



HAL
open science

Obtention de plantes indemnes du virus de la mosaïque de l'igname (YMV) par culture in vitro des apex chez l'igname américaine *Dioscorea trifida* L

V. Saleil, L. Degras, R. Jonard

► To cite this version:

V. Saleil, L. Degras, R. Jonard. Obtention de plantes indemnes du virus de la mosaïque de l'igname (YMV) par culture in vitro des apex chez l'igname américaine *Dioscorea trifida* L. *Agronomie*, 1990, 10 (8), pp.605-615. hal-02715456

HAL Id: hal-02715456

<https://hal.inrae.fr/hal-02715456v1>

Submitted on 1 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Obtention de plantes indemnes du virus de la mosaïque de l'igname (YMV) par culture *in vitro* des apex chez l'igname américaine *Dioscorea trifida* L

V Saleil¹, L Degras², R Jonard¹

avec la collaboration technique de P Hamard, P Quétin et P Bal

¹ Université des Sciences et Techniques du Languedoc, laboratoire d'histophysiologie végétale, 34060 Montpellier Cedex

² Centre INRA-Antilles-Guyanne, station d'amélioration des plantes, BP 1232 Pointe-à-Pitre Cedex, France

(Reçu le 8 février 1990; accepté le 7 juillet 1990)

Résumé — Chez les ignames, une maladie à virus (*Yam mosaic virus*, YMV) affecte gravement la culture et réduit les échanges de ressources génétiques. La régénération de plantes sans virus a été recherchée, chez *Dioscorea trifida* L, par culture d'apex de vitroplants issus de boutures nodales de matériel contaminé. Le développement *in vitro* a été réalisé en 3 phases :

– dépôt et reprise du fonctionnement de l'apex sur solution minérale N 30 K de Margara, comportant une cytokinine (BAP à 8,88 $\mu\text{mol/l}$) et une auxine (AIB à 0,049 $\mu\text{mol/l}$)

– allongement et multiplication des pousses feuillées sont favorisés par un passage sur une solution minérale de Murashige et Skoog avec macroéléments dilués de moitié (MS/2) avec BAP (0,88 $\mu\text{mol/l}$) et AIB (0,049 $\mu\text{mol/l}$)

– enracinement des vitroplants de longueur suffisante. Il est induit par trempage dans une solution de saccharose (80 g.l⁻¹) et ANA (2,67 $\mu\text{mol/l}$).

Les vitroplants sont transférés directement en substrat horticole. L'utilisation du test immunoenzymatique ELISA indique que 27% des plantes issues de culture d'apex *in vitro* sont ainsi débarrassées du YMV.

morphogenèse / organogenèse / phytohormone / technique ELISA

Summary — Cleaning the *Dioscorea trifida* L yam from yam mosaic virus (YMV) through apices *in vitro* culture. The *Dioscorea trifida* L yam is particularly susceptible to the yam mosaic virus (YMV) which severely affects most yam cultures and reduces the exchange of genetic resources. Healthy plants have been sought through apical meristem tip *in vitro* culture of vitroplantlets obtained from nodal explants of diseased material.

This was performed in 3 phases :

1) Outgrowth or organisation of the apex over a paper bridge (fig 1) on a mineral solution of Margara ("N 30 K"), including a cytokinin (BAP 8.88 $\mu\text{mol/l}$, fig 2) an auxin (IBA 0.049 $\mu\text{mol/l}$) and gibberellin (GA_3 2.9 $\mu\text{mol/l}$); 2) Lengthening and multiplication of leafed buds (fig 3) benefited from one subculture on a mineral solution of Murashige and Skoog with half diluted macro elements (MS/2, table II) BAP (0.88 $\mu\text{mol/l}$, table III) and IBA (0.049 $\mu\text{mol/l}$ and gibberellin (0.29 $\mu\text{mol/l}$); 3) Shoots which had grown enough were rooted (fig 4) by dipping in a solution of sucrose (80 g/l) and ANA (2.67 $\mu\text{mol/l}$, fig 5).

The vitroplantlets were directly transferred in horticultural substrate. Those not cleaned could not then express their virus symptoms (fig 6). The application of the immuno enzymatic test Elisa established that 27% of the plants grown from *in vitro* apex culture are free from YMV (fig 7).

morphogenesis / organogenesis / phytohormone / Elisa test

INTRODUCTION

Les ignames (*Dioscorea spp*), monocotylédones rattachées aux Liliales, regroupent environ 600 espèces, essentiellement intertropicales (Coursey, 1967). L'utilisation alimentaire du genre remonte aux temps préhistoriques et les espèces cultivées actuellement contribuent à nourrir des dizaines de millions d'hommes. Aujourd'hui, dans les régions tropicales humides, leur production serait la seconde après celle du manioc. Quelques espèces, riches en stéroïdes, demeurent, après avoir dominé le marché de la diosgénine, des sources importantes d'hormones sexuelles contraceptives et de corticoïdes (Degras, 1986).

Les *Dioscorea* cultivées, dont la reproduction sexuée est aléatoire, sont multipliées essentiellement par voie végétative, ce qui entraîne la dissémination d'agents pathogènes dans les plantations, provoquant une baisse de rendement et de qualité des récoltes (Degras, 1986). Contre les champignons parasites du tubercule la combinaison de tri à la récolte, de conditions de conservation adaptées et de trempage dans des fongicides est efficace. Contre les nématodes, si la charge n'est pas excessive, la thérapie humide ou des nématicides peuvent agir utilement. Mais la thérapie du tubercule s'étant montrée inopérante contre les viroses (Mantell *et al*, 1977) la culture *in vitro* paraissait la seule voie pour obtenir les plants sains nécessaires à la production, et à l'échange des ressources génétiques, chez l'igname.

La culture *in vitro* d'ignames, amorcée par des études méthodologiques de recherche physiologique chez *D opposita* Thumb (Sawada *et al*, 1958), *D composita* Hemsl (Nickell *in* Gautheret, 1959), *D bulbifera* L (Uduebo, 1971), devait ensuite accroître la propagation des ignames à diosgénine (Chaturvedi, 1975, Grewal *et al*, 1977), puis des ignames alimentaires (Mantell *et al*, 1978, Arnolin, 1980). En 1979, Mantell et Haque présentaient (voir aussi Mantell *et al*, 1980) une technique, thérapie de la plante mère suivie de culture d'apex *in vitro*, pour éliminer le complexe viral tenu pour responsable de désordres tissulaires dans les tubercules de certaines *D alata* L. A l'IITA (Nigéria), en 1988, NG signale la disponibilité de 300 clones d'igname débarrassés de virus par une technique analogue.

