristème secondaire. Le cal se forme à partir des cellules périvasculaires. A notre connaissance, aucune étude histologique de l'origine des cals ou des néoformations chez les Dioscoreae, n'a été publiée. Nous avons concentré tout notre effort sur cet explant car c'est un matériel de départ à priori plus favorable à l'obtention de variabilité ultérieure que les explants contenant un méristème. Il n'a pas été utilisé dans les travaux précédents, mais SINHA et CHATURVEDI (1979) ont montré la possibilité d'organogenèse directe à partir du pulvinus proximal de feuilles dressées. Nos résultats se retrouvent chez d'autres plants ; les fragments de feuille sont parmi les explants les plus réactifs chez un grand nombre de Monocotylédones : Asparagus (JULIEN, 1974), Saccharum (CHAGVARDIEFF et al., 1981), Pennisetum (HAYDU et VASIL, 1981)... Par contre, les tubérisations sont plus rarement retenues comme explants initiaux sur d'autres espèces que l'igname. Elles ont parfois été utilisées chez la pomme de terre (MIX et SIXIN, 1983) et la patate douce (YAMAGUSHI et NAKAJIMA, 1974), mais pas, à notre connaissance, chez le manioc ou la betterave.

Nous avons ensuite mis au point un milieu de callogenèse convenant à l'explant P. Ce milieu doit contenir une auxine très

active (2,4-D ; α -2,4,5-T ou MCPA entre 3 et 6 mg/l ou picloram entre 0,5 et 3 mg/l) associée à une dose moyenne de sucre (environ 30 g/l). La présence d'une cytokinine n'est pas indispensable mais elle peut être utile (à des concentrations comprises entre 0,25 et 1 mg/l) pour prévenir le développement de racines néoformées sur l'explant initial ou sur le cal. L'intensité de la callogenèse est nettement plus faible chez D. trifida que chez D. alata. Les travaux précédents avaient étudié l'influence du 2,4-D, de l'AIA et de l'ANA et seul, le 2,4-D, éventuellement associé à l'AIA ou à l'ANA, avait été retenu pour l'induction de la callogenèse. Nous avons montré que d'autres auxines peuvent l'induire mais elles ne sont pas plus efficaces que le 2,4-D et, en conséquence nous avons conservé cette auxine pour notre travail. L'influence de la concentration en 2,4-D, saccharose et kinétine a été étudiée. Un plan centré composé a permis de faire varier simultanément ces trois facteurs afin de préciser leurs combinaisons optimales et les interactions qui pouvaient exister entre eux. Une interaction entre le 2,4-D et la kinétine se dégage ainsi qu'une influence significative de la concentration en sucre sur la callogenèse. Ceci a permis de définir le milieu de callogenèse MC qui convient non seulement à l'explant P mais également à d'autres organes (bulbilles, noeuds, limbes, racines, hypocotyles de plantules). Ce milieu a un niveau élevé d'auxine mais les Monocotylédones exigent généralement de fortes teneurs en auxine et peu ou pas de cytokinines : 5 mg/l de 2,4 D pour l'induction des cals de blés (EAPEN et RAO, 1982), 7 mg/l pour la canne à sucre (GUIDERDONI, 1984) et jusqu'à 10 mg/l sur Panicum (LU et VASIL, 1981).

Nous avons également mis au point un milieu d'entretien des cals qui permet leur croissance indéfinie.

D'autre part, une influence significative de la température sur l'induction et la croissance des cals est apparue. La température optimale est variable selon les espèces. A notre connaissance, le rôle de la température des chambres de culture n'a pas été étudié chez les Dioscoreae cultivées in vitro. Il semble cependant que ces deux espèces aient des exigences assez strictes en température : une différence de 2° C entraîne des modifications significatives dans l'induction et l'évolution des cals.

Notre étude a également permis de définir les conditions d'organogenèse à partir de cals d'explants P initiés et entretenus sur des milieux riches en 2,4-D. Le milieu d'organogenèse doit contenir une auxine (ANA, AIB ou NOA à des concentrations de 0,5 à 1,0 mg/l) associée à une dose moyenne de saccharose (20 à 30 g/l). La présence de cytokinines, d'adénine ou de glutamine n'est pas nécessaire. Elles auraient même un effet dépressif. La forme et la quantité des macroéléments contenus dans le milieu minéral semble influencer l'organogenèse, et en particulier le milieu minéral de SINGH (1978) nous a donné parfois de meilleurs résultats que celui de MURASHIGE et SKOOG.

D'après cette étude trois facteurs influencent significativement le pourcentage de néoformations :

- la nature de l'explant initial : les noeuds et les bulbilles se révèlent les plus favorables, et parmi les explants sans méristème : les fragments de feuilles contenant un pulvinus ;

- l'espèce et le cultivar : dans ce travail, D. alata a fourni un nombre de néoformations très supérieur à D. trifida, et

chez D. alata, le niveau d'organogenèse à partir d'explants P1 est assez élevé pour le cv Florido alors qu'il est resté faible pour le cv Brazo Fuerte ;

- le niveau hormonal dans le milieu de callogenèse.

D'autre part, chez D. alata, nous avons observé une prolifération cellulaire lente associée à des pourcentages de néoformations de tiges assez élevés sur des explants P1 placés directement sur un milieu organogène. Un cal réduit est à l'origine de ces régénérations et l'étude cytologique semble indiquer qu'il s'agit de néoformations directes. Ces résultats rappellent ceux obtenus par SINHA et CHATURVEDI (1979) sur les pulvini de feuilles dressées et par ASOKAN et al., (1983) sur bulbilles. Nous avons noté qu'un temps de passage court (2 à 5 jours) sur un milieu riche en auxine augmente ce taux de néoformations. D'après les études réalisées sur d'autres plantes, la variabilité observée parmi les néoformations directes est très faible. Ce type de régénérations ne présente donc pas d'intérêt pour l'obtention de variations somaclonales. Mais il pourrait trouver son utilité pour la multiplication végétative rapide in vitro, comme dans les cas du palmier à huile (AHEE et al., 1981) et de l'Anthurium (EAPEN et RAO, 1985).

Pour que la culture de cals puisse devenir un outil de création variétale chez les ignames comestibles, un effort important devrait être consenti à la fois en culture in vitro et sur les aspects biologiques :

- il est tout d'abord nécessaire d'obtenir une production massive de vitroplants néoformés. Or d'après nos expériences, seul le cultivar Florido présente une organogenèse abondante à partir de cals d'explants P1 (dépourvus de méristème). Par contre les cals issus des noeuds et des bulbilles sont organogènes chez toutes les variétés étudiées (mais ces explants contiennent des méristèmes). Des études complémentaires permettraient peut être de résoudre ce problème.

. Il serait souhaitable d'étudier les réactions de divers cultivars de D. alata et D. trifida. La variabilité de réponse à l'organogenèse observée entre les différents cultivars pourrait se confirmer et certains d'entre eux se révéleraient peut être suffisamment réactif in vitro pour que l'on puisse bâtir un programme de création de variabilité à partir d'explants sans méristème (tels que l'explant P1). Par ailleurs, il conviendrait également d'étendre cette étude à l'espèce D. cayenensis-rotundata qui, avec D. alata représente la majorité des ignames consommées.

. Il paraît également intéressant de tenter des traitements mutagènes sur cals issus de noeuds ou de bulbilles. Ainsi, même si ces explants sont peu favorables à l'obtention de variations somaclonales, les potentialités organogènes des cals qu'ils produisent pourraient être utilisées pour la création de mutants.

. Des études devraient être faites sur les possibilités de conservation des cals. Des cals de noeuds ou de bulbilles cultivés pendant plus d'un an en condition non morphogène pourraient donner une variation somaclonale aussi

importante que des cals d'explant sans méristème entretenu pendant moins longtemps.

- Pour la poursuite de ce travail sur les variations somaclonales il serait nécessaire de mettre au point des pressions de sélection appropriées et des tests de sélection précoces. On pourrait, par exemple, induire une résistance à l'antracnose en cultivant les cals en présence de toxines. Mais des études complémentaires sur la biologie de ces espèces qui sont mal connues doivent être réalisées. En particulier, il faudrait s'assurer que le champignon responsable de l'antracnose émet des toxines. Il serait également utile de développer les recherches sur la reproduction sexuée et l'étude des descendances chez les clones fertiles afin de mieux connaître le déterminisme génétique des caractères que l'on cherche à modifier.

