

CAPACITÉ MORPHOGÉNÉTIQUE *IN VITRO* DE QUELQUES ACCESSIONS D'IGNAMES DU COMPLEXE *DIOSCOREA CAYENENSIS* / *D. ROTUNDATA* CULTIVÉES AU BENIN ET ÉVALUATION DE LA QUALITÉ D'ADN DU MATÉRIEL RÉGÉNÉRÉ

Corneille AHANHANZO^{1*}, Arnaud AGBIDINOUKOUN¹, Clément AGBANGLA¹, Adolphe ADJANOHOOUN², Brice Serge KUMULUNGUI³, Paul ONDO OVONO³, Ralph Aymard NDONG NZANG³ et Alain P. SOUZA³

¹*Laboratoire de Génétique et des Biotechnologies, Faculté des Sciences et Techniques (FAST), Université d'Abomey-Calavi (UAC), 01BP 526 Cotonou, Bénin*

²*Institut National de Recherche Agronomique du Bénin (INRAB)*

³*Institut National Supérieur d'Agronomie et de Biotechnologies (INSAB), Université des Sciences et Techniques de Masuku, USTM, Franceville, Gabon*

* Correspondance, e-mail : corneillea@yahoo.com

RÉSUMÉ

Cette étude vise à une amélioration de la production *in vitro* des semences modernes (vitroplants), performantes et génétiquement conformes des ignames (*Dioscorea spp*) cultivées au Bénin afin d'assurer une meilleure conservation de leurs génotypes. Pour y parvenir, le comportement morphogène de six génotypes d'ignames du complexe *Dioscorea cayenensis-D. rotundata* (Moroko, Ala, Kogan, Mogli, Tara et Tankpannou) a été testé dans trois milieux de cultures de compositions différentes (MS, M50 et 2GH1) supplémentées ou non de régulateurs de croissance (BAP, ANA). Les paramètres étudiés sont le taux de débourrement, le nombre de feuilles et de racines, la hauteur de la pousse et la longueur de la racine principale. Ensuite, une étude comparative des ADN des plantes mères à celui des vitroplants à l'aide des marqueurs microsatellites a été menée afin d'évaluer l'impact des manipulations *in vitro* sur le génome des vitroplants. Les résultats indiquent que 90% des génotypes ont une meilleure réactivité dans le milieu MS suivi du milieu M50 (50%), cependant, aucune réactivité n'est observée dans 2GH1. Le fort taux d'enracinement est observé chez l'accession Moroko alors que l'accession Ala affiche le grand nombre de feuilles. Par ailleurs, les résultats relatifs au test conformité du génotype révèlent que la culture *in vitro* n'a pas d'impact sur la structure de l'ADN des vitroplants régénérés.

Mots-clés : *igname, morphogénèse, génotype, vitroplants, ADN, marqueurs microsatellites, Bénin*

ABSTRACT***In vitro* morphogenetic capacity of yam accessions (complex *Dioscorea cayenensis* / *D. rotundata*) from Benin and evaluation of DNA fidelity for regenerated plants**

The aim of this study was to improve the *in vitro* culture technology to produce the seeds such as vitroplants, efficient and guarantee conform genotypes as the field genotypes of cultivated yams (*Dioscorea spp*) in order to their conservation. Thus, morphogenesis aptitude of six yam genotype's of the complex *Dioscorea cayenensis* - *D. rotundata* (Moroko ,Ala, Kogan, Mogli, Tara, Tankpannou) was tested in three different cells culture media (MS, M50 and 2GH1) supplemented or not with regulators (BAP and NAA). The parameters such as the rate of regeneration, the number of leaves and roots, the height of the shoot and the length of the root were determinate. Then, the impact of *in vitro* technique on the genome of vitroplants was evaluated by the comparison of the field plants DNA's and their vitroplants DNA's using microstates markers. Results indicate that 90% of genotypes have a better reactivity in MS medium and 50% in M50 medium but no reactivity in 2GH1 medium. Highest rate of root is produce by Moroko and Ala the more of leaves. One the other hand, a comparative of the DNA of field plants and their vitroplants showed that the *in vitro* culture have no effect on the genom of regenerated plants of all accessions and confirm that genotypes fidelity.

Keywords : *yam, morphogenesis, genotype, vitroplants, DNA, microstates markers, Benin*

I - INTRODUCTION

Les plantes à racines et tubercules, aliments de base en Afrique tropicale, représentent un atout majeur dans la recherche de solutions inhérentes aux problèmes de sécurité alimentaire en Afrique. L'igname (*Dioscorea spp*), deuxième au classement des plantes à racines et tubercules après le manioc cultivée en Afrique [1], devrait contribuer à répondre à cette demande. L'igname est une plante remarquablement importante dans la vie sociale, économique et culturelle des populations des pays tropicaux. L'Afrique de l'Ouest, avec les cinq grands pays producteurs (Côte d'Ivoire, Ghana, Togo, Bénin et surtout Nigeria) forme de loin la zone de production la plus importante au monde. Cette région couvre presque 90% des superficies cultivées, d'où son nom de "yam belt" ou de "civilisation" de l'igname [2]. Étroitement liée à l'histoire sociale et culturelle, la culture de l'igname

représente un symbole fort de l'identité des populations [3]. Ainsi au Centre et au Nord du Bénin, zones d'intense production d'igname, certaines variétés sont utilisées dans les cérémonies, comme offrandes aux ancêtres ou pour protéger les champs des mauvais esprits.

En dépit de son importance, ses techniques culturales sont encore toujours traditionnelles [4]. Sa culture est sujette à plusieurs contraintes dont la non disponibilité et l'inadéquation des variétés locales au système de production [5]. De plus, la baisse de fertilité des terres consécutives à la croissance démographique et aux pratiques culturales d'exploitation a induit une baisse des rendements [6]. La difficile conservation des tubercules frais occasionne des pertes post-récolte assez importantes (65 - 85 % du poids du tubercule) et une irrégularité des disponibilités tout au long de l'année [7]. Les ignames du complexe *Dioscorea cayenensis*/*D. rotundata*), lors du stockage sont sous l'influence de plusieurs facteurs physiologiques tels que la germination, la dormance, les pertes d'eau par déshydratation mais également sous l'influence de facteurs non physiologiques responsables de nombreuses pertes [8] dont les insectes, les rongeurs, les nématodes et les champignons [9]. Du coup, la conservation des ignames *in situ* (au champ ou dans les magasins) ne garantit pas une meilleure conservation du pool génétique des ignames cultivés.

