

RAPPORT DE STAGE

-.o.o-.o.o-.o.o-

Agbewadan Edouard CAPO-CHICHI

O.R.S.T.O.M.

Section de Botanique et Biologie végétale

---

Septembre 1974.

*Le stage a été effectué au Laboratoire de  
Physiologie Végétale de l'Université des Sciences et Techniques de Lille,  
sous la bienveillante direction de Monsieur le Professeur BOURIQUET auquel  
j'exprime ma vive gratitude pour les nombreux conseils qu'il m'a donnés,  
pour les moyens matériels qu'il a mis à ma disposition et pour la  
confiance totale qu'il m'a témoignée .-*

# INTRODUCTION

## MATERIEL ET TECHNIQUES

### I LE MANIOC : ASPECTS BOTANIQUES ET IMPORTANCE AGRONOMIQUE

=====

1°) Aspects botaniques

2°) Importance agronomique

### II TECHNIQUES

=====

1°) Culture en serre

2°) Culture in vitro

3°) Techniques histologiques

## RESULTATS

### I ETUDE DE LA RHIZOGENESE DE FRAGMENTS DE TIGE DE MANIOC

=====

#### A - CULTURE DES ENTRENOEUDS

1°) Action des sucres

2°) Action des substances de croissance

3°) Action des facteurs climatiques

#### B - CULTURE DES NOEUDS

1°) Action des sucres

2°) Action des substances de croissance

3°) Action des facteurs climatiques

4°) Influence de la partie aérienne sur la rhizogenèse

## II ESSAIS DE TUBERISATION IN VITRO

-----

### A - CONCEPTIONS ANCIENNES ET ACTUELLES DU MECANISME PHYSIOLOGIQUE DE LA TUBERISATION

- 1°) Théorie symbiotique et théorie osmotique
- 2°) Rôle des facteurs climatiques dans la tubérisation
- 3°) Théorie hormonale

### B - EXPERIENCE D'INDUCTION DE LA TUBERISATION IN VITRO

- 1°) Inhibition due aux conditions climatiques
- 2°) Inhibition due à l'action des substances inhibitrices de croissance

C O N C L U S I O N

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

## INTRODUCTION

Le Manioc occupe une place primordiale dans l'alimentation de nombreuses populations d'Afrique, d'Amérique du Sud et d'Asie. Il constitue même dans certains pays la nourriture de base et jouit d'une importance économique exceptionnelle. Pour cette raison, les principaux travaux qui lui ont été consacrés se sont orientés essentiellement vers des recherches sur l'amélioration du rendement, sur la toxicité des tubercules, sur la pathologie.

Il nous a paru intéressant de cultiver in vitro les tissus de Manioc et d'entreprendre, grâce à cette technique, des recherches préliminaires sur l'induction de la tubérisation de la plante. On sait en effet, que chez de nombreuses espèces, certains organes particuliers sont susceptibles à un moment donné de leur cycle végétatif, de se gorger de réserves et d'augmenter considérablement de taille. Chez le Manioc, ce sont les racines qui tubérisent. Nous envisagerons donc l'étude in vitro de la rhizogénèse du Manioc, puis, nous exposerons les résultats de nos essais de tubérisation. Il importe avant cela, de donner un aperçu général sur le matériel et de préciser les techniques utilisées.

## MATÉRIEL ET TECHNIQUES

### I - LE MANIOC : ASPECTS BOTANQUES ET IMPORTANCE AGRONOMIQUE

-----

#### 1°) Aspects botaniques :

Le Manioc appartient à la famille des Euphorbiacées, au genre Manihot. Les premiers botanistes qui l'ont étudié, ont signalé l'existence d'un grand nombre d'espèces mais aujourd'hui, de nombreuses synonymies ont été relevées. Par exemple, Pohl, en 1927, considérant le caractère cyanogénétique comme un critère de classification, distinguait les variétés amères (Manihot utilissima) des variétés douces (Manihot dulcis ou Manihot palmata). Or, l'on sait maintenant que les tubercules de toutes les variétés contiennent une substance dont le taux détermine l'amertume. Ces observations amènent donc à considérer ces épithètes comme synonymes de celle proposée par Von Crantz (1766) pour toutes les espèces cultivées. Nous avons en conséquence préféré pour désigner le Manioc, le terme Manihot esculenta.



Fig. 1 Manihot esculenta Crantz

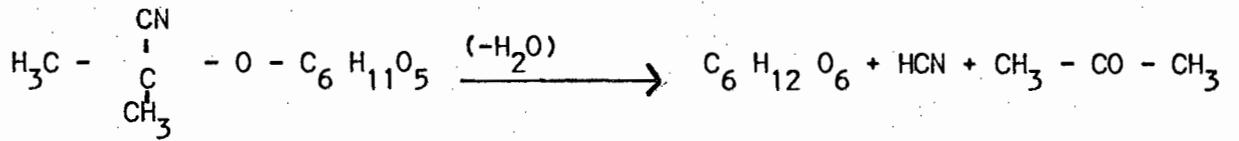
Crantz à Manihot utilissima Pohl.