B I B L I O G R A P H I E

- ABO EL-NIL M.M., 1977. Organogenesis and embryogenesis in callus culture of garlic (Allium sativum). Plant science letters, 9 : 259-264.
- ABO EL-NIL M.M. and ZETTLER F.W., 1976. Callus initiation and organ differentiation from shoot tip culture of Colocasia esculenta. Plant science letters, 9 : 259-264.
- ABROSHNIKOVA M.A., BUTENKO R.G. et SINIOUKHIN A.M., 1971. Kultura tkanei Dioscorea deltoidea kak produktentor steroidnyka saponid y senikov rastitelnye resursy, 7 (4) : 517-524.
- AHEE J., PERTHUIS P., CAS G., DUVAL Y., GUENIN G., HANOVER J., HANOVER P., LIEVOUX D., LIORÉ C., MALAURIE B., PANNETIER C., RAILLOT D., VARECHON C. et ZUCKERMAN L., 1981. La multiplication végétative in vitro du palmier à huile par embryogenèse somatique, Oléagineux, 36 (3) : 113-118.
- AKORODA M.O., 1983 a. Floral biology in relation to hand pollination of white yam. Euphytica, 32 : 831-838.
- AKORODA M.O., 1983 b. Variation, heritability and genetic advance of eight characters in white yam. Theor. appl. genet. 66 : 51-54.
- AKORODA M.O., WILSON J. and CHIEDA H.R., 1984. The association of sexuality with plant traits and tuber yield in white yam. Euphytica, 33 (2) : 435-442.
- ALEXANDER J. and COURSEY D.G., 1969. the origin of yam cultivation. In : The domestication and the exploitation of plants and animals, UCKO P.J. et DIMBLEBY G.W., DUCKWORTH, London, 405-425.
- AMINUDDIN and CHOWDHURY A.R., 1983. Production of diosgenin in somatic callus tissues of Dioscorea floribunda. Planta Med. 48 (2) : 92-93.
- AMMIRATO P.V., 1982. Growth and morphogenesis in cultures of the monocot yam Dioscorea. In : Plant tissue culture, FUJIWARA A., Ed., Marussen, Tokyo, 169-170.
- AMMIRATO P.V., 1983. Embryogenesis. In : Handbook of plant cell culture, vol. 1. EVANS D.A., SHARP M.R., AMMIRATO P.V. et YAMADA Y. Ed, Macmillan publishing Co, New-York, 82-123.
- AMMIRATO P.V., 1984. Yams. In : Handbook of plant cell culture, vol. 3, AMMIRATO P.V., EVANS D.A., SHARP W.R. et YAMADA Ed., Macmillan publishing Co, New-York, 327-354.
- ARAKI H., HARADA T. and YAKUWA T., 1983. Some characteristics of interspecific hybrids between Dioscorea japonica and Dioscorea opposita. J. Japan, Soc. hort. sci., 52 (2) : 153-158.
- ARNOLIN R., 1976. Essais de culture d'anthers d'igname cousse couche Dioscorea trifida. DEA d'amélioration des plantes, univ. Paris-sud, centre Orsay, 18 p.

ARNOLIN R., 1980. Culture in vitro et amélioration de l'igname (Dioscorea). In : les colloques de l'INRA. L'igname. Séminaire international, Pointe à Pitre, 23 juillet - 2 août 1980, INRA, Paris, 255-268.

ARSENE M., 1979. Etude de phénovariants par culture de tissu chez Dioscorea alata et Dioscorea trifida. DEA d'amélioration des plantes, univ. Paris-sud, centre Orsay, 11 p.

ASAHIRA T. and NITSCH J.P., 1968. Tubérisation in vitro : Ullucus tuberosus et Dioscorea. Bull. soc. Bot. Fr., 115 : 345-352.

ASAHIRA T. and NITSCH J.P., 1969. Effect of polarity and Kinetin on the browning reaction of Dioscorea batatas et D. japonica. Planta, 84 : 292-294.

ASOKAN M.P., O'HAIR S.K. and LITZ R.E., 1983. In vitro plant development from bulbil explants of two Dioscorea species. Hortscience, 18 (5) : 702-703.

AYENSU E.S., 1972. Anatomy of the monocotyldeons IV Dioscoreales. METCALFE C.R. Ed., Clarendon Press, Oxford, 182 p.

BACCOU J.C., 1984. le fenugrec : son intérêt comme source de sapogenines stéroïdiques, de protéines, d'huile... essai de valorisation. Thèse USTL, Montpellier, Doctorat d'état mention science, 348 p.

BAHUCHET S., 1982. Une société de chasseurs cueilleurs et son milieu de vie : les pygmées Aka de la forêt centrafricaine. Thèse de 3ème cycle des Hautes Etudes en sciences sociales, Paris, 616 p.

BALAGNE M., 1985. Le microbouturage in vitro de l'igname cousse couche Dioscorea trifida en vue de son application pour la guérison des variétés atteintes de viroses. Thèse de 3ème cycle USTL, Montpellier, 144 p.

BAUDIN P., 1956. Maladies parasitaires des ignames de Côte d'Ivoire. Revue de mycologie, tome 21 : 87-111.

BECKERT M. et POLLACSEK M., 1979. Expression de la variabilité génétique du maïs (Zea mays) en différentes conditions de culture de tissus. Ann. amélio. plantes, 29 (5) : 563-581.

BEHNKE M., 1979. Selection of potatoe callus culture for resistance to culture filtrates of Phytophthora infestans and regeneration of resistant plants. Theor. and appl. genet., 55 : 69-71.

BELL J., 1982. Essai d'obtention et de culture de protoplastes chez l'igname. DEA de dev. et am. des vég. sup. univ. Paris-sud, centre Orsay, 13 p.

BELLIARD G. et PELLETIER G., 1978 a. Les fusions de protoplastes. Le sélectionneur français, 1978, 26 : 51-56.

BELLIARD G., et PELLETIER G., 1978 b. Hybridation cytoplasmique par fusion de protoplastes chez Nicotina tabacum. Physiol. veg. 16 (3) : 441-448.

BELOT J.L., 1983. Culture de tissus et induction de l'organogenèse chez la féverole (Vicia faba var minor). Etude cytogénétique des cals et des plantes néoformées. Thèse de Docteur ingénieur, ENSAM, Montpellier, 184 p.

BERTIN J., HEMARDINQUER J.J., KEUL M. and RANGLES W.G.L., 1971. Atlas des cultures vivrières, atlas of food crops. Ecole pratique des hautes études, Mouton et co, 1971.

BHOJWANI S.S. and RAZDAN M.K., 1983. Plant tissue culture, theory and practice. Elsevier, Amsterdam, 502 p.

BINDING H., NEHLS R., SCHIEDER O., SOPORY S.K. and WENZEL G., 1978. Regeneration of mesophyll protoplasts isolated from dihaploids clones of Solanum tuberosum. Physiol. plant 43 : 52-54.

BINDING H., NEHLS R. and JORGENSEN J., 1982. Protoplast regeneration in higher plants. In : Plant tissue culture 1982, FUJIWARA A; Ed., Abe Photo printing co, Tokyo, Japan : 575-578.

BOKELMANN G.S. and ROEST, 1983. Plant regeneration from protoplasts of potato (Solanum tuberosum W Bintje). Z. Pflanzenphysiol. Bd 109 : 259-265.

BOURRET D., 1973. Etude ethnobotanique des Dioscorea alimentaires ignames de nouvelle Calédonie. Doctorat de 3ème cycle. Faculté des sciences, Paris. 135 p.

BOX G.E.P. and WILSON K.B., 1951. On the experimental attainment of optimum conditions. J.R. Stat. Soc. B. 13 : 1-45.

BRANCHARD M., 1984. Application des vitrométhodes à la mise en oeuvre de programmes de sélection de plantes résistantes à des maladies. Agronomie 4 (9) : 905-911.

BRIDGE J., 1982. Nématodes of yams. In : Yams - ignames,, MIEGE J. et LYONGA S.N. Ed., Clarendon Press, Oxford : 253-264.

BRIGHT S., JARRETT V., NELSON R., CREISSEN G., KARP A., FRANKLIN J., NORBURY P., KUEH J., ROGNES S. and MIFLIN B., 1983. Modification of agronomic traits using in vitro technology. In : Plant biotechnology, MANTELL et SMITH Ed., Cambridge university press, 1983 : 251-265.

BROFERTJES C., 1969. Induced mutations and breeding methods in vegetative propagated species. In : induced mutations in plants. International atomic energy agency, Vienna 1969 : 325-329.

BROFERTJES C., 1972. Improvement of vegetatively propagated crops by ionizing radiation. In : Induced mutations and plant improvement. International atomic energy agency, Vienna, 1972 : 293-299.

BUFFON M., 1980. La pépinière centrale d'ignames de la Guadeloupe. In : L'igname aujourd'hui et demain. Centre de Recherche Agronomique des Antilles et de la Guyane, INRA, Guadeloupe : 63-69.