En simplifiant quelque peu (voir Degras, 1986, pour les données acquises à l'époque) nous rap-

pellérons que les travaux de Adsuar (1955), Harrison et Roberts (1973), Migliori et Cadilhac (1976), Mohamed et Mantell (1976), Mantell *et al*, (1977), Terry (1978), Thouvenel et Fauquet (1977, 1979, 1980 a, 1980 b, 1986), Marchoux *et al*, (1979), Balagne (1985), Fauquet et Thouvenel (1987) permettent de concevoir l'existence d'un complexe viral chez les principales ignames alimentaires, auquel participeraient notamment un potyvirus de 700-800 nm, un virus bacilliforme et la mosaïque du concombre (CMV) ou un virus à particule isométrique. Thouvenel et Fauquet ont décrit en 1986 ce potyvirus, le plus commun, sous le nom de *Yam Mosaic Virus* (YMV), et en ont obtenu un antisérum en Côte-d'Ivoire. L'utilisation de celui-ci par le test Elisa, mis au point par Clark et Adams (1977), a permis d'établir une étroite parenté entre les pathotypes isolés en Côte-d'Ivoire et ceux de la Guadeloupe (Marchoux *et al*, 1979), du Togo (Reckhaus et Nienhaus, 1981) et du Nigéria (Thottapilly, communication personnelle).

De toutes les *Dioscorea* cultivées aux Antilles, *D trifida* L apparaissait comme la plus affectée dans sa croissance et son rendement par les viroses (Migliori et Cadilhac, 1976, Marchoux, 1980). Seule igname alimentaire fructifiant abondamment dans cette aire, elle avait pu bénéficier, dès 1966, d'un programme d'amélioration génétique (Degras, 1978, Degras *et al*, 1980) qui se heurtait bientôt à l'absence de géniteurs de résistance aux viroses. On chercha ces derniers à partir de leur aire d'origine présumée et deux méthodologies de régénération des clones furent mises en œuvre. Au laboratoire des plantes vivrières de la station d'amélioration des plantes (INRA), en Guadeloupe, avec le concours de la station de pathologie végétale notamment, la thérapie *in vitro* suivie de micropropagation devait se montrer efficace (Balagne, 1985). Au laboratoire de physiologie végétale appliquée de l'USTL, la culture d'apex de *D trifida*, sans thérapie, fut la base de la recherche ici présentée.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Des explants issus de plantes virosées contrôlées par test Elisa, ont été cultivés *in vitro*, d'abord à partir de régions nodales puis d'apex des vitroplants obtenus. Les vitroplants issus d'apex ont été transférés en substrat horticole et leur décontamination virale a été évaluée par le test Elisa.

Cultivar

Il s'agit du clone *D trifida* «INRA 5-20», hybride issu de la sélection INRA en Guadeloupe. Il se caractérise par une bonne qualité culinaire de ses tubercules sphéroïdes, une potentialité de rendement élevée mais est particulièrement sensible aux viroses (Degras *et al.*, 1980).

Culture in vitro

Par explant nodal

Introduit par l'un de nous (Degras, 1983) de la Guadeloupe à Montpellier, sous forme de vitroplants, ce matériel a été maintenu par micropropagation nodale au laboratoire de culture des tissus du CIRAD avec des cycles de repiquage de 2 à 5 mois, en général sur le milieu N 30 K de Margara (1978). Les repiquages effectués au laboratoire de l'université ont été faits par la suite avec 50 g.l⁻¹ de saccharose au lieu de 30 g.l⁻¹ de la technique initiale.

Par explant apical

Des essais préliminaires nous ont conduits à prélever sur les vitroplants des apex de 0,2-0,5 mm de diamètre comprenant le dôme méristématique accompagné ou non d'une ébauche foliaire. Ils sont ensuite placés dans des tubes à hémolyse sur un pont de papier filtre dont les extrémités plongent dans une solution nutritive liquide. Nous avons utilisé 2 types de combinaisons de macro-éléments : le milieu de Margara (1978), N 30 K, et le milieu de Murashige et Skoog (1962), mais celui-ci dilué de moitié (MS/2) ou du quart (MS/4) pour NH₄ NO₃ et KNO₃. À ces macro-éléments étaient ajoutés les micro-éléments de Murashige et Skoog, et, éventuellement des vitamines (mésositol, 555 µmol/l, biotine à 0,04 µmol/l), du fer chélaté avec 100 µmol/l de FeSO₄, 7 H₂O et 100 µmol/l de Na₂ EDTA, et du saccharose (30 g.l⁻¹). Diverses substances de croissance compléteront ces milieux de base, leur nature sera précisée ultérieurement. Le pH des solutions est ajusté à 5,6 ± 0,1 avec KOH ou HCl avant leur stérilisation à l'autoclave à 110 °C pendant 20 min.

Les explants sont placés à 25 °C ± 2 °C, sous un éclairage de 37 µEinstein.m⁻²s⁻¹ environ pendant 16 h par jour.

Transfert en serre

Les plantules enracinées sont acclimatées en serre à 27 °C sur un mélange (parts égales) terreau-vermiculite préalablement stérilisé par un double autoclavage à 120 °C pendant 1 h.

Détection du virus de la mosaïque de l'igname (YMV)

La technique de Clark et Adams (1977) du test sérologique Elisa préconisée par Thouvenel et Fauquet (1980a, b) a été mise en œuvre, avec le concours de JB Quiot, au laboratoire de phytovirologie des pays chauds (CIRAD-Montpellier) et avec l'antisérum fourni par JC Thouvenel (ORSTOM, Côte-d'Ivoire). Les tests ont été effectués avec une concentration en globuline de revêtement de 10 µg.ml⁻¹, un conjugué dilué au 1/1000 pour un rapport optimal virosé/sain estimé par densité optique de 29, à 405 nm. Les échantillons étaient dilués au 1/50. L'échantillon virosé provenait de 3 plantes à symptômes foliaires graves. Faut de graines de *D trifida*, rares du fait des viroses, l'échantillon sain était constitué de plantules, âgées de 3 semaines, issues de graines de *D cayenensis-rotundata**, car la virose n'est pas transmise par la graine (Marchoux *et al.*, 1979).

RÉSULTATS

Nous considérons d'abord les milieux successifs en référence aux phases de dépôt et reprise de fonctionnement des apex, d'accélération de l'allongement avec multiplication des tiges, et de rhizogenèse, avant d'évoquer le transfert en serre et le contrôle sanitaire.