Les avis sont très partagés sur l'origine du Manioc, mais la plupart des spécialistes admettent que la patrie de cette plante est le Nord-Est du Brésil et que son introduction en Afrique serait due au trafic d'esclaves.

Le Manioc est une plante arbutive pérenne de deux à quatre mètres de haut dans les cultures ; il atteint facilement cinq ou six mètres si on ne le récolte pas. Sa tige, noueuse et remplie de moelle, porte des feuilles alternes, caduques, généralement pétiolées, palmipartites ou palmisé-  
quées, accompagnées de deux stipules. Le limbe est divisé en lobes lancéolés dont le nombre varie entre trois et sept suivant les facteurs intrinsèques du végétal et les facteurs externes.

Le Manioc a une aire de culture pantropicale, c'est-à-dire qu'il se développe de préférence entre le Tropique du Cancer et le 30e degré de latitude Sud. Les principaux centres de culture sont : le Brésil, l'Indonésie, la Malaisie, les Philippines, la Thaïlande, le Ceylan, Madagascar et différentes régions d'Afrique où il occupe une place analogue à celle de la Pomme de Terre dans certains pays de la zone tempérée. La multiplication de la plante se fait uniquement par bouturage : des fragments de 20 à 30 cm de long sont choisis dans la partie moyenne de tiges bien aoûtées, saines, vigoureuses ; on les enfonce aux 3/4 environ dans la terre, horizontalement ou obliquement en prenant soin de laisser hors du sol 2 à 4 yeux. Cette opération s'effectue au début de la saison des pluies. L'entretien consiste à faire 2 ou 3 sarclages, à ramener la terre en butte autour des tiges, à supprimer les fleurs dès leur apparition. Les boutures émettent au début un grand nombre de racines traçantes qui s'enfoncent rapidement dans le sol et se gorgent de réserves à partir du collet, donnant de longs et gros tubercules qu'on récolte dès le 8e ou 10e mois. ; toutefois, c'est après 16 ou 18 mois que la proportion de féculs est la plus intéressante. Les tubercules doivent être utilisés aussitôt après l'arrachage car ils se conservent difficilement plus de 4 jours hors du sol. Ils sont particulièrement riches en féculs et en vitamine C ; leur teneur en matières azotées est cependant très faible. Ils renferment en outre, un glucoside mis en

évidence par Peckolt en 1886, la manihotoxine qui, par hydrolyse, se scinde en glucose acétone et acide cyanhydrique :



La manihotoxine est présente dans tous les clones de Manioc à des doses variables. Si un tubercule en renferme moins de 50 ug par gramme de matière fraîche, il est doux ; s'il en renferme plus de 200 ug par gramme de matière fraîche, il est amer. Selon Adriaens L. (1946, une dose de 1,4 mg par Kg de poids vif serait mortelle pour l'homme. La teneur en HCN augmente si la plante est cultivée dans des conditions défavorables. Il est à signaler d'autre part que la répartition de la manihotoxine n'est pas homogène dans une même racine.

Le Manioc est une plante monoïque dont les fleurs, unisexuées, se groupent en panicules terminales. Les boutons des fleurs femelles sont coniques et situés à la base de l'inflorescence, tandis que ceux des fleurs mâles sont arrondis et localisés au sommet. Toutes les fleurs sont apétales et de type 5.

Le calice de la fleur femelle est composé de 5 sépales libres et pétaloïdes ; l'ovaire, très développé est constitué de 3 carpelles soudés

La fleur mâle est plus petite ; ses 5 sépales pétaloïdes sont soudés à la base.

Le fruit est une capsule qui renferme 3 graines.

2°) Importance agronomique :

Le Manioc joue un rôle prépondérant dans l'alimentation de l'homme et du bétail.

a) Alimentation humaine :

De loin, ce sont les tubercules qui interviennent le plus dans la préparation des aliments destinés à la consommation humaine.

Toutes les opérations sont précédées par l'épluchage des tubercules et le rejet des parties riches en substances toxiques. En guise d'exemple, le Tableau I indique les transformations technologiques les plus importantes subies par les tubercules au Cameroun.

b) Alimentation du bétail :  
.....

Grâce à sa haute digestibilité, à son prix de revient intéressant, le Manioc est un élément de premier ordre pour la composition de certaines rations alimentaires. Divers auteurs assurent que ses féculents permettent d'obtenir des carcasses de qualité exceptionnelle et proposent de faire entrer dans la ration des porcs à l'engrais 40 % du Manioc.