BULLE LEGRAND M.H., 1983. Etude de la floraison des ignames en vue d'une amélioration génétique par la voie sexuée. Thèse de 3ème cycle, Univ. Paris-Sud centre Orsay, 158 p.

BURKILL I.H., 1960. The organography and the evolution of Dioscoreaceae the family of the yams. J. Linn. Soc. (Bot.) 56 : 319-412.

CARTONI-CRETTON N., 1977. Morphogenèse du tubercule de Tamus Communis à partir de la germination de la graine. Saussurea, 8 : 19-32.

CHADEFAUD L. et EMBERGER M., 1960. Traité de botanique systématique, tome II, les végétaux vasculaires fascicule 1 et 2. MASSON Ed., 1540 p.

CHAGVARDIEFF P., 1980. Culture in vitro de tissus de canne à sucre, étude des facteurs de la callogenèse et de la régénération. Thèse de docteur ingénieur. Université de Paris-sud, centre Orsay, 78 p.

CHAGVARDIEFF P., BONNEL E. et DEMARLY Y., 1981. La culture in vitro de tissus somatiques de canne à sucre. L'Agronomie tropicale, XXXVI (3) : 266-278.

CHALEFF R.S., 1983 . Isolation of agronomically useful mutants from plant cell cultures. Science, 219 : 676-682.

CHALEFF R.S. and KEIL R.L., 1982. Origins of variability among cultured cells and regenerated plants of Nicotina tabacum. In : Variability in plants regenerated from tissue culture, EARLE E. et DEMARLY Y. Ed., Praeger publishers, New-York : 175-187.

CHATURVEDI H.C., 1975. Propagation of Dioscorea floribunda obtained from in vitro culture of single node stem segments. Current science 44 (23) : 839-841.

CHATURVEDI H.C., CHOWDHURY A.R. and MITRA G.C., 1974. Morphogenesis in stem callus tissue of citrus grandis in long term culture. A biochemical analysis. Curr. Sci. 43 (5) : 139-142.

CHATURVEDI H.C. and SRIVASTAVA S.N., 1976. Diosgenin biosynthesis by tuber callus tissue cultures of Dioscorea deltoidea, Lloydia 39 : 82-83.

CHATURVEDI H.C. and CHOWDHURY A.R., 1980. Effect of growth hormones and some nitrogen source on diosgenin biosynthesis by tuber callus of Dioscorea deltoidea. Indian J. exp. biol. 18 (99) : 913-915.

CHENG T.Y. and SMITH, 1975. Organogenesis from callus culture of Hordeum vulgare. Planta 123 : 307-310.

CHEVRE A.M., 1985. Recherche sur la multiplication végétative in vitro chez le chataignier. Thèse de Doctorat, Université de Bordeaux II, 100 p.

CHINUA ACHEBE, 1973. Le monde s'effondre. Présence africaine, Paris, 254 p.

CHOWDHURY A.R. and CHATURVEDI H.C., 1980. Cholesterol and biosynthesis of diosgenin by tuber callus of Dioscorea deltoidea. Current Science 49 (6) : 237-238.

COCKING E.C., 1983. Genetic transformation through somatic hybridisation. In : Plant biotechnology, MANTELL et SMITH Ed., Cambridge university press : 241-250.

CORTES MONLLOR A., LIU L.J. and ARROYO E. 1982. An improved medium for tissue culture of yam Dioscorea sp in vitro in Puerto Rico. Phytopathology 72 (1), p. 171.

CORTES MONLLOR A. and LIU L.J., 1983. Tissue culture propagation of yam in Puerto Rico. J. Agr. univ. Puerto Rico, 67 : 419-428.

COURSEY D.G., 1967. Yams, Longmans, London, 230 p.

COURSEY D.G., 1969. The future of the yam in world agriculture. An appraisal of some problems. Tropical root and tuber crops newsletter 2 : 4-8.

COURSEY D.G., 1975. The origin and the domestication of yams in Africa. In : Origins of African plant domestication, HARLAN J.R. Ed., the Hague, 383-407.

COURSEY D.G., 1976. Yams, Dioscorea sp (Dioscoreaceae). In : Evolution of crop plants. SIMMONDS N.W. Ed., Longman, London, 70-74.

CRONAUER S. et CRIKORIAN A.D., 1983. Somatic embryos from cultured tissues of triploid plantains Musa AAB. Plant cell reports, 2 : 289-291

DAGNELIE P., 1969. Théorie et méthodes statistiques. Vol 1. Les presses agronomiques de Gembloux, 378 p.

DAGNELIE P., 1970. Théorie et méthodes statistiques vol. 2. Les presses agronomiques de Gembloux, 242 p..

DALE P.J., 1981. The prospect for increasing genetic variability by tissue culture at the welsh plant breeding station. Journal of the agricultural society 1981, vol. 62, univ. college of Wales, 117-125.

D'AMATO F., 1978. Chromosome number variation in cultured cells and regenerated plants. In : frontiers of plant tissue culture 1978, THORPE Ed., univ. of Calagary, Calagary, Canada, 287-295.

DATTA S.K. et DATTA K., and DATTA P.C., 1981. Propagation of yam - Dioscorea composita - through tissue culture. In : Proc. COSTED symp. on tissue culture of economically important plants. Singapore, RAO AN Ed., 90-93.

DE BUYSER J. et HENRY Y., 1979. Androgenèse sur les blés tendres en cours de sélection. Z. Pflanzenzüchtg 83 : 40-56.

DE BUYSER J. and HENRY Y., 1980. Induction of haploid and diploid plants through in vitro anther culture of haploid wheat ($n = 3x = 21$), theor. appl. genet., 57 : 57-58.

DE FOSSARD R.A., 1976. Tissue culture for plant propagators. The university of New England, Armidale, Australia, 409 p.

DEGRAS L., 1976. Etude d'une igname, Dioscorea alata, bulbifère et spontanée aux Antilles. Journal d'Agriculture tropicale et de botanique appliquée 23 : 159-182.

DEGRAS L., 1980. La pépinière centrale d'igname de la Guadeloupe. In : L'igname aujourd'hui et demain, INRA, Petit Bourg, Guadeloupe, 63-68.

DEGRAS L., 1982. Les problèmes d'amélioration génétique de l'igname vus à travers celle de Dioscorea trifida. In : Yams, ignames, MIEGE J. et LYONGA S.N., Ed., Clarendon press, Oxford, 3-16.

DEGRAS L., 1983. Different behaviour of cultivars of D. alata and D. trifida cultivated in vitro. Communication présentée au Caribbean regional workshop on tropical root, Jamaïque, 1983.

DEGRAS L., 1984. Bases biologiques de l'amélioration des ignames alimentaires. Compte-rendu des journées de l'igname, Paris 10-11 mai 1984.

DEGRAS L., ARNOLIN R. et POITOUT R., 1980. Les principaux défauts de l'igname coussu couché et les recherches pour leur correction génétique. in : L'igname, séminaire International de Pointe à Pitre, les colloques de l'INRA, Paris, 281-287.

DEGRAS L. et KERMARREC, 1976. Introduction, nématodes et bouturage des ignames. Nouv. agronom. Antilles, Guyane 2 (1) : 1-14.

DEMARLY Y., 1976. La notion de programme génétique chez les végétaux supérieurs. I, aspects théoriques. Ann. amélior. plantes, 26 (2) : 117-138.

DEMARLY Y., 1984. Déterminisme épigénétique de la variabilité des plantes cultivées in vitro. Communication présentée au Symposium euro arabe sur la culture de tissus végétaux et ses applications en agriculture. Tunis, 28-31 mai 1984.

DOKU E.V., 1982. Sterility in female white yam, Dioscorea rotundata. In : Yams - ignames, MIEGE J. et LYONGA S.N., Ed., Clarendon press, Oxford : 3-43.

