



AgEcon SEARCH
RESEARCH IN AGRICULTURAL & APPLIED ECONOMICS

The World's Largest Open Access Agricultural & Applied Economics Digital Library

This document is discoverable and free to researchers across the globe due to the work of AgEcon Search.

Help ensure our sustainability.

Give to AgEcon Search

AgEcon Search

<http://ageconsearch.umn.edu>

aesearch@umn.edu

*Papers downloaded from **AgEcon Search** may be used for non-commercial purposes and personal study only. No other use, including posting to another Internet site, is permitted without permission from the copyright owner (not AgEcon Search), or as allowed under the provisions of Fair Use, U.S. Copyright Act, Title 17 U.S.C.*



**CARIBBEAN
FOOD
CROPS SOCIETY**

*SOCIETE CARAIBE
POUR LES PLANTES ALIMENTAIRES*

25

Twenty fifth
Annual Meeting 1989

25^e CONGRES ANNUEL

Guadeloupe

Vol. XXV

OBTENTION DE PLANTULES D'IGNAME (*D. alata* ET *D. cayenensis-rotundata*) PAR CULTURE D'EMBRYONS IN VITRO

R. ARNOLIN, F. GAMINETTE, L. DEGRAS

INRA-Antilles-Guyane, Station d'Amélioration des Plantes,
B.P. 1232 97184 - POINTE-A-PITRE GUADELOUPE (F.W.I)

RESUME

La culture d'embryon joue un rôle croissant dans l'amélioration des plantes. L'amélioration de l'igname n'en bénéficie pas encore. Des embryons de *D. cayenensis-rotundata* hybrides et d'une variété traditionnelle de *D. alata* ont été prélevés après désinfection et cultivés sur un milieu de Murashige et Skoog modifié. La germination des embryons a été obtenue. Les plantules sont au stade 3-4 feuilles pour *D. alata* ; celles de *D. cayenensis* sont en partie au champ. Si l'origine de celles-ci ne pose pas de problème, l'origine des plantules de *D. alata* en pose. Différentes hypothèses d'interprétation et les perspectives de valorisation de la technique sont discutées.

ABSTRACT

OBTAINMENT OF PLANTLETS OF YAM (*D. alata* AND *D. cayenensis-rotundata*) FROM EMBRYO IN VITRO CULTURE

In vitro culture of embryo is playing an increasing part in plant breeding. Yam improvement is not yet benefiting from. Embryos of *D. cayenensis-rotundata* hybrids and of a traditional variety of *D. alata* have been picked, desinfected, then cultivated on a modified MS media. Embryo germination has been obtained. Plantlets have reached stage 3-4 leaves for *D. alata* and those of *D. cayenensis-rotundata* are partially in the field. If as for this last ones their origin are not problematic, question stand for the *D. alata* ones, Different hypothesis of interpretation and prospects for valorization of the technics are discussed.

INTRODUCTION

La culture d'embryons a parfois été un des tout premiers objectifs de la culture des plantes in vitro. Il en est ainsi par exemple, parmi les tubercules tropicaux, chez *Colocasia esculenta* où, dès 1960, ABRAHAM et RAMACHANDRAN (in SHAW, 1984) en avait obtenu des plantules. Comparativement, c'est relativement tard que chez les *Dioscorea* cette technique aura été utilisée. C'est peut-être chez *D. opposita*, au Japon, que vers 1978 (YAKUWA et al., 1981) a lieu une des premières germinations de *Dioscorea* in vitro. Les travaux de OKEZIE et al., au Nigéria sont probablement très postérieurs ; même si les auteurs, en 1984 indiquent avoir obtenu des plantules, antérieurement, «d'embryons» de *D. rotundata*, la publication donnée en bibliographie (OKEZIE et al., 1981) ne fait état que de germination de graines entières en boîte de Pétri sur papier filtre humidifié (1)

Chez les deux espèces les auteurs relèvent une période de dormance des graines, mais il n'est pas clair. Si, chez *D. opposita*, la culture d'embryon a réduit cette dormance, en effet le matériel utilisé était uniquement issu des graines qui avaient refusé de germer, sans autre précision, et leur taux de germination avoisinait 100% OKEZIE et al. (1984) note une stimulation de la germination in vitro par rapport à celle du témoin, qui commence avec un mois de retard et n'atteint que 65% au bout de quatre mois contre 80-85% in vitro.