Plus qu'aucune autre espèce alimentaire, le Manioc a suscité de longues discussions sur l'opportunité de son extension, à cause de sa pauvreté en protéines. Quoiqu'il en soit, sa culture triomphe de plus en plus. En outre, ses débouchés sont multiples : il peut être transformé en glucose, servir dans la panification, les pâtes alimentaires, la féculerie, les biscuiteries, la brasserie, les usines de filature et de tissage. On comprend qu'en dépit de la concurrence des céréales, il joue un rôle considérable dans l'économie des pays du tiers-monde.

II TECHNIQUES  
=====

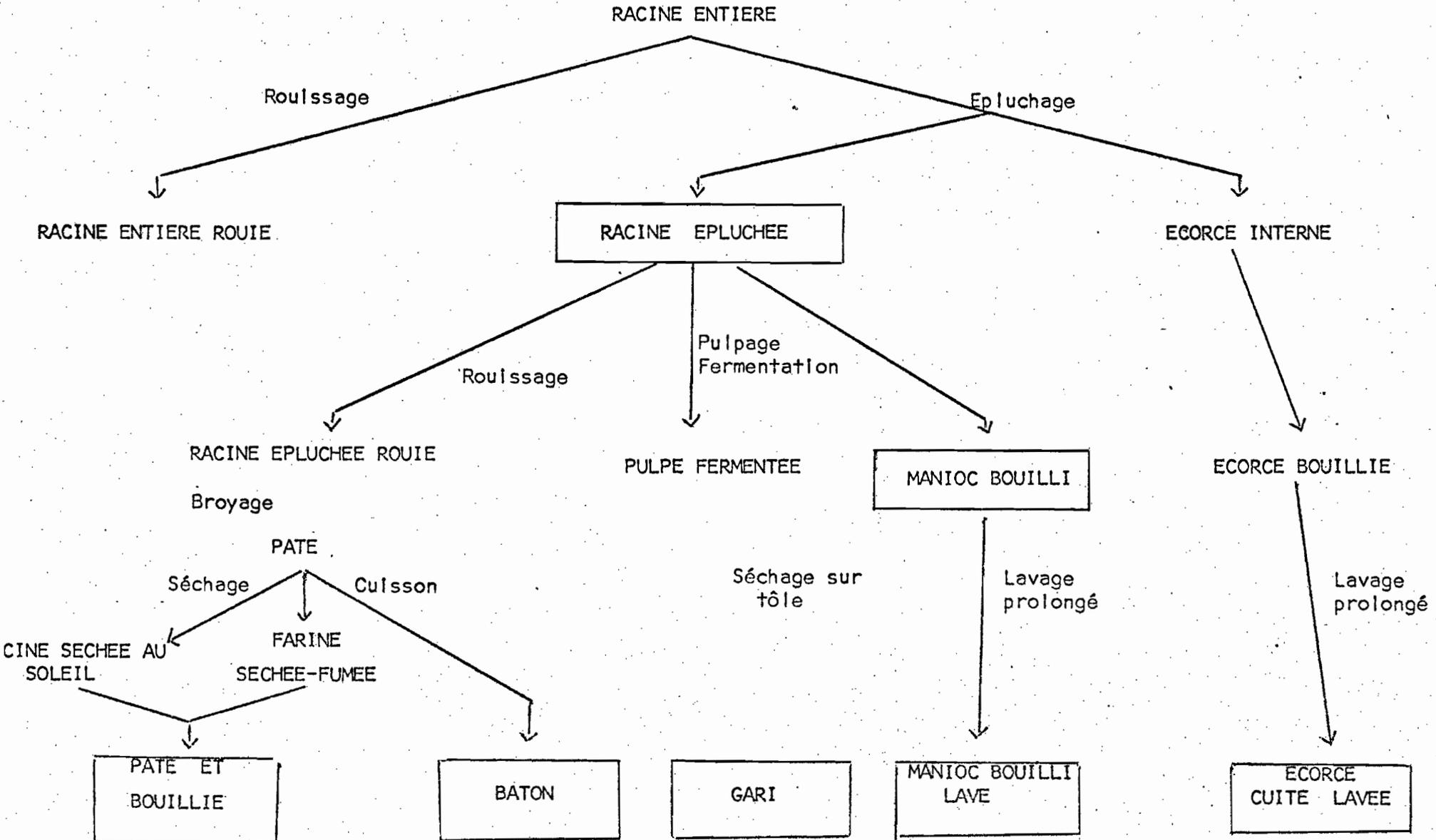
1°) Culture en serre :