En revanche, les méthodes de conservation *ex-situ*, à travers la culture des tissus offrent une alternative dans la recherche de solutions aux problèmes inhérents à la conservation des ressources phytogénétiques. La réussite de la culture des tissus et organes passe par plusieurs étapes dont la phase d'établissement des tissus en vue de leur régénération et de leur micropropagation. Toutefois, plusieurs facteurs peuvent avoir un impact sur l'efficacité de cette approche: le génotype, la présence ou l'absence de régulateurs de croissance [10 - 11], le type d'explant, la photopériode [12], la teneur en saccharose ou en éléments minéraux [13 - 14], ont rapporté que certaines accessions d'ignames et spécifiquement celles appartenant au complexe *Dioscorea cayenensis*/*D. rotundata* sont récalcitrantes à la techniques de culture *in vitro*. Il faut donc jouer sur la composition du milieu de culture pour stimuler leur régénération et leur multiplication conforme afin de garantir la stabilité du génome, laquelle est le fondement de toute technique de conservation. Or, certains auteurs ont rapporté que les techniques de culture *in vitro* peuvent induire des phénomènes épigénétiques susceptibles de modifier le phénotype des pousses régénérés. De tels phénomènes ont été observés lors de la culture des cals montrant des variations somaclonales [15 - 19]. La fréquence de ces mutations dépend du génotype [20], de l'explant, de la nature et la concentration des régulateurs de croissance, du nombre de subcultures et de la durée de la culture [21].

Plusieurs méthodes sont utilisées pour la détection de ces phénomènes épigénétiques et de variations somaclonales telles que la description morphologique, l'analyse du caryotype, les marqueurs isosymiques [22 - 23]. Cependant ces méthodes ont montré leurs limites. Seuls les marqueurs moléculaires permettent de nos jours de révéler avec plus de précision l'existence de modifications du génome du matériel végétal régénéré [24 - 25]. A notre connaissance, aucune recherche n'a utilisé les marqueurs moléculaires dans la vérification de la stabilité du génome de l'igname régénéré *in vitro* au Bénin. C'est dans ce cadre que le présent travail se situe et vise à optimiser la capacité morphogénétique *in vitro* de quelques accessions d'ignames du complexe *Dioscorea rotundata*/ *D. cayenensis* cultivés au Bénin puis à évaluer de la qualité du matériel régénéré.

II - MATÉRIEL ET MÉTHODES

II-1. Obtention et prélèvement des explants des plantes mères

Les tubercules sains de six accessions d'ignames (Moroko, Ala, Kogan, Mogli, Tara et Tankpanou) toutes du complexe *Dioscorea cayenensis* / *D. rotundata* ont été collectés dans les centres de recherche agricoles du Centre (Savè) et du Nord Bénin (Ina). Ces tubercules sont plantés dans le champ expérimental du Laboratoire de Génétique et de Biotechnologies. Deux mois après, des jeunes pousses sont obtenues comme plantes mères. Des explants (fragments de tiges porteurs d'au moins un nœud) sont prélevés sur ces plantes mères.

II-2. Désinfection des explants

Les explants prélevés au champ sont rincés à l'eau du robinet avant d'être acheminés dans la salle de mise en culture. Ils sont à nouveau rincés à l'eau distillée stérile sous hotte à flux laminaire horizontal puis immergés successivement dans de l'alcool à 70° pendant 5 minutes et dans une solution aqueuse de chlorure mercurique (HgCl_2 à 0,1%) à laquelle on ajoute quelques gouttes du tween 20 pendant 10 minutes. Les explants sont ensuite soumis à 3 rinçages successifs dans de l'eau distillée stérile pendant 5 minutes par rinçage.

II-3. Mise en culture des explants

Les fragments de tiges désinfectés sont débarrassés des parties nécrosées à l'aide d'un scalpel. Seuls les explants vigoureux sont ensemencés verticalement dans les tubes à essai (16mm x150mm) contenant différents milieux de culture. Il s'agit du milieu MS [26] et deux autres milieux dérivés de ce dernier (M50 et 2GH1). Les tubes sont par la suite scellés à l'aide du papier cellophane puis placés dans une chambre de culture à une température de $27^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ et une photopériode contrôlée (16 h de lumière pour 8 h d'obscurité). L'humidité relative de la salle est maintenue à 80%. La croissance des vitroplants a été suivie pendant 5 semaines. Les paramètres pris en compte sont le taux de débourrement, le nombre moyen de feuilles, le nombre moyen de racines, la longueur de la racine principale et la hauteur des pousses.

II-4. Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN des échantillons a été faite selon le protocole décrit par [27], modifié par [28]. 0,2g de jeunes feuilles de chaque accession a été prélevé sur les pieds-mères et leurs vitroplants respectifs et broyé dans 2mL du tampon Tris-HCL (1M) - EDTA (0,5M) –Sorbitol (31,88g). Le broyat recueilli dans un eppendorf de 2mL est centrifugé à dix mille tours/minute pendant 10 minutes à 4°C . A l'issue de cette étape, le surnageant est éliminé, seul le culot est additionné de 750 μL du tampon MATAB à 4% préalablement préchauffé dans le bain marie à 65°C . Ce mélange est par la suite maintenu dans le bain marie à la même température pendant 1h 30 minutes avec agitation toutes les 10 minutes. Les échantillons sont ensuite repris dans 750 μL de Chloroforme Iso-Amyl Alcool (24:1 v/v) avant une seconde centrifugation. La phase supérieure aqueuse contenant l'ADN est recueillie.