On remarque l'utilisation du milieu complet de Murashige et Skoog (1962) par YAKUWA et al. (1981), alors que OKEZIE et al (1984) se privent de ses composantes hormonales.

L'expérimentation de la culture d'embryon d'ignames dans notre unité répond à un double objectif, l'un méthodologique, qui est de rechercher la maîtrise des techniques de culture in vitro en général, l'autre qui est de vérifier la viabilité des graines formées chez différents matériels en vue de leur sélection, surtout quand la germination des graines ne se ferait pas après un semis horticole.

On sait que chez *D. cayenensis-rotundata* WAITT avait, dès 1959, suggéré que les capsules ordinairement récoltées ne contenaient que des embryons immatures, suggestion reprise par SADIK et OKEREKE (1975). OKEZIE et al (1984) le confirment apparemment en observant les évolutions inverses des fréquences des formes globulaires (décroissantes) et en éventail (croissantes) de l'embryon, de la récolte au 6e mois après.

Il y a une dizaine d'années, la germination des graines de *D. alata* demeurait quasi mythique ; il était admis que c'était une espèce à sexualité dégénérée, avec une forte stérilité femelle dues à des multiplications végétatives répétées. On pouvait cependant observer des infrutescences abondantes chez des variétés en général rustiques et bulbifères (DEGRAS, 1976) où l'on pouvait remarquer 1 à 2% de graines de morphologie apparemment normale (DEGRAS, 1986). Mais des essais de germination, en Guadeloupe, ne donnaient aucun résultat.

L'idée se faisait peu à peu que l'absence de fructifications chez *D. alata* était dû essentiellement au manque de synchronisation entre les floraisons mâles et les floraisons femelles. En 1979 des germinations étaient obtenues à partir d'hybridation à l'I.I.T.A. C'est ensuite en Inde que BAI et JOS (1986) puis ABRAHAM et al (1986) vont entreprendre et réussir la sélection sexuée de l'espèce. Des observations et des expérimentations ont été entreprises avec cet objectif à partir de 1986 dans notre unité.

Rappelons que la structure de l'embryon (un, deux cotylédons ?) des Dioscoracées est une pomme de discorde pour morphologistes et taxonomistes. AYENSU (1974) donne une bonne revue de la question (cf. aussi DEGRAS, 1986).

Les observations ici rapportées permettent quelques remarques sur les données publiées antérieurement.

MATERIEL ET METHODES

A/ Matériel végétal

1° *D. cayenensis-rotundata* . Il s'agit d'une dizaine de graines obtenues en pollinisation ouverte dans une population issue de polycross de l'IITA, actuellement en cours de sélection (DEGRAS, 1988). La maturité des fruits était proche, mais ils étaient encore bien verts.

2° Les graines de *D. alata* proviennent de la parcelle d'un agriculteur située à Sainte-Marie-Capesterre Belle-Eau. L'origine semble un clone traditionnel en voie de disparition (c.v. Divin) dont la floraison est mal connue et qui s'apparente au groupe des Ignames bulbifères. Les fruits sont apparus entre 5 et 7m de haut, sur l'un des arbres d'une parcelle en sous bois. Au moment de la cueillette des fruits, les tiges jaunissaient et avaient perdu la majorité de leurs feuilles. La maturité des 240 fruits s'étalait entre le vert jaunissant et le sec. Ces fruits ont été répartis en 3 catégories :

- verts : 82 jaunes : 81 secs : 77

Une majorité de ces fruits était à 1 graine, très peu à 2 graines et encore moins à 3 graines. Les fruits de la catégorie verte ont été utilisés pour le prélèvement des embryons.