Les boutures utilisées proviennent toutes du Centre de Recherches Agronomiques de Niaouli (Dahomey). Elles sont plantées dans des pots contenant un sol meuble sans terreau, arrosées uniquement avec de l'eau ordinaire afin de réduire au maximum les paramètres susceptibles d'intervenir dans le mécanisme physiologique que nous envisageons d'étudier. Les pots sont disposés dans un compartiment de serre maintenu par réglage thermostatique à 30° le jour, 25° la nuit, 80 % d'humidité et en photopériode 12/12. Au cours des expériences préliminaires, il nous est apparu que les résultats obtenus in vitro n'étaient pas toujours reproductibles lorsqu'on utilise indifféremment toutes sortes de variétés (Tabouca, Kataoli, Kalaba etc...). Aussi, pour pallier cet inconvénient et assurer un maximum d'homogénéité,

TABLEAU I : TECHNOLOGIE TRADITIONNELLE  
DE LA RACINE DE MANIOC

Extrait de : *Les Amylacées du Cameroun*  
 par Favier (J.C.), Chevassus-Agnès (S.) et Gallon (G.)

(les formes directement consommables sont encadrées)



avons-nous choisi de travailler sur une seule variété, la 1151, sélectionnée et cultivée à Niaouli.

## 2°) Culture in vitro :

La méthode utilisée est celle mise au point par Gautheret (1959). Nous n'en décrivons que les points qui intéressent directement ce travail.

### a) Préparation du matériel :

.....

Seules les jeunes pousses aériennes obtenues à partir des boutures ont servi pour la culture in vitro. En effet, lorsqu'on utilise de gros morceaux de tige ayant séjourné trop longtemps dans le sol, le taux de contamination des milieux de culture est fort élevé (95 %), ceci vraisemblablement parce que ces échantillons contiennent des microorganismes difficiles à éliminer au cours de la stérilisation. Les jeunes tiges présentent l'avantage d'être moins infectées. Elles seules nous ont donné des résultats intéressants (moins de 4 % de contamination).

### b) Stérilisation du matériel et prélèvement des explantats :

.....

La stérilisation se fait chimiquement : le matériel est d'abord lavé pendant 15 mn par du mercryl laurylé dilué à 5 %, puis stérilisé pendant 20 mn par l'hypochlorite de calcium à 9 %. L'élimination de l'antiseptique se fait par 3 rinçages successifs (5, 10 et 20 mn) à l'eau stérile.

Afin d'homogénéiser les explantats, on élimine la région apicale et basale des tiges.

### c) Les milieux de culture ; les conditions de culture ;

.....

Les différents milieux de culture ont été réalisés à partir d'un milieu de base comprenant la solution minérale de Heller et solidifié par 9 g/l de gélose. Ils sont éventuellement additionnés de facteurs de croissance à différentes concentrations. :

- l'acide indolyl acétique (A I A)
- l'acide naphtyl acétique (A N A)
- l'acide 2,4 dichlorophénoxyacétique (2,4-D)

- la 6 furfuroaminopurine ou kinétine (K)
- l'acide gibbérellique (A G<sub>3</sub>)
- l'A M O 16-18
- le C C C

Comme source de carbone, nous avons utilisé le glucose ou le saccharose. Le milieu proposé par Murashige et Skoog a été également employé.

Les milieux de culture ont été stérilisés par autoclavage à 110°C pendant 20 mn. Chaque condition expérimentale comprend 24 tubes de culture.

Les tissus étant ensemencés sur un milieu parfaitement défini, il était possible d'étudier l'influence des facteurs externes (lumière et température) ou celle des facteurs ajoutés au milieu de culture.

#### - Conditions de culture

Après ensemencement, les cultures sont placées dans des conditions (température et photopériode) différentes. Parfois, il a été nécessaire de modifier au cours de la culture, la composition du milieu. Dans ce cas, des transferts étaient indispensables et devaient être opérés délicatement : pour ne pas léser les tissus ou briser les racines qui commencent à apparaître, nous avons utilisé des milieux moins gélifiés (4 g/l) ou même liquides. Dans ce cas, l'immersion des explantats a été évitée par l'utilisation de supports métalliques préalablement stérilisés. Parfois, ces transferts ont été réalisés sur de la vermiculite (fig. 2).

#### 3°) Techniques histologiques :

Pour préciser les phénomènes observés, nous avons été amené à faire quelques observations histologiques suivant les méthodes classiques (celle de Langeron, 1949, modifiée par Jensen en 1962) : après fixation au piciformol de Bouin, les échantillons sont deshydratés à l'alcool, traités par le xylène et inclus dans la paraffine. Les coupes (10 µm) sont colorées par la double coloration safranine - fast green selon le protocole suivant :



Transfert sur un milieu liquide : parfois l'explantat peut tenir sans support .