L'ADN est enfin précipité avec de l'isopropanol froid ($- 20^{\circ}\text{C}$) et la pelote d'ADN est reprise dans le Tris EDTA. L'appréciation de la qualité et de la quantité des extraits de l'ADN a été faite par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% préparé avec le tampon TBE (Tris-Borate EDTA 1X). 2 μL de chacun des extraits est mélangé à 8 μL du tampon Bleu de migration. Le mélange ainsi obtenu est par la suite déposé dans les puits du gel. La révélation des bandes de l'ADN est faite au Bromure d'Ethidium (BET) à 10% pendant 20 minutes sous agitation. Après rinçage dans l'eau distillée pendant 5 minutes, l'observation est faite sur un transilluminateur.

II-5. Amplification par la réaction en chaîne de la polymérase (PCR)

La PCR est réalisé tel que décrit par [29]. Des dilutions des extraits d'ADN ont été effectuées pour obtenir des concentrations de l'ordre de 10 ng/μl nécessaires pour les amplifications. Le thermocycleur utilisé pour les amplifications est de type Peltier-Effect Cycling (PTC-100TM). Le cycle d'amplification comporte une pré-dénaturation à 94° C pendant 4 min suivi de 35 cycles, composés chacun d'une dénaturation à 94° C pendant 30 s, d'une hybridation à 51° C pendant 1 min et d'une élongation à 72° C pendant 1 min. Une incubation finale à 72° C pendant 8 min met fin au programme. Les produits PCR sont vérifiés sur gel d'agarose à 2 %. Une migration des amplifiats par électrophorèse a été réalisée sur un gel de polyacrylamide dénaturant à 5%. Le temps de migration est de 1 h 30 min à 2 h. Après migration, la révélation des électrophorégrammes est faite au nitrate d'argent.

II-6. Analyse des données

Le dispositif expérimental est un bloc complètement aléatoire constitué de trois essais. Trois milieux de culture ont été utilisés, à ce titre, chaque milieu représente un essai. Pour chaque essai, 15 tubes par accession ont été utilisés. Les essais ont été répétés deux fois. Les données obtenues ont été discriminées par une analyse de la variance (ANOVA) factoriel seuil de 5% à l'aide du logiciel STATISTICA 6.

III - RÉSULTATS

III-1. Taux de débourrement

Deux semaines après la mise en culture, cinq accessions sur les six ont débourré dans le milieu MS contre trois dans M50. Par contre, aucun débourement n'est observé dans 2GH1 (*Tableau 1*). Les accessions Moroko, Ala, Kogan, affichent les plus forts taux de débourement avec respectivement 66,6% 60% et 53,3% alors que Mogli et Tankpanou donnent les plus faibles avec respectivement 33,3% et 46,7% dans le milieu MS. De toutes les accessions, seules Ala, Moroko et Mogli ont débourré dès la deuxième semaine dans le milieu M50 avec des taux respectifs de 80% 86,7% et 20%. Aussi les résultats d'analyse statistique révèlent une différence hautement significative ($p=0,0$) entre les différents milieux. Il ressort de cette analyse que le milieu MS apparaît comme le milieu qui a un large spectre de réactivité (quatre accessions sur six ont débourré). Cependant, le milieu M50 est plus favorable pour les accessions Moroko et

Ala. N'ayant débourré dans aucun des trois milieux testés, Tara est l'accession qui affiche la plus faible aptitude au débourement.

Tableau 1 : Effet du milieu de culture sur le débourement des microboutures de différentes accessions de *Dioscorea* spp.

Accession	Milieu MS			Milieu M50			Milieu 2GH1		
	NE	NED	TD	NEE	NED	TD	NEE	NED	TD
<i>Moroko</i>	15	10	66,6%**	15	13	86,7%* **	15	0	0%
<i>Mogli</i>	15	5	33,3%	15	3	20,0%*	15	0	0%
<i>Kogan</i>	15	8	53,3%**	15	0	0,0%	15	0	0%
<i>Ala</i>	15	9	60,0%**	15	12	80,0%* **	15	0	0%
<i>Tankpanou</i>	15	7	46,7%*	15	0	0,0%	15	0	0%
<i>Tara</i>	15	0	0,0%	15	0	0,0%	15	0	0%

NEE= Nombre d'explants ensemencés, *NED*= Nombre d'explants débourrés, *TD*= Taux de débourement

III-2. Effet du milieu de culture sur le nombre de feuilles

Le *Tableau 2* présente l'effet du milieu de culture sur le nombre de feuilles. Il ressort que c'est le milieu MS qui a enregistré le plus grand nombre de feuilles avec une moyenne de 0,93 contre 0,15 pour le milieu M50. Aucune apparition des feuilles n'a été observée dans le milieu 2GH1. Le milieu de culture a de ce fait une influence sur la phylogénèse. L'analyse statistique a révélé une différence hautement significative ($P=0,0$) du nombre de feuilles dans les trois milieux testés.

Tableau 2 : Moyennes des feuilles par milieu après 5 semaines d'observations

Milieu de culture	Moyenne feuilles	Erreur-type	- 0.95	+0.95	N
Ms	0,93	0,039	0,87	1,01	15
M50	0,15	0,24	0,09	0,24	15
2GH1	0,00	0,48	0,00	0,00	15

III-3. Effet de la variété sur le nombre de feuilles

On observe une grande variabilité du nombre de feuilles d'une variété à l'autre (*Tableau 3*). Cependant le plus grand nombre de feuilles est observé chez Ala tandis que le plus faible est observé chez Tara. Moroko et Kogan ont sensiblement le même nombre de feuilles, il en est de même pour Mogli et Tankpanou. Aussi, l'analyse statistique a-t-elle révélé une différence hautement significative du nombre de feuilles chez les six variétés étudiées. Il ressort de cette analyse que c'est la variété Ala qui a une meilleure aptitude à la phylogénèse tandis que Tara a la plus faible.