Phase de dépôt et reprise de fonctionnement des apex (fig 1)

Il s'agit d'une période de l'ordre de 20-30 j pendant laquelle les apex mettent en place les nouvelles ébauches foliaires et entrent lentement en croissance. Celle-ci demeure de l'ordre de 0,10 mm/j avant de s'accélérer.

En ce qui concerne les équilibres minéraux, on remarque que le milieu N 30 K conduit à un allongement à peu près double de celui induit par tous les autres, y compris le MS/2, qui a la même teneur en azote mais avec un rapport NO₃/NH₄ 2 fois plus faible.

La nature et la dose de la cytokinine déterminent des variations de croissance significative (fig 2). A 2 mg.l⁻¹ (8,88 µmol/l), la 6-benzyl-aminopurine (BAP) permet de dépasser 0,10 mm/j.

Trois auxines ont été expérimentées. L'acide naphthalène acétique (ANA) aux doses utilisées ne provoque guère de variation et n'assure pas un taux élevé de reprise. L'acide B indolylacétique (AIA) et l'acide B indolylbutyrique (AIB),

* Ce complexe spécifique recouvre les taxons *D cayenensis* Lam et *D rotundata* Poir.

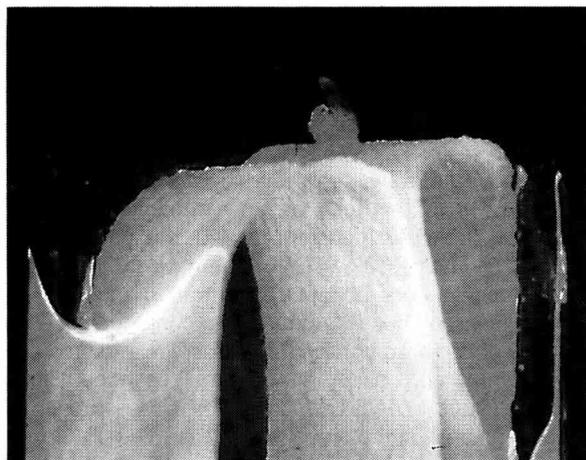


Fig 1. Début de croissance d'un explant apical de *D trifida* sur pont de papier filtre et milieu liquide.

induisent, à certaines doses, plus de 90% de reprise. L'AIB à la dose de $0,01 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ($0,049 \mu\text{mol/l}$) provoque un débourrement avec une fréquence élevée et un allongement maximal (tableau I). Des cals défavorables à la croissance ont été observés avec toutes les auxines à la dose de $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

L'acide gibberellique n'a d'action qu'en présence de cytokinine et d'auxine (en combinaison optimale); il accroît l'allongement jusqu'à $0,15 \text{ mm/j}$, avec $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ($2,9 \mu\text{mol/l}$) contre $0,05 \text{ mm}$ pour le témoin.

Phase d'allongement accéléré et de ramification (fig 3)

Au cours de cette phase, la croissance axiale est de l'ordre de $0,4 \text{ mm/j}$.

Les apex ayant repris sont transférés, vers le 40^e j de culture, sur un nouveau milieu favorisant leur développement en jeunes pousses feuillées.

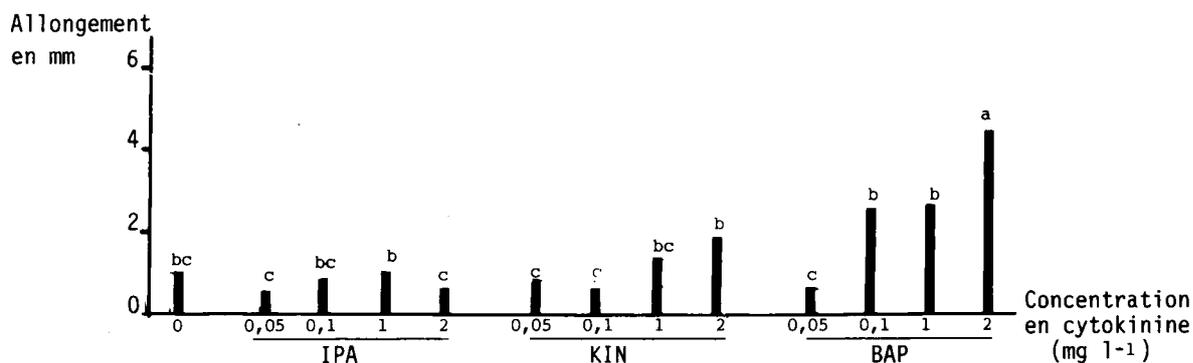


Fig 2. Influence de diverses cytokinines sur l'allongement des apex de *D trifida* cv INRA 5-20, 30 j après leur mise en culture. Le milieu de base contient GA3 ($1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} = 2,9 \mu\text{mol/l}$) et AIB ($0,01 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} = 0,049 \mu\text{mol/l}$). Il y a 48 explants pour chaque condition expérimentale. Les lettres au-dessus des colonnes indiquent les groupements statistiques IPA : Isopentenyl ($\mu\text{mol/l}$: x 4,93); KIN: Kéatine ($\mu\text{mol/l}$: x 4,65); BAP : 6-benzyl-aminopurine ($\mu\text{mol/l}$: x 4,44).

Le milieu MS dilué à 50% ou à 25% fournit des résultats supérieurs à ceux du N 30 K (tableau II). La réduction du rapport NO_3/NH_4 paraît ainsi avantageuse étant donné le nombre de plants en prolifération, leur taux de multiplication, et certains dysfonctionnements tissulaires («vitrification»).

Contrairement à ce qui se passe dans la phase précédente, la dose de BAP la plus efficace est la plus faible essayée, mais la présence de la BAP demeure nécessaire (tableau III). Par contre, comme pour la phase de reprise, la teneur optimale en AIB paraît être de $0,049 \mu\text{mol/l}$.

Phase d'enracinement (fig 4)

Les pousses de 60-70 j sont d'abord trempées pendant 7-10 j dans un milieu liquide induisant la rhizogenèse. Il renferme la solution minérale MS/4, suivant en cela une technique appliquée par Sengupta *et al*, (1984) à *D floribunda* Mart et Gal. L'ANA seulement, comparé à l'AIB et l'AIA, s'est montré utile; il a une activité synergique avec celle du saccharose quand celui-ci passe de 30 à $80 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, l'ANA passant de 0 à $0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ($2,67 \mu\text{mol/l}$). L'interaction devient négative avec $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ($5,34 \mu\text{mol/l}$) d'ANA (fig 5).