Transfert sur milieu liquide : un support métallique peut être nécessaire pour empêcher l'immersion d'une partie de la tige.



Transfert sur de la vermiculite  
 (extrait de *Culture in vitro de Nanipot esculenta Crantz (p. 30) CAPO-CHICHI (A.E.)* )

Figure. 2

12 h de passage dans la safranine, 6 mn dans le fast green et 2 mn dans le mélange eugénoI - alcool absolu.

## R E S U L T A T S

### I ETUDE DE LA RHIZOGENESE DE FRAGMENTS DE TIGE DE MANIOC

=====

Nous considérerons successivement les cultures d'entreoeuds puis celle des noeuds.

#### A - CULTURE DES ENTRENOEUDS :

Trois types de facteurs se sont révélés importants dans la néoformation des racines par les fragments d'entreoeuds. Ce sont : les sucres, les substances de croissance et les facteurs climatiques (température et lumière).

##### 1°) Action des sucres :

###### a) mise en évidence de la nécessité d'un sucre :

Nous avons cultivé les entreoeuds de tige sur un milieu renfermant les sels minéraux de la solution de Heller et  $10^{-6}$  g/ml d'auxine (A I A ou A N A). Les tissus sont placés à 30°C et éclairés 12 h par jour.

En absence de sucre, il n'y a aucune prolifération et le poids frais moyen des explantats ne varie guère.

Par contre, en présence de sucre, les phénomènes d'organogénèse ont lieu très vite (fig. 3 et 4).

Les résultats démontrent nettement que le sucre est indispensable à la prolifération et à la néoformation des racines par les entreoeuds de Manioc.

###### b) Influence de la concentration et de la nature du sucre :

Les conclusions précédentes nous ont amené à essayer de déterminer d'une part la concentration minimale de sucre (glucose ou saccha-

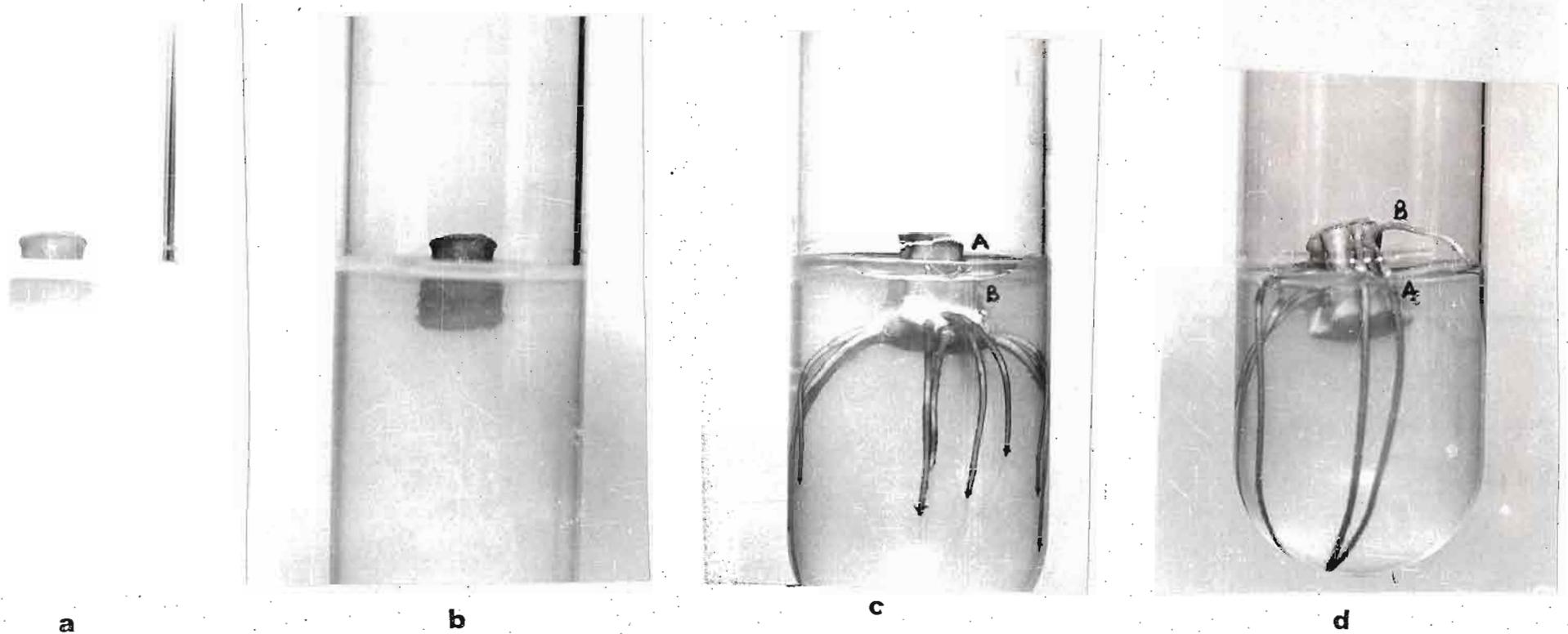


Figure 3 : Fragments d'entre-nœuds de Manioc cultivés pendant 3 semaines sur des milieux différents :