Tableau 3 : Moyennes des feuilles par variétés après 5 semaines d'observations

Accessions	Moyenne	Erreur-type	- 0.95	+0.95	N
<i>Moroko</i>	0,46	0,12	0,36	0,58	15
<i>Ala</i>	0,67	0,08	0,56	0,79	15
<i>Mogli</i>	0,28	0,19	0,19	0,42	15
<i>Kogan</i>	0,40	0,13	0,30	0,53	15
<i>Tankpanou</i>	0,29	0,19	0,20	0,43	15
<i>Tara</i>	0,04	1,15	0,01	0,47	15

III-4. Interaction du milieu de culture et de la variété sur le nombre de feuilles

La *Figure 1* indique que toutes les variétés ont donné des feuilles dans le milieu MS. Seules Moroko et Ala ont donné des feuilles dans M50, alors qu'aucune variété ne s'est exprimée dans 2GH1. La p-value hautement significative ($P= 0,0$) explique les différences du nombre de feuilles

observées de chaque variété dans chaque milieu de culture. Il ressort de cette analyse que la variété Ala a donné le meilleur rendement dans tous les milieux où elle s'est exprimée avec une moyenne respective de 1,7 feuilles et 0,7 feuilles dans les milieux MS et M50.

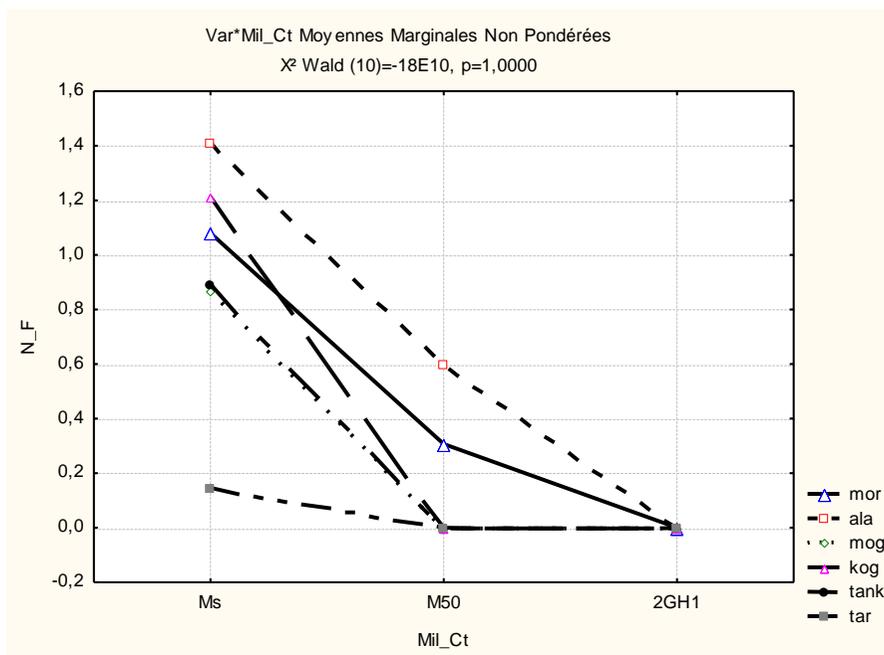


Figure 1 : Interaction du milieu de culture et de la variété sur le nombre de feuilles

III-5. Cinétique d'apparition des feuilles en fonction du temps

L'apparition des feuilles (**Figure 2**) est linéaire en fonction du temps lorsqu'on considère toutes les variétés testées. En effet, on observe une moyenne d'apparition des feuilles qui passe de 0,15 feuilles la première semaine à 0,65 feuilles à la cinquième semaine. Aussi, on observe des différences très hautement significatives ($p= 0,000$) de la première à la cinquième semaine.

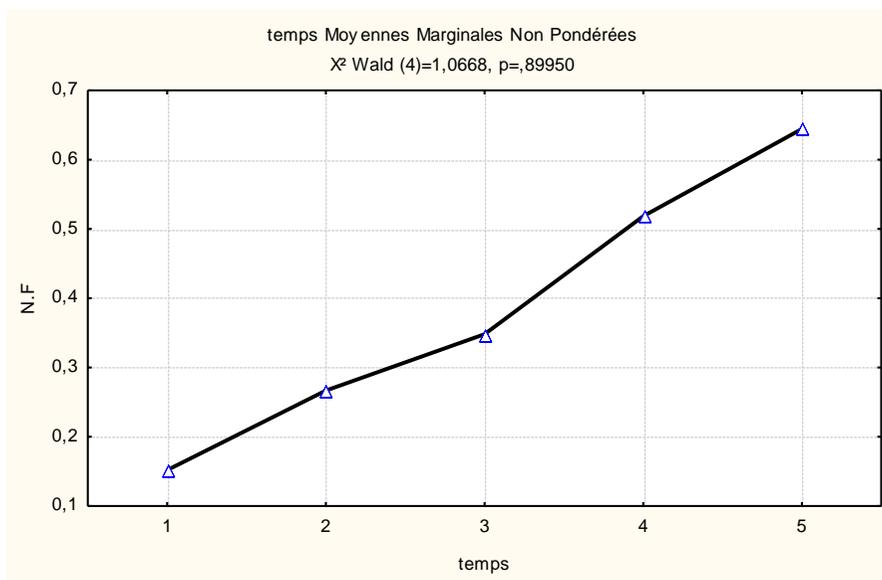


Figure 2 : Effet du temps sur l'apparition des feuilles

III-6. Effet du milieu de culture sur le nombre de racines

Le **Tableau 4** indique que le plus grand nombre de racines est observé sur le milieu MS avec une moyenne de 1,44 suivi du milieu M50 avec une moyenne de 0,8. Le milieu 2GH1 affiche la plus faible moyenne 0,13. Le milieu de culture seul ou combiné avec la variété et le temps a une influence significative sur le nombre de racines.

Tableau 4 : Nombre moyen de racines par milieu de culture après 5 semaines culture

Milieu de culture	Moyenne racine	Erreur-type	- 0,95	+0,95	N
Ms	1,44	0,07	1,25	1,65	15
M50	0,79	0,12	0,61	1,01	15
2GH1	0,13	0,74	0,03	0,58	15

L'évaluation de l'effet du milieu de culture sur l'apparition des racines a révélé une différence très significative ($p < 0,05$) du nombre de racines entre

les trois milieux testés. Il ressort clairement que la rhizogenèse est un phénomène qui est fonction de la composition du milieu de culture. Ce dernier est de ce fait le facteur principal qui influence le développement des racines des espèces végétales cultivées *in vitro*.