Au bout de 7-10 j, les pousses sont repiquées sur un milieu gélosé à $7 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ et contenant, avec $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ de saccharose, les éléments minéraux du N 30 K.

Passage aux conditions naturelles

Avec la procédure indiquée pour le transfert en serre, le taux de reprise a été de 100%. Les feuilles nouvellement développées retrouvent



Fig 3. Bourgeonnement et prolifération de la pousse de *D trifida* après transfert sur un nouveau milieu.

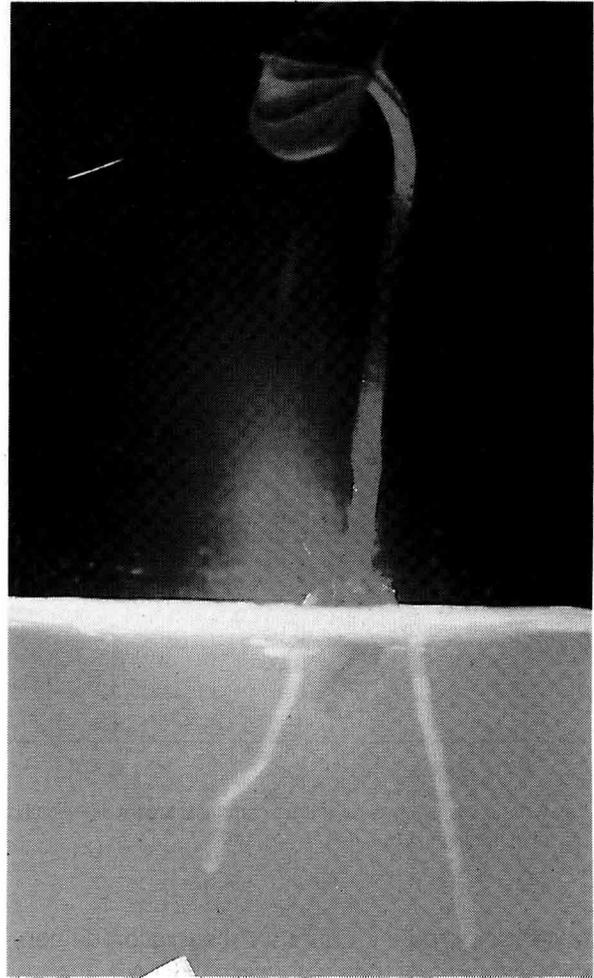


Fig 4. Enracinement de la vitroplantule de *D trifida* sur milieu solide *in vitro*.

d'emblée la morphologie lobée de la plante d'origine, disparue en culture *in vitro* (Arnolin, 1985, Arnolin et Degras, 1983).

La détection du virus de la mosaïque de l'igname

Après leur sortie des tubes, les plantes poursuivent leur développement et sont suivies pendant 6 mois. On peut ainsi noter l'apparition éventuelle et l'évolution des différents symptômes foliaires de viroses : mosaïque accompagnée de nervures

bordées de vert plus sombre, altération légère de la coloration du limbe parfois associée à une mosaïque (fig 6). Ces symptômes sont difficilement reconnaissables lorsque les plantes sont conservées en tube. Il convient cependant de

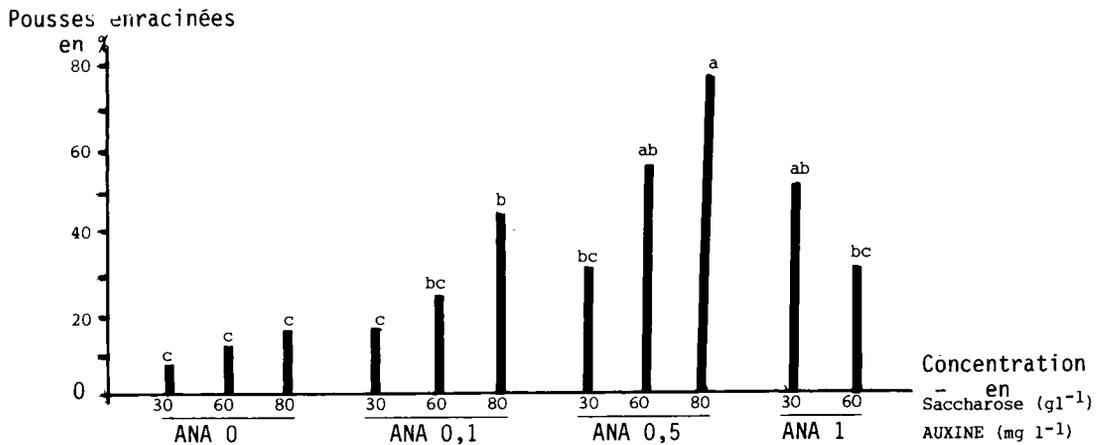


Fig 5. Enracinement *in vitro* des pousses de *D trifida* cv INRA 5-20 en fonction des concentrations en ANA et saccharose des solutions de trempage, 48 pousses sont utilisées pour chaque condition. Les lettres sur les colonnes indiquent les groupements statistiques.

Tableau I. Effets de 3 auxines à différentes concentrations sur le développement d'apex de *D trifida* en présence de BAP à 2 mg l⁻¹ (8,8 µmol/l) et de GA₃ à 1 mg l⁻¹ (2,9 µmol/l).

Traitement (mg l ⁻¹)		Nombre d'apex mis en culture	Nombre d'apex débourrés, 20 j après l'excision	% de débourement	Allongement des pousses (mm) à 60 j
Témoin		20	10	50 ^b	5,6
AIB	0,01	21	19	90,5 ^a	9,2
	0,05	24	20	83,3 ^{ab}	—
	0,1	24	22	91,7 ^a	8,8
	1	21	14	66,7 ^{ab}	6,2
AIA	0,01	24	22	91,7 ^a	
	0,05	19	11	57,9 ^{ab}	
	0,1	10	11	57,9 ^{ab}	
	1	19	8	42,1 ^b	
ANA	0,01	21	14	66,7 ^{ab}	
	0,05	22	14	63,6 ^{ab}	
	0,1	23	15	65,2 ^{ab}	
	1	22	14	63,6 ^{ab}	

Les lots ne portant pas de lettres communes sont significativement différents au seuil de 5% (test du χ^2). Le milieu témoin est celui qui n'est additionné que de GA₃ et BAP.

rester très prudent quant à l'observation de certains symptômes pouvant laisser croire à une atteinte pathologique alors qu'il ne s'agit, en réalité, que de manifestations dues à des déficiences nutritives (Thouvenel et Fauquet, 1980 a). De plus, il n'est pas rare d'observer des feuilles d'apparence virosée succédant à des feuilles apparemment saines, ce qui a déjà été noté par Marchoux (1980).