B/ Techniques

1°/ Désinfection, prélèvement des embryons :

Les fruits ont été désinfectés de deux façons différentes :

a) plongés dans l'alcool à 95° et flambés

b) plongés dans une solution filtrée d'hypochlorite de calcium à 10° chlorométrique 1 mn avec mouillant puis 10 mn sans mouillant. 3 rinçages à l'eau stérile.

Les graines sont alors sorties des fruits à l'oeil nu et leurs ailes supprimées. Ces graines sont ensuite disséquées sous le stéréomicroscope, les embryons prélevés et déposés sur le milieu de culture

2°/ Les milieux de culture

Vingt deux embryons sont placés en majorité sur le milieu V3 utilisé à Avignon (INRA) pour les embryons de plusieurs espèces dont l'Aubergine. C'est un milieu simple comprenant : les macro éléments de Murashige et Skoog, les micro éléments de Heller, les vitamines de Morel, du saccharose (30g/l), il est à pH 5,9 et est solidifié avec 10g/l d'agar.

Cinq autres milieux ont été utilisés, dérivés du précédent :

- . par addition de vitamines de gibbérelline ou des deux,
- . addition de kinétine (1g/l)
- . ou de kinétine, 2,4,D et charbon à la fois

Les milieux sont coulés soit en boîtes de pétri de 55 mm de diamètre soit en flacons de 100 ml.

Les embryons sont en général placés par groupe de 5 dans les boîtes ou dans les flacons. Un total de 10 embryons de *D. cayenensis* et 87 de *D. alata* ont été mis en culture.

3°/ Conditions thermo- photopériodiques :

Température commune 25° + 2° C

Lumière a) 12h de jour + 12h de nuits pour 14 embryons en flacons avec milieu V3+

b) obscurité 15 jours puis (a) pour les autres milieux et une partie du milieu V3 (voir tableau 1)

RESULTATS

A/ *D. cayenensis-rotundata*

Cinq des embryons vont évoluer entre 30 et 50 jours, 3 vont donner des plantules entières, 2 des racines et un pseudo-cal. Deux des plantules obtenues ont été multipliés au stade 5-6 feuilles par microbouturage, sortis en serre, puis au champ.

B/ *D. alata*

Au cours de la mise en culture, nous avons rencontré 20% environ de graines à tégument externe profondément plissé. Il leur correspond un albumen discontinu sans embryon.

Le nombre de développements obtenus et le petit nombre d'embryons par milieu ne permettent pas de trouver des différences significatives entre les milieux. C'est à titre indicatif que nous donnons les résultats des tableaux 1 et 2 par milieu. Les autres résultats sont donnés sans distinction de milieu.

1°/ Observation initiale des embryons

Les embryons sont en général blanc, mais nous avons trouvé un embryon violacé. Ces embryons de 0,5 à 1 mm de long pour 0,30 à 0,70 mm de large avaient, souvent, dépassé le stade globulaire pour être au début du stade dit éventail avec une forme conique aplati, la pointe représentant la radicule. L'attache du cotylédon sur la radicule correspond parfois à une restriction au niveau de la zone méristématique qui donnera la gemmule.

2°/ Evolution

A 4 jours sous le stéréomicroscope les embryons montrent un accroissement des différentes parties. A ce stade le cotylédon s'est souvent accru et des excroissances pourraient correspondre à des ébauches de second cotylédon si ce n'est davantage.

A 10 jours tous les embryons ne se développent pas ; certains se nécrosent même après un début de morphogénèse. Le tableau 1 présente les embryons qui restent avec ou sans morphogénèse mais sans nécrose complète.

A 10 jours, radicule et gemmule deviennent visibles à l'oeil nu. La radicule blanche s'allonge droite ; la gemmule souvent anthocyanée apparaît en crosse comme une fronde de fougère qui se déroule lentement. Des développements avec gemmule sans radicule s'observent, mais le cas inverse prédomine, tous milieux confondus.