III-7. Effet de la variété sur le nombre de racines

Le **Tableau 5** présente l'effet de la variété sur l'apparition des racines. Une analyse de ce tableau montre une supériorité remarquable de la variété Moroko avec une moyenne de 2,4 comparativement aux autres variétés dans tous les milieux testés. La variété Kogan vient en deuxième position avec une moyenne de 1,0. Ala, Tankpanou, Mogli et Tara ont donné sensiblement la même moyenne du nombre de racines 0,5. Une analyse de la variance de ce test a révélé une différence très significative ($p < 0,001$).

Tableau 5 : Moyennes des racines par variété après 5 semaines d'observations

Accessions	Moyenne	Erreur-type	- 0.95	+0.95	N
<i>Moroko</i>	2,40	0,05	2,15	2,69	15
<i>Ala</i>	0,27	0,50	0,09	0,73	15
<i>Mogli</i>	0,56	0,24	0,34	0,91	15
<i>Kogan</i>	1,00	0,13	0,76	1,31	15
<i>Tankpanou</i>	0,23	0,59	0,07	0,74	15
<i>Tara</i>	0,25	0,53	0,09	0,73	15

III-8. Interaction du milieu de culture et de la variété sur le nombre de racines

Toutes les variétés ont donné des racines dans le Milieu MS exceptée la variété Ala qui affiche un résultat nul. Dans le milieu M50, seules Moroko, Ala, et Mogli ont donné des racines, tandis que dans le milieu 2GH1, seules Mogli et Kogan se sont exprimées. De toutes les variétés, c'est Mogli qui a

donné des racines dans les trois milieux testés mais avec une moyenne faible de 0,58 (**Figure 3**). Quel que soit le milieu où elle s'est exprimée, la variété Moroko a donné les meilleurs résultats. L'analyse statistique de l'interaction du milieu de culture et de la variété a révélé une influence hautement significative ($p < 0,001$) sur le nombre de racines.

Il ressort de cette analyse que l'aptitude à la rhizogenèse est liée non seulement au milieu de culture, mais aussi au génotype. De tous les génotypes testés, Moroko est la variété qui a une meilleure aptitude à la rhizogenèse

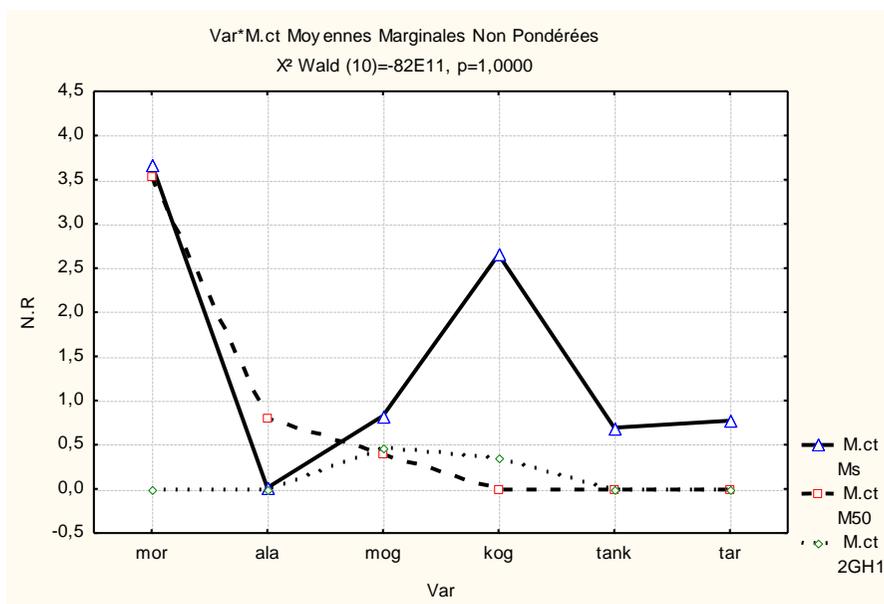


Figure 3 : Interaction du milieu de culture et de la variété sur le nombre de racines

III-9. Cinétique d'apparition des racines en fonction du temps

L'apparition des feuilles est linéaire en fonction du temps lorsqu'on considère toutes les variétés et les trois milieux testés. En effet, on observe une moyenne d'apparition des racines qui passe de 0,0 racine la première semaine à 1,8 racines à la cinquième semaine. Aussi l'analyse de la variance a révélé une différence très hautement significative ($p < 0,001$) du nombre de racines de la première à la cinquième semaine (**Figure 4**).

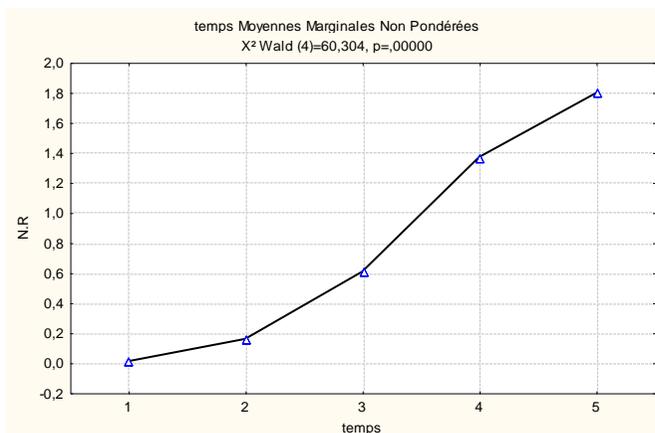


Figure 4 : Effet du temps sur l'apparition des racines

III-10. Etude comparative de la plus longue tige et la plus longue racine principale des accessions dans le milieu MS.

Les *Figures 5A et 5B* présentent les résultats d'une étude comparative de la plus longue tige et de la plus longue racine cinq semaines après la mise en culture sur le milieu MS.