Pour ces raisons, au cours des 6 mois de suivi en serre, le test Elisa a été appliqué, en fé-

vrier et en avril, sous la direction de JB Quiot. La première série de tests à porté sur 26 plants, la seconde sur 22 plantes, dont 15 avaient subi un test en février. La figure 7 montre une bonne répétitivité des résultats d'un test à l'autre : en effet, les plantes présentant une faible DO au mois de février conservent au mois d'avril une absorbance proche de celle du témoin sain. Il convient de distinguer :

– les plantes N^{os} 29, 7, 32, 33, 24, 22, 25, 30 et 27 de DO très proche de celle du témoin sain dans les 2 séries de tests;

Tableau II. Multiplication des pousses de *D trifida* en présence de différentes solutions minérales.

Traitements	Fréquence des explants primaires portant plusieurs pousses (%)		Nombre de bourgeons néoformés sur les explants à pousses multiples	Taux de multiplication
MS	20/48	41,7 ^b	42/20	2,1
MS/2	41/47	87,2 ^a	240/41	5,8
MS/4	41/48	85,4 ^a	223/41	5,4
N3OK	28/45	62,2 ^{ab}	120/28	4,3
N15K	26/46	56,5	54/26	2,1

Tableau III. Action de la BAP sur le développement de jeunes pousses de *D trifida* après 60 j de culture.

Traitement (mg·l ⁻¹) (μmol·l ⁻¹)	Fréquences des explants primaires portant plusieurs pousses	%	Nombre de bourgeons néoformés sur les explants à pousses multiples	Taux de multiplication	Observations
BAP 0	28/47	59,6	58/28	2,1	peu d'allongement croissance réduite
BAP 0,2 (0,89)	40/48	83,3	195/40	4,9	allongement optimal
BAP 0,5 (2,22)	31/46	67,4	135/31	4,3	allongement réduit
BAP 1 (4,44)	15/40	37,5	29/15	1,9	allongement faible
BAP 2 (8,88)	6/28	21,4	12/6	2	mortalité importante des explants

– les plantes N^{os} 38, 41, 20, 37 de DO proche de celle des précédentes mais n'ayant pas fait l'objet du 1^{er} test (un seul résultat);

– toutes les autres plantes, de DO très supérieure à celle du témoin sain.

Le premier groupe semble débarrassé de la mosaïque. Il représente 27% du matériel testé. La considération des 2 premiers groupes porterait le taux de succès à 39%.

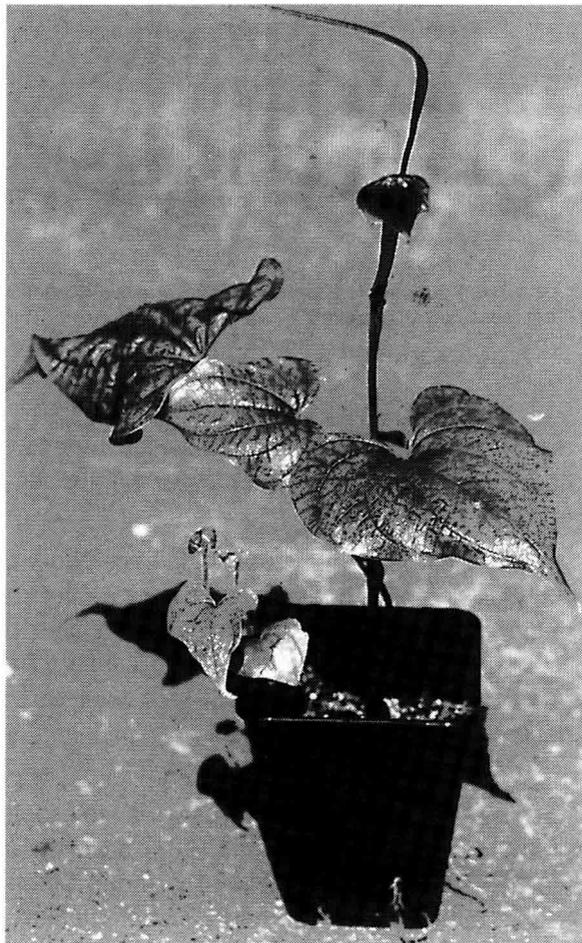


Fig 6. Plantule de *D trifida* avec symptômes de mosaïque.

DISCUSSION - CONCLUSION

Plusieurs remarques peuvent être faites concernant le développement de méristèmes apicaux chez *D trifida*, et sa portée dans l'élimination du virus de la mosaïque.

– La reprise de la croissance des apex, la phase la plus délicate car elle conditionne la réussite des étapes ultérieures, semble favorisée par l'emploi d'un milieu liquide mais les pertes restent encore trop importantes, de l'ordre de 29%. La composition minérale du milieu joue un rôle non négligeable sur le développement et la multiplication des pousses. Les apex manifestent une meilleure reprise en présence de la solution N 30 K de Margara (1978) comme l'avait déjà remarqué l'un de nous (Degras, 1983) avec des boutures nodales. Cette supériorité sur le milieu de Murashige et Skoog (1962) conforte l'opinion de Margara (1978) selon laquelle la teneur en azote de ce dernier pourrait être excessive pour de nombreuses espèces. La teneur en azote doit être limitée dans toutes les phases de la croissance de *D trifida*. Mais, la supériorité du milieu MS/2 à la phase d'accélération de la caulogénèse y établit l'avantage d'un abaissement du rapport NO₃/NH₄.