- DUMONT R., 1984 a. La production de l'igname en Côte d'Ivoire. IRA, 1984, 52 p.
- DUMONT R., 1984 b. Programme ignames, rapport annuel, 1983. IDESSA, Bouaké, Côte d'Ivoire, 104 p.
- DUMONT R., 1985. Les stratégies de multiplication chez les ignames sauvages ouest-africaines. Communication présentée au VIIème symposium ISTRC, Guadeloupe, 1-6 juillet 1985, 11 p.
- DUNSTAN D.I., SHORT K.C., DHALIWAL H. and THOMAS E., 1979. Further studies on plantlet production from cultured tissue of Sorghum bicolor. Protoplasma, 101 : 355-361.
- DUNWELL J.M. and SUNDERLAND, 1973. Anther culture of Solanum tuberosum. Euphytica 22 : 317-323.
- DURAND-CRESSWELL and NITSCH C., 1977. Factors influencing the regeneration of Eucalyptus grandis by organ culture. Acta Horticulturae, 78, 149-155.
- EAPEN S. et RAO P.S., 1982. Plant regeneration from callus culture of Durum and Emmer wheat. Plant cell reports (1) : 215-218.
- EAPEN S. et RAO P.S., 1985. Regeneration of plants from callus culture of Anthurium patulum, Current Science 54 (6) : 284-286.
- EDWIGE S., 1979. Contribution à l'étude des maladies de l'igname Dioscorea sp en Guadeloupe, mémoire de fin d'étude ENSA, 47 p.
- ESPIAND H., 1983. Conséquence de la culture in vitro sur la morphogenèse de boutures nodales de l'igname (Dioscorea alata cu Tahiti), thèse de 3ème cycle, spécialité dev. et am. des vég., univ. Paris XI, centre Orsay, 80 P.
- ESSAD S., 1984. Variation géographique des nombres chromosomiques de base et polyploidie dans le genre Dioscorea à propos du dénombrement des espèces transversa, pilosiuscula et trifida. Agronomie 4 (7) : 611-617.
- EVANS D.A., SHARP W.R. and MEDINA-FILHO H.P., 1984. Somaclonal and gametoclonal variation. Amer. J. bot. 71 (6) : 759-774.
- FERGUSON T.V., 1972. The propagation of Dioscorea sp by vine cuttings : a critical review. Tropical root and tuber crops newsletter 5 : 4-7.
- FITCH M.M., and MOORE P.H., 1983. Haploid production from anther culture of Saccharum spontaneum. Z. Pflanzenphysiol. Bd 109, (5) : 197-206.
- FLICK C.E., EVANS D.A. and SHARP W.R., 1983. Organogenesis. In : Handbook of plant cell culture vol. 1, EVANS D.A., SHARP M.R., AMMIRATO P.V. et YAMADA Y., Ed., Macmillan publishing Co : 13-81.
- GAUTHERET R.J., 1939. Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie de tissu de tubercule de carotte. C.R. Acad. Sc. 208 : 118-120.

- GAUTHERET R.J., 1959. La culture des tissus végétaux, Masson et Cie Ed., Paris, 863 p.
- GEIER T., 1982. Morphogenesis and plant regeneration from spadix fragments of Anthurium scherzenarium cultivated in vitro. In : Plant tissue culture, 1982, FUJITAWA A. Ed., Abe photo printing Co, Tokyo : 137-138.
- GENGENBACH B.G., GREEN C.E. and DONOVAN C.M., 1977. Inheritance of selected pathotoxin resistance in maize plants regenerated from cell culture. In : Proc. natl. acad. sci. USA 74 (11) : 513-517.
- GREGOIRE S., 1980. Essai de multiplication végétative in vitro de Schedium edule. Multiplication végétative in vitro de Dioscorea alata et passage au champ. Mémoire de fin d'étude, ENITA Dijon, Quetigny, 34 p.
- GREWAL S. and ATAL C.K., 1976. Plantlet formation in callus culture of Dioscorea deltoidea. Indian J. exp. biol. 14 (3) : 252-253.
- GREWAL S., KOUL S., SACHDEVA J., ATAL C.K., 1977. Regeneration of plants of Dioscorea deltoidea by apical meristem culture. Indian J. exp. biol. 15 : 201-203.
- GUIDERDONI E., 1984. Etude des cultures in vitro de tissus de cellules et de protoplastes de canne à sucre, saccharum species. Callogenèse et embryogenèse somatique. Thèse ORSAY, univ. Paris-sud, 274 p.
- GUPTA P.K., KENDURKAR S.V., KULKARNI V.M., SHIRGURKAR M.V. and MASCARENHAS A.F., 1984. Somatic embryogenesis and plants from zygotic embryos of coconut (cocos nucifera) in vitro. Plant cell reports 3 (6) : 222-225.
- HABERLANDT G., 1902. Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitz-Ber. Mat. Nat. Kl. Kais. Akad. Wiss. Wien, 111, 69-92.
- HAIN R., STEINBISS H.H. and SCHELL J., 1984. Fusion of Agrobacterium and E. COLI spheroplasts with Nicotina tabacum protoplasts. Direct gene transfer from microorganism to higher plant. Plant cell reports 3 : 60-64.
- HAMON P. et TOURE B., 1985. Etude du polymorphisme enzymatique par électrophorèse sur gel d'amidon de quelques populations d'ignames spontanées cultivées en Côte d'Ivoire. Communication présentée au VIIème symposium ISTRC, Guadeloupe, 1-6 juillet 1985.
- HANOVER J. et HANOVER P., 1984. inhibition and stimulation en culture in vitro de l'embryogenèse des souches issues d'explants foliaires de palmiers à huile. C.R. Acad. sc. Paris, t. 298, série III, n° 2 : 45-48.
- HAQUE S.Q. and MANTEL S.H., 1980. Status of the virus diseases of yam (Dioscorea sp) in the Common Wealth Caribbean. In : L'igname, séminaire international de Pointe à Pitre, 28 juillet - 2 août, 1980. Edition : les colloques de l'INRA, Paris, 101-105.

HARADA T. and YAKUWA T., 1983. Studies on the morphogenesis of asparagus : effect of sugar on callus formation and organ formation in the in vitro culture of shoot segments of seedlings. Journal of the faculty of agriculture, Hokkaido univ. 61 (3) : 307-314.

HARM C.T., 1983. Somatic hybridization by plant protoplast fusion. Epreuves du congrès de Bâle, août 1983.

HAYDU Z. and VASIL I.K., 1981. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissues and anthers of Pennisetum purpureum. Theor. appl. genet. 59 : 269-273.

HELLER R., 1968. Manuel de statistiques biologiques. Gauthier villar, Paris, 296 p.

HERMSFN J.G. and VERDENIUS J., 1973. Selection from Solanum tuberosum group phureja of genotypes combining high frequency haploid induction with homozyposity for embryo spot. Euphytica 22 : 244-259.

HERMSFN J.G. and RAMADA M.S., 1981. Haploidy in plant breeding. In : Manipulation of genetic systems in plant breeding, REES, RILEY, BREEZE et LAW, Ed., the royal society, London : 99-106.

HLADIK H., BAHUCHET S., DUCATILLON C., et HLADICK C.M., 1984. Les plantes à tubercules de la forêt dense d'Afrique centrale. Rev. écol. (Terre et vie), 39 : 249-290.

HUANG L.C. and MURASHIGE T., 1983. Tissue culture investigation in bamboo. Pot. Bull. Academia Sinica, 24 : 31-52.

HUNAUULT G., 1973. Influence de diverses concentrations d'acide 2,4 dichloro phénoxyacétique et de benzyladénine sur la croissance de tissus d'asperge (Asparagus officinalis) cultivés in vitro. C.R. Acad. sc., t. 276 serie D : 3135-3138.

HUNAUULT G., 1978. Recherche sur le comportement des fragments d'organes et des tissus de Monocotylédones cultivés in vitro. Considérations historiques. Rev. gen. Bot. 85 : 305-351.

HUNAUULT G., 1979 a. Recherches sur le comportement des fragments d'organes et des tissus de Monocotylédones cultivées in vitro. II. Etude du cas de quelques Agavacées. Rev. cytol. biol. veg. bot., 2 : 21-66.

HUNAUULT G., 1979 b. Recherches sur le comportement des fragments d'organes et des tissus de Monocotylédones cultivées in vitro. III. Etude du cas de plusieurs Liliacées. Rev. cytol. biol. veg. bot., 2 : 103-154.

HUNAUULT G., 1979 c. Recherches sur le comportement des fragments d'organes et des tissus de Monocotylédones cultivées in vitro. IV. Etudes de quelques espèces appartenant à des familles autres que les Agavacées et les Liliacées. Rev. cytol. biol. vég. biot. 2 : 231-258.

HUNAUJT G., 1979 d. Recherches sur le comportement des fragments d'organes et des tissus de Monocotylédones cultivées in vitro. V. Discussion. Rev. cytol. biol. vég. bot. 2 : 259-287.

IITA Annual Reports, 1974 à 1982. International Institute of Tropical Agriculture. Ibadan, Nigeria.

IKEDIIOBI L.O. and IGBOANUSSI L.C., 1983. Identification of yam (Dioscorea sp) species and cultivars by use of electrophoretic patterns of soluble tuber proteins. Biotropica 15 (1) : 65-67.