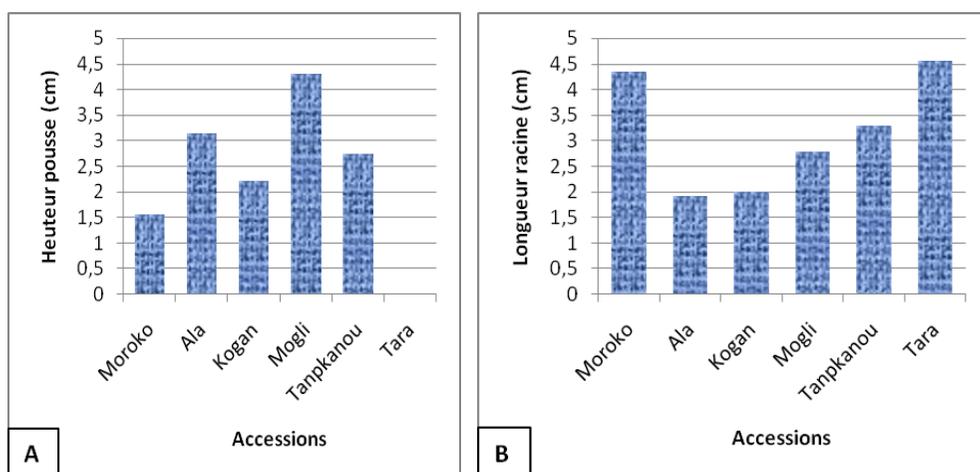
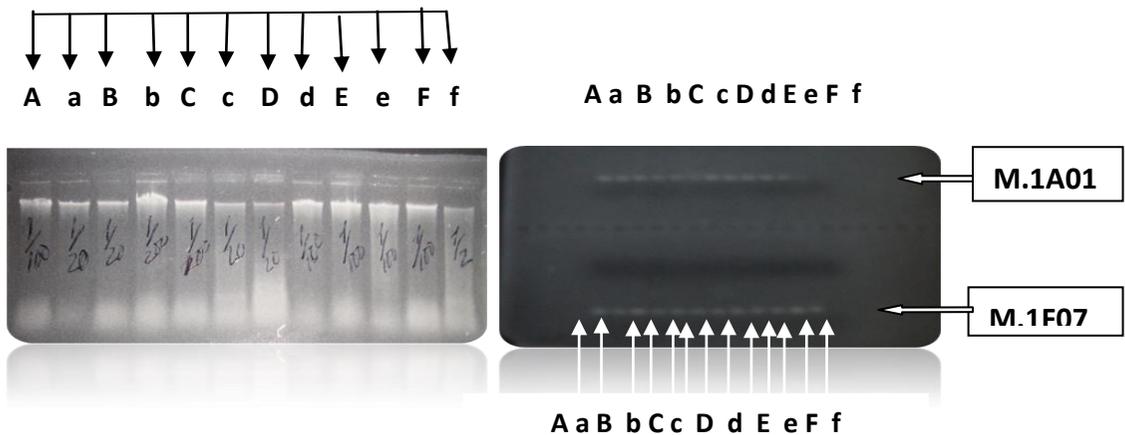


Figure 5 : Hauteur moyen des vitroplants (A) et longueur des racines (B) des six accessions testées sur le milieu MS.

On remarque que toutes les variétés ont donné des pousses exceptée Tara qui affiche une moyenne nulle (**Figure 5A**). La plus longue tige a été observée chez Mogli avec une moyenne de 4,3 cm suivie de Ala, Tankpanou, Kogan et Moroko avec respectivement des moyennes de 3,14 cm ; 2,74 cm ; 2,22 cm et 1,56 cm. La **Figure 5B** indique que toutes les variétés ont donné des racines. Tara et Moroko sont les deux variétés qui ont donné les plus longues racines avec des moyennes respectives de 4,56cm et 4,32cm comparativement aux autres variétés. Ala a affiché la moyenne la plus faible 1,92

III-11. Effet des pratiques *in vitro* sur la qualité de l'ADN des génotypes régénérés

L'analyse comparative entre le matériel génétique des plantes mères à celui des vitroplants après amplification par PCR a été menée. Les bandes d'ADN observées après photographie (**Figure 6**) n'ont révélé aucune différence significative entre l'ADN comparé des génotypes mère et celui des génotypes régénérés *in vitro*. De ce fait, on pourrait affirmer que les manipulations *in vitro* n'ont aucune incidence sur le matériel génétique des génotypes testés.



(a) Vérification sur gel d'agarose

(b) Vérification par des marqueurs microsatellites

Figure 6 : Photographies des bandes d'ADN des plantes- mères et des vitroplants correspondants.

NB : les lettres en majuscules indiquent les bandes d'ADN des plantes mères et les minuscules celles des vitroplants correspondant.

IV - DISCUSSION

Les explants de microboutures nodales sont des organes de multiplication végétative qui font intervenir des bourgeons néoformés. La protubérance de ces bourgeons axillaires observée dès la première semaine de culture chez certaines accessions n'est autre que le résultat d'une prolifération tissulaire. Cette protubérance s'avère être le passage obligatoire de toute croissance végétative chez l'igname [30]. Ce constat est en accord avec les travaux de [31] qui ont observé des gonflements dès le cinquième jour, des bourgeons axillaires sur des microboutures des espèces *D.alata*, *D. cayenensis*, *D.dumetrrum* et *D.esculenta*. Les résultats enregistrés au cours de la deuxième semaine ont montré que le milieu MS a permis une meilleure réactivité des géotypes car 90% des accessions testées ont débourré dès la deuxième semaine de culture, suivi du milieu M50 avec 50%. Ces performances pourraient être dues à la richesse en macroéléments de ces milieux comparativement au milieu 2GH1. En effet, les macroéléments des milieux MS et M50 se distinguent de ceux du milieu 2GH1 par leur concentration élevée en azote total. L'effet stimulateur de l'azote dans le phénomène d'organogenèse a été signalé chez l'olivier ([32 - 33] et chez plusieurs autres espèces telles que le maïs [34] et le blé [35]. Aussi [36] observent-ils que les macroéléments du milieu MS sont les plus favorables à l'initiation des explants lors d'une étude menée sur la valorisation des gousses et la micropropagation du Caroubier (*Ceratonia siliqua L.*). Le débourrement non seulement tardif (environ un mois après la mise en culture) mais aussi à un taux très faible, observé dans le milieu 2GH1 pourrait s'expliquer par une toxicité due à un effet antagoniste des régulateurs de croissance (BAP et ANA) dans ce milieu. Des cas similaires ont également été observés chez le Manioc (*Manihot esculenta L.*) et le Teck (*Tectonia grandis*) où on a observé un faible débourrement dans le milieu MS additionné des régulateurs de croissances à savoir la BAP et l'ANA pendant la phase d'initiation.