Cette variation dans la nature du milieu optimal avec l'évolution de la culture se retrouve pour la teneur en sucre, pour l'équilibre BAP/AIB et pour les teneurs respectives de ces hormones. Ainsi la croissance en phase initiale aurait peut-être pu bénéficier de teneurs en BAP supérieures à celles expérimentées, alors que la teneur est optimale à la phase suivante avec le dixième du maximum employé. On aura également remarqué, pour l'enracinement, la substitution de l'ANA à la BAP et à l'AIB, précédant la

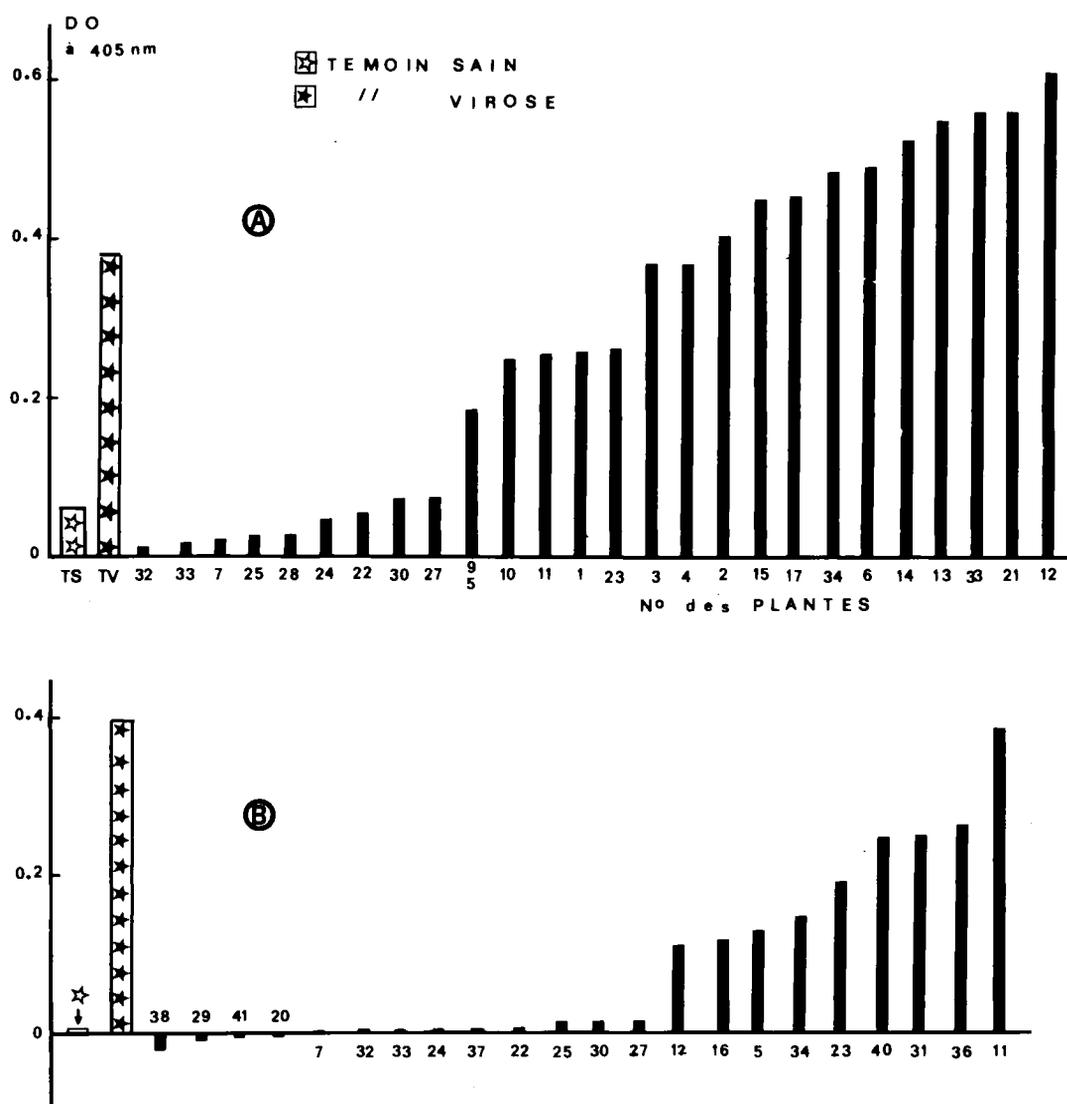


Fig 7. Détection du YMV par le test Elisa chez des plantes de *D trifida* cv INRA 5-20 (sauf témoin sain : *D cayenensis-rotundata*), 60 min après le dépôt du substrat. A. Test réalisé au mois de février; B. Test réalisé au mois d'avril.

suppression de toute hormone. On retrouve, en passant, la spécificité bien connue de l'ANA exploitée en horticulture (Margara, 1980) et confirmée en culture *in vitro* des *Dioscorea* par Chaturvedi (1975), Datta *et al* (1981), Cortes-Monllor et Liu (1983). Cette adaptation séquentielle de milieux à la croissance et à l'organogenèse *in vitro* correspond à la démarche de plusieurs auteurs chez d'autres plantes et pour divers objectifs, tels Boxus (1974) pour la propagation accélérée de fraisiers sains, ou Margara (1982) pour la néoformation de méristèmes. Chez l'igname, si elle est pratiquée par la plupart des chercheurs pour la néoformation (callogenèse puis organogenèse), elle demeure rare en micropropagation nodale et n'est pas signalée dans les cultures d'apex réussies. Ne serait-ce pas l'une

des raisons du taux très modeste de régénération 19% déclaré chez *D alata* par Mantell *et al* (1980) ?

– La détection du virus de la mosaïque de l'igname chez *D trifida* en provenance de la Guadeloupe, avec l'antisérum d'origine africaine de Thouvenel et Fauquet, confirme le résultat obtenu par Edwige (Marchoux, 1980) sur diverses espèces des cultures antillaises.

Le taux d'élimination paraît peu élevé, dans nos essais, en comparaison des résultats obtenus chez le manioc (Karthä, 1981) ou le bananier (Surga-Rivas, 1983). Il est vrai que Mantell *et al* (1980) n'avaient obtenu aucune élimination chez *D alata* sans recourir à la thermothérapie de la plante mère. Une amélioration de nos ré-

sultats pourrait donc être envisagée en associant la thermothérapie à l'isolement *in vitro* des apex.

En conclusion, la mise en œuvre des techniques de culture *in vitro* nous a permis d'obtenir des plantes débarrassées du virus de la mosaïque de l'igname par isolement des apex de *D trifida* (Saleil, 1986). Cette méthode s'ajoute à celle mise en œuvre chez la même espèce par Balagne (1985). Cet auteur a appliqué au clone INRA 5-20 une thermothérapie, de 42 °C sur 22 j de croissance de vitroplantules initialement âgées de 20 j. La micropropagation nodale des portions développées pendant le traitement, chez les plantes moyennement virosées, conduit à des régénérations saines. Le nombre d'individus traités dans les 2 cas étant malgré tout limité, il n'est pas possible d'évaluer comparativement les 2 méthodes. On peut supposer que tout comme la micropropagation nodale (Arnolin, 1985), l'efficacité de chacune pourra varier avec le clone. Mais on doit noter que comparativement aux résultats de Mantell et Haque (1979) la régénération à partir de méristème apical de *D trifida* est obtenue bien plus rapidement que celle de *D alata* (6 mois après prélèvement de l'apex). A notre connaissance, *D trifida* n'avait pas encore bénéficié de l'application complète de la culture d'apex à sa sélection sanitaire, les obtentions récentes de clones de cette espèce à partir d'apex, signalées par Salazar et Fernandez (1985), n'ayant pas été testées pour l'élimination de virus.