JAUBERTIE P.J., LAFOUASSE M., BERVILLE A., BRANCHARD M., CASSINI R., CORNU A., DESHAYES A. et VUILLAUME E., 1978. Recherche de variants résistants à des toxines par la technique de culture de cellules et de tissus végétaux. Physiol. vég. 1978, 16 (3) : 401-409.

JOHNSON L.B., STUTEVILLE D.L., SCHARBAUM S.E. and SKINER D.Z., 1984. Variation in phenotype and chromosome number in alfalfa protoclonés regenerated from nonmutagenized calli. Crop Science, 24, 948-951.

JOS J.S. and VIJAYA BAI K., 1980. Overcoming the high female sterility in an Asian species of Dioscorea. In : National seminar on tuber crop production technology. Faculty of horticulture. Tamil Nadu agricultural university : 161-164.

JULLIEN M., 1974. La culture in vitro de cellules du tissu foliaire d'Asparagus officinalis : obtention de souches à embryogenèse permanente et régénération de plantes entières. C.R. acad. sc. Paris, 279, série D : 747-750.

KARANOVA S.L. and SHAMINA Z.B., 1978. The direction of selection of genetically heterogeneous cell population of Dioscorea deltoidea. Biologica Plantarum 20 (2) : 86-92.

KARANOVA S.L., SHAMINA Z.B. and BUTENKO R.G., 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. and STABA E.J., 1968. Dioscorea tissue culture : I. Biosynthesis and isolation of diosgenin from Dioscorea deltoidea callus and suspension cells. Lloydia 31 (2) : 171-179.

KERMARREC A., DEGRAS L. et ANAIS A., 1980. Le nématode de l'igname Scutellonema bradys dans la Caraïbe : distribution et quarantaine internationale. In : l'igname, séminaire international, Pointe à Pitre, 28 juillet - 2 août 1980, les colloques de l'INRA, Paris : 75-84.

KHANNA P., SHARMA G.L., RATHORE A.K. and MANOT S.K., 1977. Effect of cholesterol on in vitro suspension tissue culture of Costus speciosus, Dioscoreae floribunda, Solanum aviculare et Solanum xanthocarpum. Indian J. exp. biol. 15 : 1025-1027.

KHANNA P., RATHORE A.K. and MANOT S.K., 1980. Production of steroids in static tissue culture of Dioscorea floribunda. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences 42 (3) : 98-99.

KING P.J., POTRYKUS I. and THOMAS E., 1978. In vitro genetics of cereals : problems and perspectives. Physiol. veg. 16 (3) : 381-399.

KOCHBA J. and BUTTON J., 1974. The stimulation of embryogenesis and embryoid development in habituated ovular callus from the shamouti orange (Citrus sinensis) as affected by tissue age and sucrose concentration. Z. Pflanzenphysiol. Bd 73 : 415-424.

KOUASSI B., VASSEUR J., FOURNET B. et DUBOIS J., 1984. Activités invertasiques des cultures de tissus de Dioscoreae. Rev. cytol. biol. veg. bot., 7 : 97-108.

KRISHNAMURTHI M. and TLASKAL J., 1974. Fiji disease resistant Saccharum officinarum var pindar sub clones from tissue cultures. In : Proc 15th ISSCT, 1974 : 130-137.

LARKIN P.J. and SCOWCROFT W.R., 1981. Somaclonal variation. A novel source of variability from cell culture for plant improvement. Theor. appl. genet. 60 : 197-214.

LARKIN P.J., BRETEIL R., RYAN S. and SCOWCROFT W., 1983. Protoplast and variation from culture. Communication présentée au congrès de Bâle, août 1983.

LARKIN P.J. and SCOWCROFT W.R., 1983. Somaclonal variation and eye spot toxin tolerance in sugarcane. Plant cell tissue and organ culture 2 : 111-121.

LAWRENCE W.A. and DAVIES D.R., 1985. A method for the microinjection and culture of protoplasts at very low densities. Plant cell reports 4 : 33-35.

LAWTON J.R.S. and LAWTON J.R., 1967. The morphology of the dormant embryo an young seedling of fire species of Dioscorea from Nigeria. Proc. linn. soc. lond., 178 (2) : 153-159.

LINSMAIER E.M. and SKOOG F., 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture. Physiologia plantarum 18 : 100-127.

LU C. and VASIL I.K., 1981. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissue of Panicum maximum. Theor. appl. genet. 59 : 275-280.

MABANZA J., 1984. La culture in vitro des protoplastes du manioc (Manihot esculenta). Etude des possibilités d'induction d'une résistance a la bactériose provoquée par le Xanthosomas manihotis. Thèse de doctorat d'état, mention science, USTL, Montpellier, 193 p.

MANTELL J.H., HAQUE S.Q. and WHITEHALL A.P., 1978. Clonal multiplication of Dioscorea alata and Dioscorea rotundata yam by tissue culture. J. Hort. sci. 53 : 95-98.

- MANTHILL S.H., HAQUE S.Q. and WHITEHALL A.P., 1980. Apical meristem tip culture for eradication of flexuous Rod viruses in yams Dioscorea alata), Tropical pest management 26 (2) : 170-179.
- MAPIES M.O. and URATA U., 1970. Aseptic stem culture of a Dioscorea clone. In : Tropical root and tuber crops to morrow vol. II, Proc. 2nd Intern. symp. trop. root tuber crops, Hawai : 25-27.
- MARGARA J., 1978. Mise au point d'une gamme de milieux minéraux pour les conditions de la culture in vitro. Compte rendu des séances de l'Académie d'Agriculture de France, 1978, Paris, 64 (8) : 654-661.
- MARGARA J., 1984. Bases de la multiplication végétative. Les méristèmes et l'organogenèse. INRA, Paris, 262 p.
- MARKER, WAGNER R.D., WITTBECKER E.L., GOLDSMITH P.J. and RUOF C.M., 1947. Steroidal sapogenins, J. Am Chem. Soc. 69 : 2167-2230.
- MARSHALL J.G. and STABA E.J., 1976. Hormonal effect on diosgenin biosynthesis and growth in Dioscorea deltoidea tissue culture. Phytochemistry, 15 : 53-55.
- MARTIN F.W., 1966. Sex ratio and sex determination in Dioscorea. The Journal of heredity 57 (3) : 95-99.
- MARTIN F.W., 1972. Potencialidades para mejorar los names que contienen sapogeninas. In : Primer simposio internacional sobre Dioscorea, Mexico, : 91-110.
- MARTIN F.W., 1976. Tropical yams and their potential. Part. 3. Dioscorea alata. USDA Agriculture handbook n° 495, 40 p.
- MARTIN F.W., CABANILLAS and ORTIZ S., 1963. Natural pollination hand pollination and compatibility of some mexican species of Dioscorea. Trop. agric. Trinidad 40 (2) : 135-141.
- MARTIN F.W. and ORTIZ S., 1963. Chromosome numbers and behaviour in some species of Dioscorea. Cytologia, 28 : 96-101.
- MARTIN F.W., CABANILLAS E. and GUADALUPE, 1975. Selected varieties of Dioscorea alata the asian greater yam. J. agr. univ. Puerto Rico, 59 (3) : 165-181.
- MARTIN F.W. and DEGRAS L., 1978a. Tropical yams and their potential. Part 5. Dioscorea trifida. USDA Agriculture handbook n° 522. 26 p.
- MARTIN F.W. and DEGRAS L., 1978b. Tropical yams and their potential. Part. 6. Minor cultivated Dioscorea species. USDA agriculture handbook n° 538. 23 p.
- MASCARENHAS A.F., HENDRE R.R., NADGIR A.L., GHUGALE D.D., GODBOLE D.A., PRABHU R.A. and TAGANNATHAN V., 1976. Development of plantlets from cultured tissues of Dioscorea deltoidea. Indian J. exp. biol. 14 : 604-606.

MASTELLER V.J. and HOLDEN D., 1970. The growth and organ formation from callus tissue culture of Sorghum. Plant. Physiol. 45 : 362-364.

MATHURIN P., 1982. Nouvelle contribution à la multiplication végétative de l'igname. Sevrage et repiquages répétés des tubercules de Dioscorea alata cv Paccala. Thèse de docteur ingénieur de l'université d'Abidjan, Côte d'Ivoire, 126 p.

MBOKA A.V., 1985. Induction de la formation de bulbilles in vitro chez deux espèces d'igname Dioscorea alata et D. cayensis. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de phytogénétique ORSTOM, 36 p.

MENDIBURU A.O., PELOQUIN S.J. and MOK D.W.S, 1974. Potato breeding with haploids and 2n gametes. In : haploids in higher plants : advances and potential, K.J. KASHA Ed., University of Guelph, Canada : 249-258.