Les résultats obtenus durant la période d'observation de cinq semaines montrent une nette supériorité de la variété Ala par rapport à l'aptitude à la phylogénèse et de la variété Moroko par rapport à la rhizogénèse. De nombreux auteurs ont souvent montré que la phylogénèse *in vitro* résulte de l'emploi des cytokinines seules ou associées aux auxines chez de nombreuses espèces. L'utilisation courante de la BAP et de l'ANA comparativement aux autres cytokinines et auxines dans la stimulation de la phylogénèse et de la rhizogénèse est également signalée par plusieurs auteurs. Cependant, nous avons obtenu des résultats satisfaisants de phylogénèse dans le milieu MS et dans le milieu M50 alors qu'il n'y a eu aucun apport en régulateur de

croissance dans ces milieux comparativement au milieu 2GH1 qui a reçu 1mg.L^{-1} d'ANA et à $0,2\text{mg.L}^{-1}$ de BAP. Ce résultat mettrait en exergue l'existence de l'équilibre entre le rapport cytokinine/ auxine endogène à l'explant qui pourrait varier en fonction de leur teneur endogène dans l'explant d'une part et d'une espèce à une autre d'autre part. Autrement dit, la phylogénèse des génotypes d'igname pourrait dépendre d'un équilibre bien établi entre cytokinine/auxine dans le milieu de culture. Aussi [37] ont-ils montré que la capacité des explants à régénérer la plante entière serait liée à leur teneur *in vitro* en cytokinines et en auxines endogènes sur une étude d'amélioration du taux de multiplication *in vitro* du *Jatropha curcas*).

La variation de la moyenne d'apparition des feuilles dans le temps passant de 0,15 feuilles la première semaine à 0,65 feuilles la cinquième semaine prouve que la croissance *in vitro* de l'igname est linéaire. Ces résultats confirment ceux obtenus par [38] où il a également observé une croissance linéaire chez quatre variétés d'ignames des espèces *D.cayenensis*, *D.alata*, *D.esculenta*, et *D.dumetérum* sur une étude portant sur la morphogénèse *in vitro* de quelques génotypes d'igname. Le milieu de culture MS est plus convenable à tous les génotypes testés. Cependant, Tara pourrait être une accession récalcitrante au regard du retard de bourgeonnement axillaire qu'elle accuse non seulement dans le milieu MS mais aussi dans les autres milieux. Le milieu M50 est convenable seulement pour les accessions Moroko et Ala,. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par [10] sur une étude portant sur la morphogénèse et l'organogénèse de trois génotypes d'igname cultivés au Bénin où ils ont observé une différence de morphogénèse de trois génotypes d'ignames dans différents milieux de culture. La composition du milieu 2GH1 ne conviendrait pas à l'initiation de l'igname, mais, les protubérances observées chez certains génotypes dans ce milieu ont abouti à la formation des racines au détriment des feuilles. Ce résultat est tout à fait normal au regard de la prédominance de l'auxine sur la cytokinine dans ce milieu.

L'utilisation des marqueurs microsatellites dans cette étude a montré que la culture *in vitro* n'a pas eu d'impact sur le matériel génétique régénéré de toutes les variétés testées étant donné que les ADN des plantes mères et celui des vitroplants respectifs ont présenté les mêmes profils. [39] ont obtenu des résultats similaires lors d'une étude portant sur le comportement *in vitro* de deux espèces d'*Ocimum* et comparaison de la qualité de l'ADN de leurs vitroplants à celui des plantes mères. [25] ont également rapporté que les pousses régénérées de *Rosa hybrida cv* ont présenté les mêmes empreintes génétiques que les pieds-mères en utilisant les marqueurs RAPD et ISSR, ce

qui indique que la manipulation *in vitro* garantit une stabilité au sein du génome. Nos résultats corroborent aussi avec ceux de [24] qui ont montré à l'aide des marqueurs RAPD et ISSR que la culture *in vitro* n'a pas d'incidence sur la micropropagation du bananier (*Musa acuminata*, var).

V - CONCLUSION

Les résultats auxquels nous sommes parvenus nous ont permis de retenir que le milieu MS est plus indiqué pour l'initiation de tous les géotypes d'ignames du complexe *Dioscorea cayenensis*/ *D. rotundata*. Toutefois le milieu M50 est plus convenable pour certains géotypes. Par ailleurs, les tests de caractérisation moléculaire par la technique des microsatellites ont révélé que les ADN des plantes mères et ceux des vitroplants correspondants ont présentés les mêmes profils après électrophorèse sur gel d'agarose. Ceci témoigne que les manipulations *in vitro* n'ont aucune incidence sur le matériel génétique régénéré.