Après 18 jours, sur les 87 embryons mis en culture, 5 sont nécrosés . Des 82 qui sont encore vivants, 57 montrent une morphogénèse dont 40 sous forme de plantules complètes avec feuilles et racines (soit 49%), 3 (4%) présentent seulement la gemmule et 14 (17%) présentent un développement de la radicule sans la gemmule, tandis que 25 (soit 30%) ne présentent aucune morphogénèse

Après 2 mois de culture, nous notons 52 plantules pour 71 embryons soit un pourcentage de 73% ou de 58% quand il est ramené au nombre d'embryons mis en culture. A ce stade, 4 embryons ont donné 1 cal, un autre reste sans morphogénèse visible.

Après 3 mois le nombre de plantules n'est plus que de 42 pour 66 embryons encore présents ; avec les 3 embryons ayant des feuilles cela nous fait un pourcentage de développement aérien de 68% ou de 52% ramené au nombre d'embryons mis en culture. Parallèlement nous observons que le nombre d'embryons qui présentent seulement des racines est passé à 15 soit respectivement 22% des embryons présents et 17% des embryons mis en culture. Cette apparition de racine, s'accompagne en général d'un cal qui englobe et fait disparaître les premières ébauches de feuilles.

5°/ Caractéristiques des plantules obtenues

5.1 Ce qui frappe d'abord chez les plantules, c'est l'importance des anthocyanes. Même si la coloration d'une feuille à 5 jours n'est plus tout à fait la même à 20 jours, il est possible de classer les plantules d'après la contribution des anthocyanes ; c'est ce que propose le tableau 3

5.2 Nombre de feuilles et nombre de racines

Le développement des embryons n'est pas synchrone, les plantules qui en résultent ont des croissances différentes.

A trois mois, l'évaluation de la croissance par le nombre de feuilles donne des nombres de feuilles de 0 à 6. Le nombre de plantules à chaque stade étant différent comme le montre le tableau 4.

Il en est de même pour la croissance exprimée par le nombre de racines comme le montre le tableau 5.

5.3 Il est à remarquer la forme particulière des feuilles des plantules entièrement violacées (notée 4 dans le tableau 3). Les feuilles normales sont cordiformes avec des lobes plus ou moins rapprochés à l'avant et sont légèrement plus larges que longues. Les feuilles entièrement violacées sont jusqu'à 3 fois plus longues que larges (7 et 21 mm). En plus, le bord de ces feuilles est ondulé à la différence des autres catégories de plantules. De même, ces feuilles sont moins épaisses.

DISCUSSION - CONCLUSION

A. Pour *D. cayenensis*, il est certain que le nombre d'embryons de *D. cayenensis* avec lesquels nous avons travaillé, ne nous permet pas de tirer des conclusions importantes. Par ailleurs, les semences de graines de *D. cayenensis* à partir des descendances du Nigéria germent assez bien. L'intérêt de la culture d'embryons reste de nous familiariser avec la technique ; cette technique pourrait permettre en particulier d'exploiter la variabilité de *D. cayenensis* locaux traditionnels en cas de croisement peu fertiles avec les sélections nigérianes. Les embryons utilisés ont nécessité plus de 30 jours pour entrer en germination manifestant ainsi une certaine dormance. C'est une observation qui va dans le même sens que celle de SADIK et OKEREKE (1975) et de OKESIE et al. (1984).

B. Pour *D. alata*, à notre connaissance les embryons de *D. alata* n'ont jamais été cultivés in vitro. Les sélections commencées au Nigéria et en Inde l'ont été à partir de semis. Mais ce sont les essais de germination restés sans succès en Guadeloupe qui justifiait la culture de l'embryon.

a/Quels sont les renseignements que nous pouvons en tirer

1° Les milieux de culture utilisés permettent tous une morphogénèse. Cependant nous assistons après le 2^e mois à une régression de la morphogénèse ; les causes de cette régression peuvent être multiples et leur analyse nécessite de nouvelles études

2° Le pourcentage maximum d'embryon avec une caulogénèse est de 52% des embryons mis en culture. Ce pourcentage est faible.