a : milieu renfermant les sels minéraux de Heller et 3 % de glucose

b : " " " " " " " "  $10^{-6}$  g/ml d'A I A  
(mais pas de sucre)

c et d : " " " " " " " " 3 % de glucose et  $10^{-6}$  g/ml d'A I A

A : région apicale des explantats

B : région basale " "

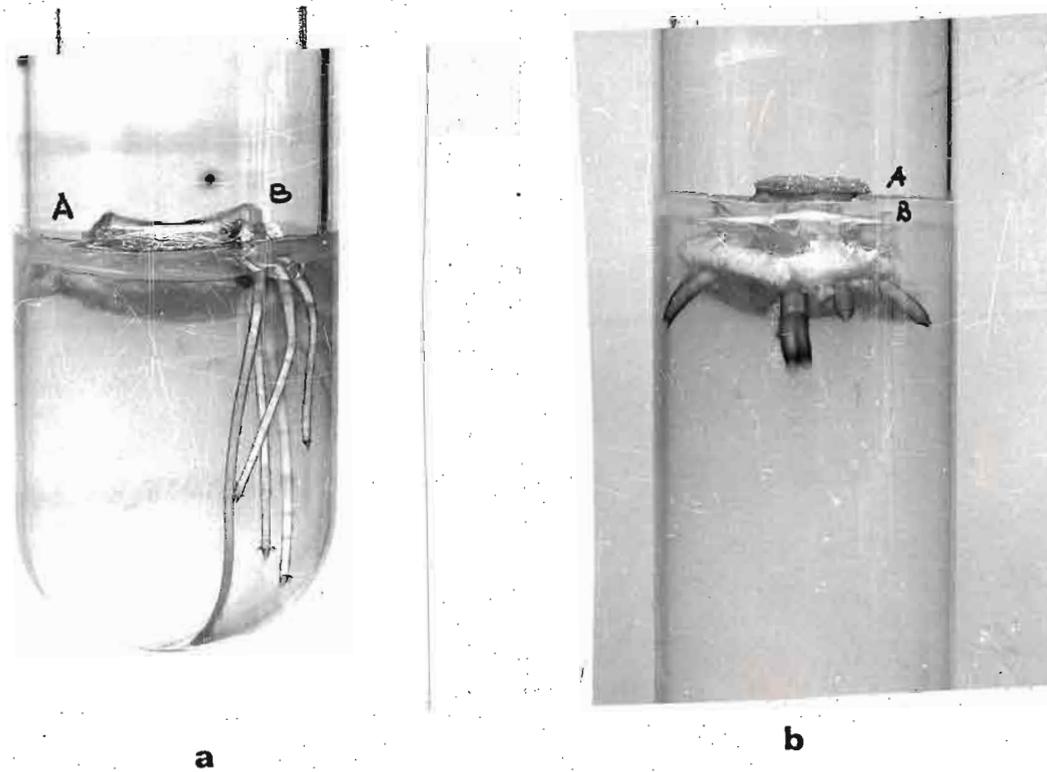


Figure 4 : Fragments d'entre-nœuds de Manioc cultivés pendant 3 semaines sur un milieu gélosé renfermant les sels minéraux de Heller, 3 % de glucose,  $10^{-6}$  g/ml d'auxine.

a : A | A : l'explantat, placé horizontalement sur le milieu de culture, montre que la néoformation des racines est polarisée

b : A N A

rose) nécessaire à l'organogenèse, d'autre part, l'influence de différentes concentrations.

Une faible concentration de glucose (1 %) suffit pour permettre la néoformation de racines ; le nombre moyen de racines obtenues par explantat est optimal en présence de 3 % de ce sucre ; il diminue sensiblement pour des concentrations supérieures et finit par s'annuler à 6 % (Tableaux II et IV).

De même (Tableaux III et V), 1 % de saccharose favorise l'apparition des racines ; lorsque le milieu renferme 4 % de saccharose, on atteint en moyenne 12 racines par explantat et il faut une concentration de 8 % de ce sucre pour inhiber complètement l'organogenèse.

Le saccharose dans les conditions de l'expérience, est donc plus rhizogène. Toutefois, en sa présence, les tissus se nécrosent précocement.