Les résultats obtenus permettent de proposer le schéma de la figure 8 pour la culture *in vitro* de *D trifida* en vue de l'élimination du YMV.

Certes, les conditions de la recontamination et de sa vitesse, en particulier, doivent être étudiées pour une application à la production commerciale de *D trifida* où l'on peut craindre (Marchoux, 1980, Balagne, 1985) des recontaminations rapides en saison de plantation usuelle. Les résultats présentés n'en constituent pas moins une nouvelle avancée dans les possibilités de modernisation de la culture de l'igname, y compris les échanges génétiques.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient vivement P Dublin, qui en tant que directeur du laboratoire de culture des tissus du CIRAD a contribué à l'élaboration de cette recherche.

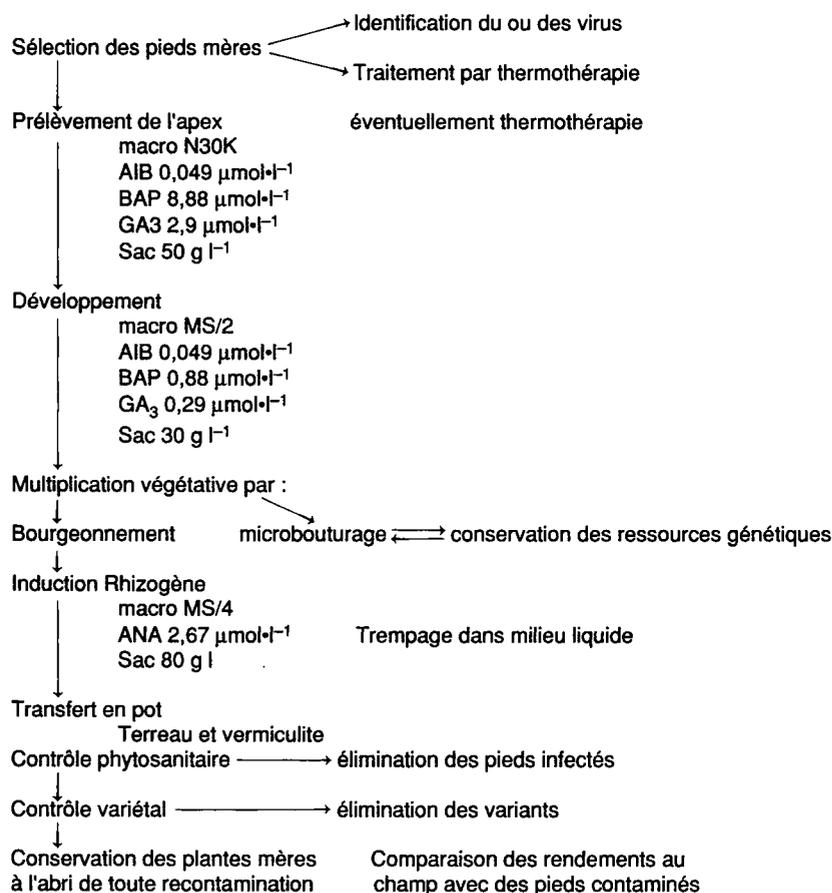


Fig 8. Schéma de production de plantes saines par les cultures d'apex chez l'igname *Dioscorea trifida* L.

JC Thouvenel, virologue du centre ORSTOM de Côte-d'Ivoire pour la fourniture de l'antisérum utilisé et JB Quiot (INRA) du laboratoire de phytovirologie des pays chauds (CIRAD) qui a très aimablement permis l'étude immuno-enzymatique et a bien voulu faire bénéficier notre rédaction de judicieuses observations. F Dosba et G Marchoux ont, par leurs critiques constructives, permis une rédaction et une réflexion plus rigoureuses. Nous les assurons de notre gratitude.