MENDOZA H.A. and HAYNE F.L., 1974. Genetic basis of heterosis for yield in the autotetraploid potato. Theor. appl. genet. 45 (1) : 21-25.

MIEGE J., 1952. Contribution à l'étude systématique des Dioscorea ouest africaines. Thèse sciences nat. Paris, 266 p.

MIEGE J., 1982 a. De quelques caractères discriminatoires entre taxons infraspécifiques de Dioscorea bulbifera. In : yams, ignames, MIEGE J. et LYONGA S.N., Clarendon press, Oxford : 185-196.

MIEGE J., 1982 b. Etude chimiotaxonomique de dix cultivars de Côte d'Ivoire relevant du complexe Dioscorea cayensis, D. rotundata. In : yams - ignames, MIEGE J. et LYONGA S.N. Ed., Clarendon press, Oxford, 197-231.

MIEGE J., 1982 c. Appendice. Note sur les espèces Dioscorea cayensis et D. rotundata. In : yams, ignames, MIEGE J. et LYONGA S.N. Ed., Clarendon press, Oxford : 367-383.

MINUCCI J.S., TORRES LOPEZ R., HEPPERLY P.R. and RAMOS BUSIGO D., 1985. Field diseases of tropical yams (Dioscorea sp) and their control in Puerto Rico. Communication présentée au VIIème symp. ISTRC, Guadeloupe, 1-6 juillet 1985.

MIX G. et SIXIN S., 1983. Regeneration von in vitro Pflanzen aus Kartoffelknollengewebe. Landbauforschung Völkenrode, 33 (4) : 264-266.

MOMONT P., 1984. Recherche des conditions d'obtention de protoplastes chez l'igname (Dioscorea sp) et étude de leur comportement au cours des premières phases de culture. DEA, univ. Paris-sud, centre ORSAY, 12 p.

MOREL G., 1948. Recherche sur la culture associée de parasites obligatoires de tissus végétaux. Ann. Epiphyties (Série pathologie végétale). 14 : 123-234.

MOREL G. and WETMORE R.H., 1950. Tissue culture of Monocotylédones. Am. J. bot. 38 : 138-140.

MORGAN A. et COCKING E.C., 1982. Plant regeneration from protoplasts of Lycopersicon esculenta. Z. Pflanzenphysiol, Bd 106 : 97-104.

MURASHIGE T. 1974. Plant propagation through tissue culture. Ann. rev. plant physiol., 25 : 135-166.

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

NABORS M.W., 1980. Cereal tissue culture at Colorado state university. Communication présentée à la conférence sur la culture in vitro du riz, 28-30 avril 1980.

NABORS M.W., KROSKEY C.S. and Mc HUGH D.M., 1982. Green spots are predictors of high callus growth rates and shoots formation in normal and in salt stressed tissue culture of oat (*Avena sativa*). Z Pflanzenphysiol. 105 : 341-349.

NABORS M.W., HEYSER J.W., DYKE T.A. and DEMOTT K.J., 1983. Long duration, high frequency plant regeneration from cereal tissue cultures. Planta, 157 : 385-391.

NG S.Y., 1983. Root and tuber tissue culture. In : IITA Annual Report 1983, Ibadan, Nigeria : 133-134.

NG S.Y. and HAHN S.K., 1985. Application of tissue culture to tuber crops at IITA. in : Biotechnology in international agricultural research, IRRI, Manila, Philippines : 29-40.

NITSCH J.P. and NITSCH C., 1969. Haploid plants from pollen grains. Science 163 : 85-87.

NOBECOURT P., 1939. Sur la pérenité et l'augmentation de volume des cultures de tissus végétaux. C.R. Soc. Biol. 130 : 1270-1271.

NOTTEGHEM J.L., 1985. Résultats d'essais de lutte contre le flétrissement de l'igname 1982-1984. Rapport analytique de synthèse. Centre vivrier, Institut des Savanes, Bouaké, Côte d'Ivoire, 40 p.

NOZERAN R. et BANCILHON L., 1972. La culture in vitro en tant que technique pour l'approche de problèmes posés par l'amélioration des plantes. Ann. Amélior. plantes 22 (2) : 167-185.

NOZERAN R., DUCREUX G. et ROSSIGNOL-BANCILHON L., 1982. Réflexion sur les problèmes de rajeunissement chez les végétaux. Bull. soc. bot. fr. 129, lettres bot. 1982 (2) : 107-130.

NWANTIKI A.O., ODURUKWE S.O. and ELJAGU L.S., 1985. The effect of height of staking and size of planting set on some aspects of growth and vigour, severity of anthracnose disease, tuber yield and size and economics of production of water yams, Dioscorea alata. Communication présentée au VIIème symp. ISTRC, Guadeloupe 1-6 juillet 1985.

OELK M.M. and SCHIEDER O., 1983. Genotypic difference in some legume species affecting the redifferentiation ability from callus to plants. Z. Pflanzenzüchtg, 91 : 312-321.

OKEREKE O.U., 1977. Germination of yam pollen in nutrient medium. Ghana, Jnl. Agric. sci. 10 : 17-21.

OKOLI O.O., 1982. Paramètres pour la sélection de parents destinés à l'hybridation de l'igname. In : Plantes racines tropicales, stratégies de recherches pour les années 1980, TERRY, ODURO, CAVENESS Ed., IDRC, Ottawa, Canada : 173-176.

OLYMPIO H.K., 1982. L'igname au Togo. In : yams - ignames, MIEGE J., et LYONGA S.N. Ed., Clarendon press, Oxford, 173-184.

ONWUEME I.C., 1982 a. A strategy package for reducing the high labour requirements in yam production. In : yams - ignames, MIEGE J. et LYONGA S.N. Ed., Clarendon press, Oxford, 335-344.

ONWUEME I.C., 1982 b. Stratégies de recherches pour l'amélioration de l'igname en Afrique. In : Plantes racines tropicales. Stratégies de recherche pour les années 80, TERRY, ODURO, CAVENESS Ed., IDRC Ottawa, Canada, 184-187.

ONYA G.O.C., GAHAN P.B. and NORMAN H., 1984. The use of new probes for protoplast integrity following isolation and purification of protoplasts from tubers of white yam (Dioscorea rotundata). Plant science letters, 33, 231-238.

ORTEGA PACHECO L.L., 1970. Cultivo de tejidos obtenidos a partir del tuberculo de Dioscorea composita. In : Primer simposio internacional sobre Dioscoreas, Mexico, 53-73.

PAGNIEZ M. et DEMARLY Y., 1979. Obtention d'individus androgénétiques par culture in vitro d'anthere de Ray-grass d'Italie (Lolium multiflorum). Ann. amelior. plantes 29 (6) : 631-637.

PALCY L., GROLLEAU MORLET J. et JOSEPH-THEODORE B., 1985. Cinq années de lutte chimique contre l'anthracnose de l'igname aux Antilles françaises, communication présentée au VIIème symp. ISTRC, 1-6 juillet 1985.

PANNETIER C., ARTHUIS P. et LIEVOUX D., 1981. Néoformations de jeunes plantes d'Elaeis guineensis à partir de cals primaires obtenus sur fragments foliaires cultivés in vitro. Oléagineux 36 (3) : 119-122.

PANNETIER C. et BUFFARD MOREL J., 1982 a. Premiers résultats concernant la production d'embryons somatiques à partir de tissus foliaires de cocotier. Cocos nucifera oléagineux 37 (7) : 349-354.