3° Nous avons observé des différences entre les plantules obtenues surtout au niveau de l'importance en anthocyane. Cela peut être le départ de nouvelle sélection. Le cas des plantules entièrement anthocyanées demande à être suivi pour savoir s'il y a des caractères particuliers attachés à cette coloration.

b/ L'idée qu'une incompatibilité entre l'embryon et l'albumen pouvait être la cause des échecs de germination des graines de *D. alata* nous a amené à semer deux mois après la cueillette des graines entières provenant du même lot que les

embryons. Leur germination a commencé à 17 jours pour atteindre 58% (36 plantules pour 62 graines) un mois après le semis. Cette rapidité de germination semble une particularité de *D. alata* puisque Abraham et al. (1986) obtiennent une germination à 10 jours tandis que BAI et JOS pour des graines conservées deux mois puis semées de façon échelonnée sur un mois signalent la germination à 14 jours quelque soit le semis.

1°/Cela voudrait dire qu'il n'y a pas d'incompatibilité générale entre l'embryon et l'albumen. Toutefois des problèmes demeurent puisque le taux de germination est très inférieur à 100%.

2°/ On peut alors s'interroger sur les échecs antérieurs des essais de germination de *D. alata* : La formation de l'embryon est-elle en cause ; est-ce un processus qui aboutit à des incompatibilités, liée par exemple à des malformations de l'albumen . Ces cas pouvant se produire lors de parthénogénèse au sens stricte ou au sens large.

3°/S'agit-il d'une autoincompatibilité chez cette espèce dioïque donc allogame après que du pollen soit apparu dans les staminodes souvent présent chez les bulbifères femelles.

Nous avons vu que les plantules obtenues sont différentes entre elles, ce qui élimine une possibilité de développement apomictique à partir des tissus $2n$ de l'ovule. Cependant quand on sait combien il est difficile de synchroniser chez *D. alata* la floraison femelle et la floraison mâle, nous pensons que la chose essentielle sera de pouvoir faire des pollinisations à l'endroit même de l'obtention de ces graines et de chercher à connaître les facteurs du climat ou autres qui pourraient faciliter la fécondation. A l'atmosphère de sous bois nous pensons qu'il faut rajouter le régime pluvial abondant des hauteurs de Ste Marie. Les résultats de telles études pourraient être aussi profitables que les autres études actuellement conduites pour cerner la floraison et la fructification de *D. alata* . Le géniteur mâle s'il est définitivement identifié pourra être utilisé.

4°/ Ces résultats s'ils sont appliqués à des embryons plus jeunes pourront permettre :

- de suivre la formation et le développement de l'embryon
- de sauver des génotypes dans des croisements à viabilité limitée.

Enfin les plantules obtenues dans ce travail peuvent être utilisées pour commencer la sélection chez *D. alata*, l'objectif essentiel devant être la recherche de génotypes peu sensibles à l'antracnose

BIBLIOGRAPHIE

ABRAHAM K. ; NAIR S.G., SREEKUMARI M.T. and UNNIKRIISHNAN M. (1986). Seed set and seedling variation in greater yam (*Dioscorea alata*) Euphytica, 35,2,337-343.

AYENSU E.S., (1972). Anatomy of the monocotyledons. VI. Dioscoreale (Ed. C.R. Metcalfe), Clarendon Press, Oxford, 182 p.

BAI K.V. and JOS J.S., (1986) Female fertility and seed set in *Dioscorea alata* L. Tropical Agriculture 63,1,7-10.

IITA Annual Report 1979. Genetic improvement of water yam (*Dioscorea alata*).

IITA Annual Report 1980.

IITA Annual Report 1985. First new water yam clones from seeds.

HELLER R. (1953) Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés in vitro. Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg. 14,1-223.

MURASHIGE T. ; SKOOG F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco and tissue culture. Physiol. Plant, 15,413-437.