RÉFÉRENCES

- Adsuar J (1955) A mosaic disease of the yam *Dioscorea rotundata* in Puerto Rico. *J Agric Univ PR* 39, 11-144
- Arnolin R (1980) Culture *in vitro* et amélioration de l'igname (*Dioscorea* L.). In : *L'igname*, Séminaire int, Guadeloupe, les colloques de l'INRA, 1981, 255-268
- Arnolin R (1985) Bouturage *in vitro* et production de plants chez l'igname (*Dioscorea* spp). Thèse de III^e cycle. Université Paris-Sud-Orsay. 140 p
- Arnolin R, Degras L (1983) *In vitro* culture: results and prospects for food yams. VI^e Symp ISTRC, Lima, Pérou, 21-26 février 1983, CIP, 641-648
- Balagne M (1985) Le microbouturage *in vitro* de l'igname cousse-couche, *Dioscorea trifida* en vue de son application pour la guérison de variétés atteintes de viroses. Thèse de 3^e cycle en Sci agron, option Biol appl l'agric, USTL, Montpellier, 144 p
- Boxus P (1974) The production of strawberry plants by *in vitro* micropropagation. *J Hort Sci* 49, 209-210
- Chaturvedi MC (1975) Propagation of *Dioscorea floribunda* from *in vitro* culture of single-node stem segments. *Curr Sci (Bangalore)* 4423, 839-841
- Clark MF, Adams AN (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J Gen Virol* 34, 475-483
- Cortes-Monllor A, Liu LJ (1983) Tissue culture propagation of yam in Puerto-Rico. *J Agric Univ P R* 65, 419-420
- Coursey DG (1967) *Yams*. Longmans, London, 230 p
- Datta SK, Datta K, Datta PC (1981) Propagation of yam *Dioscorea composita* through tissue culture. In: *Tissue culture of economically important plants*. Proc of the Inter Symp held at the National Univ of Singapore, 28-30 avril 1981, (Rao AN ed) 90-93
- Degras L (1978) Les problèmes d'amélioration génétique de l'igname vus à travers ceux de *Dioscorea trifida* L. In: *Yams* (Miege J, Lyonga SN, eds) Inter Seminar on Yams. Buea Cameroun. Clarendon Press, Oxford, 1982, 3-16
- Degras L (1983) Different behaviours of cultivars of *D alata* and *D trifida* cultivated *in vitro*. *Proc of Caribbean Regional Workshop on tropical Root Crops*. David Dolly, Jamaïque, 209-214
- Degras L (1986) *L'igname*. Tech agric et prod trop, Maisonneuve et Larose, Paris, 409 p
- Degras L, Arnolin R, Poitout R (1980) Les principaux défauts de l'igname cousse-couche *D trifida* et les recherches pour leur correction génétique. In : *L'igname*, Séminaire int Guadeloupe, les colloques de l'INRA, 1981, 221-228
- Fauquet C, Thouvenel JC (1987) *Maladies virales des plantes en Côte-d'Ivoire*. Orstom, 243 p
- Gautheret R (1959) *La culture des tissus végétaux*. Masson, Paris. 863 p
- Grewal S, Koul S, Sachdeva V, Atal CK (1977) Regeneration of plants of *Dioscorea deltoidea* Wall by apical meristem cultures. *Indian J Expl Biol* 15, 201-203
- Harrisson BD, Roberts IM (1973) Association of virus-like particles with internal brown spot of yams (*Dioscorea alata*). *Trop Agric* 50, 335-340
- Kartha KK (1981) Meristem culture and cryopreservation. Methods and applications. In: *Plant tissue culture*. (Thorpe TA, ed) 181-211
- Mantell SH, Haque SQ (1979) Disease-free yams: their production, maintenance and performances. Caribbean Agric Res Dev Inst Trinidad, *Yam Virus Bull* 2, 22 p
- Mantell SH, Haque SQ, Phelps RH (1977) Virus diseases of yams in the Commonwealth Caribbean, ODM Yam virus project. Technical Report
- Mantell SH, Haque SQ, Phelps RH (1978) Clonal multiplication of *Dioscorea alata* L and *Dioscorea rotundata* Poir yams by tissue culture : *J Hortic Sci* 53, 95-98
- Mantell SH, Haque SQ, Whitehall AP (1980) Apical meristem tip culture for eradication of flexuous rod viruses in yams (*Dioscorea alata*). *Trop Pest Manage* 2627
- Marchoux G (1980) Pathologie des ignames en Guadeloupe. Maladies virales. In : *L'igname*. Séminaire international, Guadeloupe. Les colloques de l'INRA, 1981, 93-100
- Marchoux G, Edwige S, Migliori A (1979) Sur quelques propriétés biologiques du virus de la mosaïque de l'igname *Dioscorea* spp, isolé en Guadeloupe. *Ann Phytopathol* 11, 535-538
- Margara J (1978) Mise au point d'une gamme de milieux minéraux pour les conditions de la culture *in vitro*. *CR Acad Agric Fr* 8, 651-661
- Margara J (1980) La culture de méristème et d'apex de tige. In : *La multiplication végétative des végétaux supérieurs*. (Chaussat R, Bigot C, eds) Gauthier-Villars, 115-131
- Margara J (1982) Bases de la multiplication végétative. Les méristèmes et l'organogenèse. INRA, 262 p
- Migliori A, Cadilhac B (1976) Contribution à l'étude de la maladie à virus de l'igname *Dioscorea trifida* en Guadeloupe. *Ann Phytopathol* 8, 73-78
- Mohamed N, Mantell SH (1976) Incidence of virus symptoms in yam (*Dioscorea* sp) foliage in the Commonwealth Caribbean. *Trop Agric* 53, 255-261

- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15, 437-494
- NG SYC (1988) Tissue culture of cassava and yams at IITA. In : *Use of biotechnology for the improvement of Cassava, Yams and Plantain in Africa*. IITA Meeting Reports Series 1988/2, 49-50
- Reckhaus P, Nienhaus F (1981) Etiology of a virus disease of white yam (*Dioscorea rotundata*) in Togo. *J Plant Dis Prot* 88, 492-509
- Salazar S, Fernandez ZZ (1985) Thermoherapy, shoot tip culture, axillary bud proliferation and plant regeneration in yam. (*Dioscorea trifida* L.). *Vllth Symp Int Soc Trop Root Crops*. Gosier (Guadeloupe) 1-6 July 1985, INRA, 1988, 439-445
- Saleil V (1986) Développement *in vitro* des apex isolés à partir de deux espèces d'igname : *Dioscorea alata* et *Dioscorea trifida*. Thèse de 3^e cycle, Sciences agron, option Phytotech, USTL, Montpellier, 149 p
- Sawada E, Yakuwa T, Imakawa S (1958) Studies on the formation of aerial tubers in Chinese yam. II. On the aerial tuber formation in sterile culture of vine segments. *J Hortic Assoc* 27, 241-244
- Sengupta J, Mitra GC, Sharma AK (1984) Organogenesis and tuberization in cultures of *Dioscorea floribunda*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 3, 325-331
- Surga-Rivas JG (1983) Obtention de plantes indemnes de certaines infections parasitaires par culture d'apex isolés *in vitro* chez deux cultivars de bananier : «Poyo» et «Giant Cavendish» (*Musa*, groupe AAA, sous-groupe Cavendish). Thèse de Docteur-Ingénieur, USTL, Montpellier. 148 p
- Terry ER (1978) A *Dioscorea rotundata* virus disease in Nigeria. In : *Yams. Int Seminar on Yams. Buea Cameroun*. (Miege J, Lyonga SN, eds) Clarendon Press, Oxford, 1982, 239-244
- Thouvenel JC, Fauquet C (1977) Une mosaïque de l'igname (*Dioscorea cayenensis*) causée par un virus filamenteux en Côte-d'Ivoire. *CR Acad Sci Paris CCLXXXIV*, 1947-1949
- Thouvenel JC, Fauquet C (1979) Yam mosaic, a new potyvirus infecting *Dioscorea cayenensis* in the Ivory Coast. *Ann Appl Biol* 93, 279-283
- Thouvenel JC, Fauquet C (1980 a) Problèmes virologiques de l'igname en Côte-d'Ivoire. In : *l'Igname*. Séminaire international, Guadeloupe. Les colloques de l'INRA, 1981, 101-105
- Thouvenel JC, Fauquet C (1980 b) Utilisation de la technique ELISA dans le diagnostic de la mosaïque de l'igname. *2^e Conf Int sur l'impact des maladies à virus sur le développement des Pays Africains et du Moyen-Orient*. Nairobi 2-6 déc 1980
- Thouvenel JC, Fauquet C (1986) Yam Mosaic Virus, Description of Plant Viruses, N° 314, *Assoc Appl Biol Kew*, Surrey, England
- Uduebo AE (1971) Effect of external supply of growth substances on axillary proliferation and development in *Dioscorea bulbifera*. *Ann Bot* 36, 159-163