- PANNETIER C. et BUFFARD MOREL J., 1982b. Production of somatic embryos from leaf tissues of coconuts *Cocos nucifera*. In : Plant tissue culture 1982, FUJIRAWA A. Ed., Abe photo printing Co, Tokyo, 755-756.
- PERENNEC P., 1982. Utilisation des espèces sauvages et des formes primitives dans l'amélioration de la pomme de terre. Le sélectionneur français, 1982, 30 : 13-19.
- PHILIPS G.C. and LUTEYN K.J., 1983. Effect of picloram and other auxins on onion tissue culture. J. Amer. soc. hort. sci., 108 (6) : 948-953.
- POTRYKUS I., 1979. The old problem of protoplast culture : cereals. In : Advances in protoplast research, FERENCKY and FARKAS Ed., Pergamon press, Oxford, 243-254.
- POTRYKUS, 1980. The old problem of protoplast culture : cereals. In : Advance in protoplast research, FERENCKY et FARKAS ed, Pergamon press, Oxford, 243-254.
- QURAIISHI A., ROSSIGNOL RANCILHON L. et NOZERAN R., 1979. Effet de l'origine du fragment sur la callogenèse et l'organogenèse in vitro chez *Solanum tuberosum* var. BF 15. Ann. amélior. plantes, 1979, 29 (6) : 639-663.
- RAMACHANDRAN R., 1968. Cytological studies in Dioscoreaceae. Cytologia 33 : 401-410.
- RAO A.N., 1969. Tissue culture from bulbils of Dioscorea sansibarensis. Can. J. bot., 47 : 565-566.
- RAO R., BAMMI R.K. and RANDHAWA G.S., 1973. Interspecific hybridisation in the genus Dioscorea. Ann. bot. 37 : 395-401
- REISCH B., 1983. Genetic variability in regenerated plants. In : Handbook of plant cell culture, vol. 1. EVANS D.A., SHARP M.R., AMMIRATO P.V. et YAMADA Y. Ed., Macmillan publishing Co, 749-769.
- RENARD F., 1984. Obtention de cals à partir de l'hypocotyle chez Dioscorea. Etude comparée des teneurs en sapogénines stéroïdiques dans la graine et les cals de Dioscorea. DEA mention phytotechnie, USTL, Montpellier, 67 p.
- RESEARCH GROUP OF PLANT MORPHOLOGY, 1978. The preliminary on the callus tissue culture of Dioscorea zingiberensis. Proc. of symp. on plant tissue culture, Science press, Peking, 481-484.
- RODRIGUEZ H., 1975. Rapport analytique, IRAT, Côte d'Ivoire, 44 p.
- RODRIGUEZ H., 1977. Rapport analytique, IRAT, Côte d'Ivoire, 49 p.
- RODRIGUEZ H., 1979. Rapport analytique, IRAT, Côte d'Ivoire, 94 p.
- RODRIGUEZ H., 1983. Intérêt d'une variété d'igname portoricaine en Côte d'Ivoire : la florido. L'agronomie tropicale, 38 (2) : 154-157.

ROSSIGNOL L., ROSSIGNOL M., DUCREUX G., NOZERAN R. et DARPAS A., 1984. Analyse de la variabilité d'individus néoformés à partir de calcs chez la pomme de terre Solarum tuberosum var. BF 15. Bull. soc. bot. fr. 131, lettre bot. 1984 (3) : 171-190.

SADIK S. and OKEREKE O.U., 1975 a. Flowering, pollen grain germination, fruiting, seed germination and seedling development of white yam Dioscorea rotundata. Ann. bot. 39 : 597-604.

SADIK S. and OKEREKE O.U., 1975 b. A new approach to improvement of yam Dioscorea rotundata. Nature, 254 : 134-135.

SANGLIER J.J., 1977. Plans factoriels à 2 niveaux et surfaces de réponse. ENSAM, Etablissements Sandoz à Bâle, Université de Clermont, 99 p.

SAN NOEUM L.H. and AHMADI N., 1982. Variability of doubled haploids from in vitro androgenesis and gynogenesis in Hordeum vulgare culture. In : variability in plants regenerated from tissue culture. EARLE E. et DEMARLY Y. Ed., Praeger publisher, New-York, 273-283.

SAUVAIRE D., 1980. Culture in vitro de la canne à sucre. Bouturage callogénèse, organogénèse. Thèse de docteur ingénieur USTL, Montpellier, 181 p.

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.

SAUVAIRE Y., 1984. Le fenugrec. Thèse USTL, Montpellier, Doctorat d'Etat, mention science, 348 p.

SAWADA E., YAKUWA T. et IMAKAWA S., 1958. Studies on the formation of aerial tubers in Chinese yams II ont the aerial tuber formation in sterile culture of vine segments. J. Hort. Ass., Japan, 27 : 241-244.

SCOWCROFT W.R., RYAN S.A., BREITTEL R.I.S. and LARKIN P.J., 1985. Somaclonal variation in plant improvement. In : Biotechnology in international agricultural research. International Rice Research Institute, Manila, Philippines, 99-109.

SEARS R.G. and DECKARD E.L., 1982. Tissue culture variability in wheat : callus induction and plant regeneration. Crop science 22 : 546-550.

SECOR G.A. and SHEPARD J.F., 1981. Variability of protoplast derived potato clones. Crop science 21 : 102-105.

SENGUPTA J., MITRA G.C. and SHARMA A.K., 1984. Organogenesis and tuberisation in cultures of Dioscorea floribunda. Plant cell tissue and organ culture 3 : 325-331.

SHEPARD J.F., 1982. Regeneration of potato leaf cell protoplasts. In : variability in plants regenerated from tissue culture. EARLE E.D. et DEMARLY Y., Ed., Praeger publisher, New-York, 47-57.

SHEPARD J.F. and TOTTEN R.E., 1977. Mesophyll cell protoplasts of potato. Isolation, proliferation and plant regeneration. *Plant physiol.* 60, 313-316.

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

SHEPARD J.F., BIDNEY D., BARSBY T. and KEMBLE R., 1983. Genetic transfer in plants through interspecific protoplast fusion. *Science* 219 : 683-688.

SCHENK R.V. and HILDEBRANDT A.C., 1971. Medium and techniques for induction and growth of Monocotyledonous and Dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.*, 50 : 199-204.

SIBI M., 1976. La notion de programme génétique chez les végétaux supérieurs : II, aspect expérimental, obtention de variants par culture de tissus *in vitro* sur *Lactuca sativa*. Apparition de vigueur chez les croisements. *Ann. amélior. plantes* 26 (4) : 523-547.

SIBI M., 1981. Hérité des variants épigénétiques obtenus par culture de tissus *in vitro* chez les végétaux supérieurs. Thèse de doctorat es sciences naturelles, université Paris-sud, centre Orsay, 106 p.

SIBI M., 1982. Heritable epigenetic variations from *in vitro* tissue culture of *Lycopersicon esculentum*. In : *Variability in plants regenerated from tissue culture*. Ed. EARLE, DEMARLY, Praeger Publisher, New York, 228-244.

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

SINGH J.P., 1982. Respiratory metabolism of somatic embryogenesis in callus cultures of *Dioscorea deltoidea*. *Current science* 51 (12) : 618-620.

SINHA M. and CHATURVEDI H.C., 1979. Rapid clonal propagation of *D. floribunda* : *in vitro* culture of excised leaves. *Curr. Science* 48 : 176-178.

SKIRVIN R.M., 1978. Natural and induced variation in tissue culture. *Euphytica* 27 : 241-256.

SKIRVIN R.M. and JANICK J., 1976. Tissue culture induced variation in scented *Pelargonium* sp. *J. Amer. soc. hort. sci.* 101 (3) : 281-290.

SNEDECOR G.W. et COCHRAN W.G., 1957. *Méthodes statistiques*. Acta, Paris, 469 p.

SOULEYMANE B., 1984. Limites et condition d'intégration de l'igname dans les systèmes de production de la région centre Côte d'Ivoire. Mémoire ESAT, option machinisme agricole, Montpellier, 61 p.

STEWART F.C., 1969. Plant Physiology, Academic Press New-York, 117-228.

STREET H.E., 1973. Old problems and new perspectives. In : Plant tissue and cell culture, STREET Ed., Blackwell scientific publications, Oxford : 501-511.

SUFENAGRA R., ABRIGO E.M. and YOSHIDA S., 1982. Seed derived callus culture for selecting salt tolerant rices. IRRI research paper series 79.

SUNDERLAND N., 1977. Nuclear cytology. In : plant tissue and cell culture, STREET H.E. Ed., Blackwell scientific publications, Oxford : 117-205.

TAKEBE I., LABIB G. and MELCHER G., 1971. Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplast of tobacco Naturwissenschaften, 58 (6) : 318-320.

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

TAL B., ROKEM J.S. and GOLDBERG I., 1983. Factors affecting growth and product formation in plant cells grown in continuous culture. *Plant cell reports* 2 : 219-222.

TEMPLETON SOMERS K.M. et COLLINS W., 1985. *In vitro* growth and regeneration characteristics of diverse populations of sweet potato, (*Ipomoea batatas*). Paper n° 9977 of the journal series of the North Carolina Agricultural research service. Raleigh NC USA : 27 695 - 7601. 18 p.

THOMAS E., MIFLIN B.J., BRIGHT S.W.J, and LANCASTER V., 1982. The regeneration of plants from protoplasts of agriculturally important species. In : Variability regenerated from tissue culture, EARLE and DEMARLY Ed., Praeger publishers, USA, 58-68.

THOUVENEL J.C. et FAUQUET C., 1980. Problèmes virologiques de l'igname en Côte d'Ivoire. In : l'igname, séminaire international, Pointe à Pitre, 28 juillet - 2 août 1980, édition : les colloques de l'INRA, Paris : 101-105.