OKESIE C.E.A. ; NWOKE F.I.O. and OKONKWO S.N.C. (1983). In vitro culture of *Dioscorea rotundata* embryos. Tropical Root Crops Proceedings of 2nd triennial Symposium of the International Society for Tropical Root Crops. Africa Branch 14-19 August 1983.

SADIK S. and OKEREKE O.U. (1975). Flowering pollen grain germination fruiting, seed germination and seedling development of white yam *Dioscorea rotundata*. Ann. bot. 39,597-604.

SAUTON A. ; DUMAS de VAULX R. (1987) Obtention de plantes haploïdes chez le melon (*Cucumis melo*) par gynogenèse induite par du pollen irradié. Agronomie,7,2,141-148.

{

Tableau 1 : Evolution du nombre d'embryons avec ou sans morphogénèse

Evolution of embryos number with or without morphogenesis

Milieux de culture	Nbre initial d'embryons	Nbre d'embryons à 18 j	Nbre à 2 mois	Nbre à 3 mois
Milieu initial				
V3 + lumière	14	12	10	9
V3 + obscurité	8	8	8	8
Milieux modifiés				
+ vitamines	11	9	7	6
+ gibberelline	21	20	17	16
+ vitamine et gibberel	5	5	5	5
+ Kinétine	12	12	8	8
+ Kinétine 2,4.D et charbon	16	16	16	14
Total	87	82	71	66
Pourcentage	100	94	82	76

Tableau 2 : Morphogenèse en relation avec le milieu et la durée de la culture

Morphogenesis in relation with media and culture duration

Culture media	embryo numbers	Morphogenesis															
		18 days					60 days					90 days					
		N	O	R	L	RL	N	C	R	L	RL	N	O	R	L	RL	
V3 light	14	2	1	1	1	9	4	1	1	1	0	8	5	0	2	0	7
V3 obscurity	8	0	1	1	0	6	0	0	1	1	0	7	0	0	1	0	7
+ vitaminé	11	2	2	1	0	6	4	0	0	1	6	5	0	1	0	5	
+ GA3	21	1	10	3	0	7	4	4	2	3	8	5	4	4	0	8	
+ Vit + GA3	5	0	0	3	0	2	0	0	0	1	4	0	1	1	0	3	
+ Kinetin	12	0	7	1	1	2	4	0	1	2	5	4	0	2	1	5	
+ Kin., + 2,4.D	16	0	4	4	0	8	0	0	0	2	14	2	0	5	2	7	
+ Charc																	
Total	87	5	25	14	3	40	16	5	5	9	52	21	5	16	3	42	
% present embr							82										
% initial embr	100	6	29	16	3	46	18	6	6	10	28	24	6	3	18	48	

N= Necrosis

O= Nought

C= Callus

R= Roots

L= Leaves

RL= Roots + Leaves

Tableau 3 : Répartition des plantules selon l'importance de l'anthocyane à 90 jours*Plantlets breakdown according to anthocyanis level at 90 days*

Importance de l'anthocyane	Nbre de plantules	% de plantules
0	5	11,1
1	25	55,5
2	5	11,1
3	6	13,3
4	4	9
Total	45	100

0 vert, ou blanc verdâtre

1 au moins un jeune pétiole anthocyané

2 pétiole + pulvinus distal anthocyanés

3 pétiole, pulvinus distal et nervures anthocyanés

4 entièrement anthocyané y compris limbe des feuilles

Tableau 4 : Répartition des plantules selon leur nombre de feuilles à 90 jours*Plantlets breakdown according to their leaves number at 90 days*

Nombre de feuilles	Nbre de plantules correspondant	% de plantules
0	21	32
1	18	27
2	8	12
3	8	12
4	5	7,5
5	4	6
6	2	3
Total	66	99,5

Tableau 5 : Répartition des plantules selon leur nombre de racines à 90 jours

Plantlets breakdown according to their roots number at 90 days

Nombre de racines	Nbre de plantules correspondant	% de plantules
0	8	12
1	17	25,7
2	11	16,6
3	9	13,6
4	6	9
5	8	12
6	4	6
7	3	4,5
Total	66	99,4