## 2°) Action des substances de croissance :

### a) Nécessité d'une auxine et influence de sa concentration :

Le bouturage du Manioc se faisant très facilement, on peut penser que les explantats renferment une quantité suffisante de substances de croissance capables d'induire la néoformation des racines. Cependant, sur un milieu dépourvu de facteur auxinique, les entrenoeuds ne manifestent pas le moindre phénomène d'organogenèse : l'auxine exogène est donc indispensable à la rhizogenèse.

Nous avons, en maintenant constants les autres facteurs (milieu,) (sels minéraux de Heller), sucre (glucose 3 %), température (30°C), lumière (12 h par jour), recherché la dose d'auxine optimale pour la rhizogenèse.

Les résultats obtenus au bout de 45 jours (Tableaux II; III; IV; V) indiquent que la concentration  $10^{-8}$  g/ml d'A I A est sans effet et que la  $10^{-5}$  g/ml favorise particulièrement la callogenèse ; la rhizogenèse commence à se manifester en présence de  $10^{-7}$  g/ml d'A I A : on obtient une moyenne de 2 racines par explantat ; elle est fortement exaltée à  $10^{-6}$  g/ml d'A I A (9,5 racines en moyenne par explantat). A cette concentration, on remarque que, dès les premiers jours de culture, la partie immergée des explantats augmente de taille ; les racines apparaissent à cet endroit à partir du

10ème jour. Quand la face racinaire des explantats est hors du milieu, un cal mou recouvre généralement l'extrémité supérieure de ces derniers, et dans ce cal, se différencient les racines à partir du 7ème jour. Plus tard, de nouvelles racines se forment tout le long de l'explantat (figure 3); elles se développent, atteignent éventuellement le milieu et s'y ramifient. Cette polarité de la rhizogénèse est confirmée lorsque les explantats sont disposés horizontalement à la surface du milieu, un repère indiquant sur le tube, la face racine: les racines sont produites uniquement par cette face ( figure 4 ): la polarité est donc très nette.

L'action de l'A N A, comme le montrent les Tableaux IV et V, est plus énergique que celle de l'A I A.

En présence de  $10^{-7}$  g/ml d'A N A, les racines néoformées sont longues, épaisses et ramifiées. Lorsque le milieu contient  $10^{-6}$  g/ml d'A N A, au bout de 3 jours de culture, la base de l'explantat augmente considérablement de volume : son diamètre moyen passe de 6 à 11,4 mm. Il se forme ensuite au sein du milieu de culture un cal important qui donne naissance à des racines ( 7 en moyenne ), courtes (3mm de longueur moyenne ), trapues (1mm de diamètre moyen ).

Utilisées à des concentrations supérieures à  $10^{-6}$  g/ml, l'A I A et l'A N A favorisent la callogenèse mais ici également, l'activité de l'A N A est supérieure à celle de l'A I A : les poids frais moyens de cal obtenus en présence d'A N A sont plus importants.

Avec le 2,4 D, seuls les phénomènes de prolifération cellulaire sont observés.

#### b) Action d'autres facteurs phytohormonaux: (tableau VI )

L'acide gibbérellique et la kinétine employés seuls, en absence de tout facteur auxinique n'ont aucune action. Toutefois ces hormones modifient les propriétés rhizogènes de l'auxine : les faibles doses d'acide gibbérellique (  $10^{-7}$  g/ml ) avancent la date d'apparition des racines alors que les plus fortes (  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  g/ml ) la retardent d'environ 10 jours. La kinétine contrarie l'effet rhizogène de l'A I A et de l'A N A mais stimule fortement la prolifération cellulaire.

Concentration Glucose en %	d'AIA en g/ml	$10^{-8}$			$10^{-7}$			$10^{-6}$			$10^{-5}$	
		Racines	nombre moyen	longueur moyenne en mm	diamètre moyen en mm	nombre moyen	longueur moyenne en mm	diamètre moyen en mm	nombre moyen	longueur moyenne en mm	diamètre moyen en mm	Racines
0		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1		-	1,1	6	0,5	1,9	7	0,5	-	-	-	0,580
2		-	1,5	6	0,5	2,3	7	0,5	-	-	-	0,692
3		-	2,0	5	0,5	9,5	28	0,5	-	-	-	1,100
4		-	2,0	5	0,5	5,1	24	0,5	-	-	-	1,050
5		-	2,0	5	0,5	3	14	0,5	-	-	-	0,500
6		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABLEAU II : Action du glucose et de l'AIA sur le développement des fragments d'entre-nœuds de Manioc