THOUVENEL J.C. et FAUQUET C., 1982. Les viroses de l'igname en Côte d'Ivoire. In : yams - ignames, MIEGE J. and LYONGA S. Ed., Clarendon Press, Oxford : 245-252.

TOMITA Y., UOMORI and A. and MINATO H., 1970. Steroidal sapogenins and stereols in tissue culture of *Dioscorea tokoro*. *Phytochemistry* 9 : 111-114.

TORRIBIO A., EDWIGE S. et JACQUA G., 1980. Pathologie de l'igname en Guadeloupe : maladies fongiques. In : l'igname, séminaire international, Pointe à Pitre, édition : les colloques de l'INRA, Paris 107-114.

- TROUSLOT M.F., 1985 . Analyse de la croissance et morphogénèse de l'igname Dioscorea complexe, D. cayenensis-D. rotundata. Editions de l'ORSTOM, collection travaux et documents n° 185, 370 p.
- TSUNG HIEN CHENG, LING LAM and SHUH CHUN CHEN, 1985. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured young inflorescences of Oryza Sativa. Plant cell tissue Organ culture 4 : 51-54.
- UDUEBO A.E., 1971. Effect of external supply of growth substances on axillary proliferation and development in Dioscorea bulbifera.
- VANDEVENNE R., 1972. Rapport analytique, IRAT, Côte d'Ivoire, 72 p.
- VANDEVENNE R., 1973 a. Rapport analytique, IRAT, Côte d'Ivoire, 47 p.
- VANDEVENNE R., 1973 b. Contribution à l'étude de la mécanisation de la culture de l'igname en Côte d'Ivoire. IRAT, Côte d'Ivoire, 65 p.
- VANDEVENNE R., 1974. Rapport analytique, IRAT, Côte d'Ivoire, 63 p.
- VANDEVENNE R., 1976. Etude de l'influence des dates de tubérisation et de bourgeonnement des tubercules d'igname (Dioscorea sp) sur la date de levée au champ des semenceaux. L'agronomie tropicale 2 : 188-193.
- 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.
- VASIL V. and VASIL I.K., 1980. Isolation and culture of cereal protoplasts, Part. 2. Embryogenesis and plantlet formation from protoplasts of Pennisetum americanum. Theor. appl. genet. 56 : 97-99.
- VASIL V. and VASIL I.K., 1981. Somatic embryogenesis and plant regenerated from tissue culture of Pennisetum americanum and P. americanum x P. purpureum hybrid. Amer. J. bot. 68 (6) : 864-872.
- WAHOUNOU J.P., 1985. Contribution à la recherche d'une variabilité génétique chez la canne à sucre (Saccharum sp) au moyen de la vitroculture. Thèse de docteur ingénieur option phytotechnie et amélioration des plantes, ENSAM, Montpellier 146 p.
- WAITT A.W., 1963. Yams, Dioscorea species. Field crop abstract 16 (3) : 145-157.
- WANG D. and YAN K., 1984. Somatic embryogenesis in Echinochloa crusgalli. Plant cell reports, 3 : 88-90.
- WEATHERHEAD M.A., BURDON J. and HENSHAW G.G., 1978. Some effect of activated charcoal as additive to plant tissue culture media. Z. Pflanzenphysiol. Bd 89 : 141-147.

WEATHERHEAD M.A. and HENSHAW G.G., 1979. The production of homozygous diploid plants of Solanum verrucosum by tissue culture technique. Euphytica, 28 : 765-768.

WEBB D.T., TORRES L.D., 1984. Interaction of growth regulators, age, explants and culture environment controlling organogenesis from cotyledons in vitro. Can. J. Bot. 62 : 586-590.

WERNICKE W. and BRETTELL R., 1980. Somatic embryogenesis from Sorghum Bicolor leaves. Nature, 287 : 138-139.

WERNICKE W., BRETTELL R., MAKIZUKA T. and POTRYKUS I., 1981. Adventitious embryoid and root formation from rice leaves. Z. Pflanzenphysiol. Bd 103 : 361-365.

WHITE P.R., 1939. Potentially unlimited growth of excised plant callus in artificial nutrient. Amer. J. Bot. 26 : 59-64.

WICKHAM L.D., WILSON L.A. and PASSAM H.C., 1982. The origin, development and germination of bulbils in two Dioscorea species. Ann. Bot., 50 : 621-627.

WIDHOLM J.M., 1982. Selection of protoplast fusion hybrids. In : Plant tissue culture 1982, FUJIRAWA Ed., Abe Photo printing Co, Tokyo, Japan, 609-612.

WILMAR C. and HELLENDORRN M., 1968. Growth and morphogenesis of Asparagus cell cultured in vitro. Nature, 217 : 369-370.

WILSON J.E., 1982. Progress in the breeding of yam Dioscorea spp. In : yams - ignames. MIEGE J. et LYONGA S.N. Ed., Clarendon Press, Oxford, 17-22.

WILSON J.E. and VICTOR L. 1980. Relationships between seedlings and their vegetative progressy. In : l'igname, séminaire international de Pointe à Pitre, édition les colloques de l'INRA, Paris : 269-278.

WINCH J.E., NEWHOOK F.J., JAKSON G.V.H. and COLE J.S., 1984. Studies of Colletotrichum gloeosporioides disease on yam, Dioscorea alata, in Salomon islands. Plant pathology 33 : 467-477.

YAKUWA T., HARADA T., SAGA K. and SHIGA Y., 1971. Studies on morphogenesis of Asparagus. Japonese society for horticultural science 40 : 347-353.

YAMADA Y., 1977. Tissue culture studies on cereals. In : Plant cell tissue and organ culture, REINERT J. and BAJAJ Y.P.S., Springer Verlag, Berlin, 144-159.

YAMAGUSHI T. et NAKAJIMA T., 1974. Hormonal control of organ formation in cultured tissue derived from root tuber of sweet potatoe. In : Proc. of the 8th Intern. Conf., 1974, 1121-1127.

ANNEXE 1 : TECHNIQUES HISTOLOGIQUES UTILISEES
POUR L'ETUDE ANATOMIQUE DES CALS

1 - FIXATION

Les explants et les cals sont fixés avec une solution de Navashine. Le Navashine est un mélange de 2 solutions à volumes égaux :

Solution A :

| | |
|--------------------------|-------|
| Anhydride chromique..... | 1 g |
| Acide acétique..... | 7 ml |
| Eau distillée..... | 92 ml |

Solution B :

| | |
|------------------------|-------|
| Formaldéhyde 40 %..... | 30 ml |
| Eau distillée..... | 70 ml |

2 - DESHYDRATATION ET INCLUSION

| | |
|----------------------------|---------------|
| Alcool 50°..... | 1 heure |
| Alcool 70°..... | 1 h |
| Alcool 95°..... | 1 h |
| Alcool 100° (1)..... | 2 h 30 |
| Alcool 100° (2)..... | 2 h 30 |
| Alcool 100° (3)..... | toute la nuit |
| Alcool-toluène (1/lv)..... | 2 h |
| Toluène (1)..... | 2 h |
| Toluène (2)..... | 2 h |
| Toluène (3)..... | 2 h |
| Toluène paraffine..... | 5 h |
| Paraffine 60° (1)..... | 2 h |
| Paraffine 60° (2)..... | 2 h |
| Paraffine 60° (3)..... | 16 h |

Le fragment est ensuite inclus dans un bloc de paraffine. Les coupes sont réalisées au microtome à 10 M d'épaisseur. Les coupes sont collées sur les lames avec de l'eau gélatinée à 5 % et séchées au minimum 48 heures à l'étuve (45° C).

3 - DEPARAFFINAGE

| | |
|---------------------------|-----------|
| Toluène (1)..... | 10 mn |
| Toluène (2)..... | 10 mn |
| Toluène (3)..... | 10 mn |
| Alcool 100° (1)..... | 10 mn |
| Alcool 100° (2)..... | 10 mn |
| Alcool 100° (3)..... | 10 mn |
| Alcool formol (4/1)..... | 5 mn |
| Rinçage eau courante..... | 5 à 30 mn |

4 - COLORATION

Mordantage :

| | |
|---------------------------|-----------------|
| Alum de fer 5 %..... | 5 heures |
| Rinçage eau courante..... | plusieurs bains |

Coloration :

| | |
|---------------------------|-----------------|
| Hématoxyline..... | 16 heures |
| Rinçage eau courante..... | plusieurs bains |

Différentiation :

| | |
|---------------------------|--|
| Alun de fer 3 %..... | surveiller la différen- tiation au microscope |
| Rinçage eau courante..... | au moins une heure |

5 - MONTAGE

Les lames sont déshydratées à l'alcool 100° pendant 5 mn puis montées à l'euparal.

CIRAD-DOCUMENTATION