RÉFÉRENCES

- [1] - FAO. Faostat Fao Statistics Division. Available at: http://www.fao.org/es/ess/index_en.asp. (2012)
- [2] - J. MIEGE. Thèse de Doctorat ès- Sciences, Paris (1952)
- [3] - N. BRICAS, P. VERNIER. Bulletin du réseau TPA N° 18 (2000), 5-12
- [4] - A. Y. ADEGBOLA, C. L. HINNOU et S. A. ADEKAMBI. *Revue documentaire*. PAPA/INRAB, (2007)
- [5] - A. Y. ADEGBOLA ET S. A. ADEKAMBI. In: Contributed paper at the Joint 3rd Africa Association of Agriculture Economist (AAAE) and 48th Agriculture Economist Association of South Africa (AEASA) Conference, Cape Town, South Africa, (2010) 19-23
- [6] - J.C HINVI ET R. NONFON. In Ebert A.W., Djinadou K. (éds.), l'igname et la pomme de terre en Afrique de l'Ouest. Actes de l'atelier sous régional sur l'igname et la pomme de terre, INA, Bénin, Cotonou, WADSU/INRAB, (2000) 81-89
- [7] - J. M BABAJIDE, O. O. ATANDA, T. A. IBRAHIM, H. O. MAJOLAGBE, S. A. AKINBAYODE. African Journal of Microbiology Research, Vol 2 (2008) 292-298
- [8] - R. OKIGBO. Biological control of postharvest fungal rot of yam (*Dioscorea* spp.) with *Bacillus subtilis*, Mycopathologia, 156 (2005) 81-85
- [9] - P. K. ASSIRI, H. A. DIALLO ET S. AKE.. Journal of Applied Biosciences, 29 (2010). 1752 – 1765

- [10] - C. AHANHANZO, CH. B. GANDONOU, A. AGBIDINOUCOUN, A. DANSI, C. AGBANGLA. *African Journal of Biotechnology* 9(51) (2010) 8837-8843
- [11] - G. H. T. CACAÏ, C. AHANHANZO, J. S. DANGOU, S.S. HOUEJISSIN ET C. AGBANGLA. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 6(4) (2012)1593-1607
- [12] - T. KONE, M. KONE, D. KONE, T. H. KOUAKOU, S.TRAORE, Y.J. KOUADIO. *Journal of Applied Biosciences* 26 (2010) 1675 – 1686
- [13] - C.H. GANDONOU, J. M. ABRINI, M. IDAOMAR, N. SKALISENHAJI. *Belg. Journ. Bot.* 138 (2) (2005). 000-000
- [14] - C. AHANHANZO, C. AGBANGLA, F. TOUKOUROU, A. DANSI AND O. DAÏNOU *Annales des Sciences Agronomiques du Bénin*, 6(1) (2003) 89-102
- [15] - P.J. LARKIN and W.R SCOWCROFT. *Theoret. Appl.Genet.* 60 (1981) 197-214
- [16] - W. PLÄDER, S. MALEPSZY, W. BURZA, and Z. RUSINOWSKI. *Euphytica* 103 (1998). 9-15
- [17] - S.M JAIN, G. J, DE KLERK. *Plant tissue Culture Biotech.* 4 (1998) 63-75
- [18] - KANWAR, K. and K. BINDIYA. *Euphytica*, 132 (2003) 41-47
- [19] - K.P. MARTIN, S.K. PACHATHUNDIKANDI, C. L. ZHANG, A. SLATER, and J MADASSERY. *In Vitro Cellular andDevelopment Biology - Plant*, March-April, vol. 42, no. 2 (2006) 188-192.
- [20] - J. LOUREINO, A. CAPELO, G. BRITO, E. RODRIGUEZ and S. SILVA. *Bio Plantarum*, 51(2007), 7-14
- [21] - P. MALGORZATA. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, Vol. 13, (2005). 109-122
- [22] - A. BREIMAN, T. FLISENBURG and E. GALUN. *Theoret. Appl. Genet*, 77 (1989) 809-814.
- [23] - M. K. U. CHOWDHURY and J. K. VASIL. *Theoret. Appl. Genet*, 86(1993) 181-188.
- [24] - L. VENKATACHALAM, R. V. SREEDHAR, and N. BHAGYALAKSHMI. *Electronic Journal of Biotechnology* ISSN, vol.10, no.1, (2007), 0717-3458
- [25] - S. K SENAPATI, S. APARAJITA and G. R. ROUT. *African Journal of Biotechnology* Vol. 11(100), (2012), 16532-16538
- [26] - T. MURASHIGE and F. SKOOG. *Physiol. Plant.*, 15(3), (1962) 473-497.
- [27] - N. J. GAWEL, R. L. JARRET. *Plant. Mol*, 9 (1991), 262-266.
- [28] - C. AGBANGLA, C. AHANHANZO, S. TOSTAIN, A. DANSI and O. DAÏNOU. *J.Rech. Sci. Uni. Lomè (Togo)* 6 (1), (2002),197-202.
- [29] - A. A MISSIHOUN, C. AHANHANZO, C. AGBANGLA, H.CHAÏR, A. DANSI, AND K. AKPAGANA. *J. Rech. Sci. Univ. Lomé (Togo)* 11 (1), (2009) 31-39

- [30] - L. DEGRAS. In Compte- rendu de la conférence internationale sur l'igname, tenue du 2 au 6 Octobre 1978 à Buéa, Cameroun, (1982), 3-16.
- [31] - B. MALAURIE, O. PUNGU, and M. F. TROUSLOT., Plant cell, Tissue and organ culture, (1995), 229-235.
- [32] - E. RUGINI. Plant Cell. Tiss. Org. Cult, 14, (1988), 207–214.
- [33] - N. BRHADDA, A. ABOUSALIM and L. D. M. WALALI. Fruit 85 (3), (2003), 1-14.
- [34] - S. H. MIAO. Acta Bot. Sin. 22 (4), (1980), 356–359
- [35] - G.H. FENG, J. OUYANG. Plant Cell. Tissue Org. Cult. 12. (1988), 3–12.
- [36] - A. LARMATI and R. SAIDI. In Biotech , XIes Journées Scientifiques du réseau "Biotechnologies végétales / Amélioration des plantes et sécurité alimentaire" de l'Agence universitaire de la Francophonie, Agrocampus Rennes. Rennes, France, (2008), S5- P15.
- [37] - S. D MEDZA, G. MERGEAI, J. P. BAUDOIN., and A. TOUSSAINT. Tropicultura, 28, 4, (2010), 200-204.
- [38] - A. PETERS. Mémoire de fin d'études de l'ISTOM. Institut Supérieur des Techniques d'Outre-mer, Côte d'Ivoire, (1986)
- [39] - C. AHANHANZO, R. DOSSOUKPEVI, M. AGASSOUNON DJIKPO TCHIBOZO, C. AGBANGLA, and K. DRAMANE. Rev. CAMES - Série A, Vol. 09, (2009)