\*\*\*\*\*

Concentration d'AIA en g/ml Saccharose en %	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-7</sup>			10 <sup>-6</sup>			10 <sup>-5</sup>	
	Racines	nombre moyen	Racines longueur moyenne en mm	diamètre moyen en mm	nombre moyen	Racines longueur moyenne en mm	diamètre moyen en mm	Racines	Poids frais moyen de cal/explantat (en g)
1	-	1	5	0,5	2	19	0,5	-	0,500
2	-	1	5	0,5	4,8	30	0,5	-	0,550
3	-	2,2	8	0,5	10	30	0,5	-	1,500
4	-	3	8	0,5	12	35	0,5	-	1,550
5	-	3	8	0,5	8,2	29	0,5	-	1,450
6	-	2,8	7	0,5	5	20	0,5	-	1,430
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABLEAU III : Action du saccharose et de l'AIA sur le développement des fragments d'entre-noeuds de Manioc

\*\*\*\*\*

Concentration Glucose en %	Concentration d'ANA en g/ml	$10^{-8}$			$10^{-7}$			$10^{-6}$			$10^{-5}$	
		Racines	nombre moyen	longueur moyenne en mm	diamètre moyen en mm	nombre moyen	longueur moyenne en mm	diamètre moyen en mm	Racines	Poids frais moyen de cal/explantat (en g)		
0		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1		2,2	2,2	10	0,6	2,4	4	1	-	0,600		
2		-	3,1	15	0,7	3,5	3	1	-	0,800		
3		-	7,4	20	0,7	7,0	3	1	-	1,560		
4		-	6,9	20	0,7	7,0	3	1	-	1,500		
5		-	6,9	15	0,7	3,5	3	0,8	-	0,900		
6		-	-	-	-	-	-	-	-	-		

TABLEAU IV . : Action du glucose et de l'ANA sur le développement des fragments d'entre-nœuds de Manioc

\*\*\*\*\*

Concentration d'ANA en g/ml	10 <sup>-8</sup> Racines	10 <sup>-7</sup>			10 <sup>-6</sup>			10 <sup>-5</sup>	
		nombre moyen	longueur moyenne en mm	diamètre moyen en mm	nombre moyen	longueur moyenne en mm	diamètre moyen en mm	Racines	Poids frais moyen de cal/explantat (en g)
1	-	2	18	0,6	2	4	1	-	0,700
2	-	2	20	0,6	2	3	1	-	1,200
3	-	7,5	30	0,7	7,8	3	1	-	1,600
4	-	7,2	34	0,7	7,5	3	1	-	1,590
5	-	7	30	0,7	5,1	3	1	-	1,000
6	-	4,2	27	0,6	3	3	1	-	0,900
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABLEAU V Action du saccharose et de l'ANA sur le développement des entrenoeuds de Manioc

Conditions de culture		Résultats		
ou $AG_3$ } seul K		Aucune action		
		<i>Début de la rhizogenèse</i>	<i>Nbre moyen / explantat</i>	<i>Poids moyen frais / explantat (en g)</i>
$10^{-6}$ A   A seul		10e jour	9,5	
$10^{-6}$ A   A + {	$10^{-7}$ $AG_3$	7e	5,1	
	$10^{-6}$ $AG_3$	20e	2,2	
	$10^{-5}$ $AG_3$	20e	2,0	
-----				
$10^{-6}$ A   A + {	$10^{-7}$ K	Pas de rhizogenèse		0,200
	$10^{-6}$ K			0,600
	$10^{-5}$ K			0,540
$10^{-6}$ A N A seul		Callogenèse + rhizogenèse		1,560
$10^{-6}$ A N A + {	$10^{-7}$ K	pas de rhizogenèse		1,600
	$10^{-6}$ K			2,100
	$10^{-5}$ K			1,900
$10^{-6}$ 2,4 D + {	$10^{-7}$ K	pas de rhizogenèse		2,800
	$10^{-6}$ K			3,000
	$10^{-5}$ K			2,200

TABLEAU VI : Action de l'acide gibbérellique et de la kinétine seuls ou associés à l'auxine sur le développement des entrenoeuds de Manioc

### 3°) Action des facteurs climatiques:

#### a) Mise en évidence de l'influence de la température (figure 5) :

Un premier essai a consisté à placer les explantats ensemencés sur le milieu habituel à différentes températures : 15°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C.

A 15°C, le développement des explantats est pratiquement imperceptible et quelle que soit la durée de l'expérience, il n'y a jamais néoformation de racines.

A 25°C, il est lent; le nombre moyen de racines obtenues par explantat en fin de culture est de 2,1.

30°C semble être la température optimale: en effet, elle accélère les phénomènes d'organogenèse (9,5 racines en moyenne par explantat). Il est vrai que cette température correspond mieux à celle du biotope du Manioc. Nous l'avons en conséquence adoptée pour toutes les études concernant la rhizogenèse des entrenoeuds.

Les températures supérieures à 30°C provoquent rapidement un gonflement basal des explantats mais après quelques jours, les tissus se nécrosent sans avoir donné de racines.

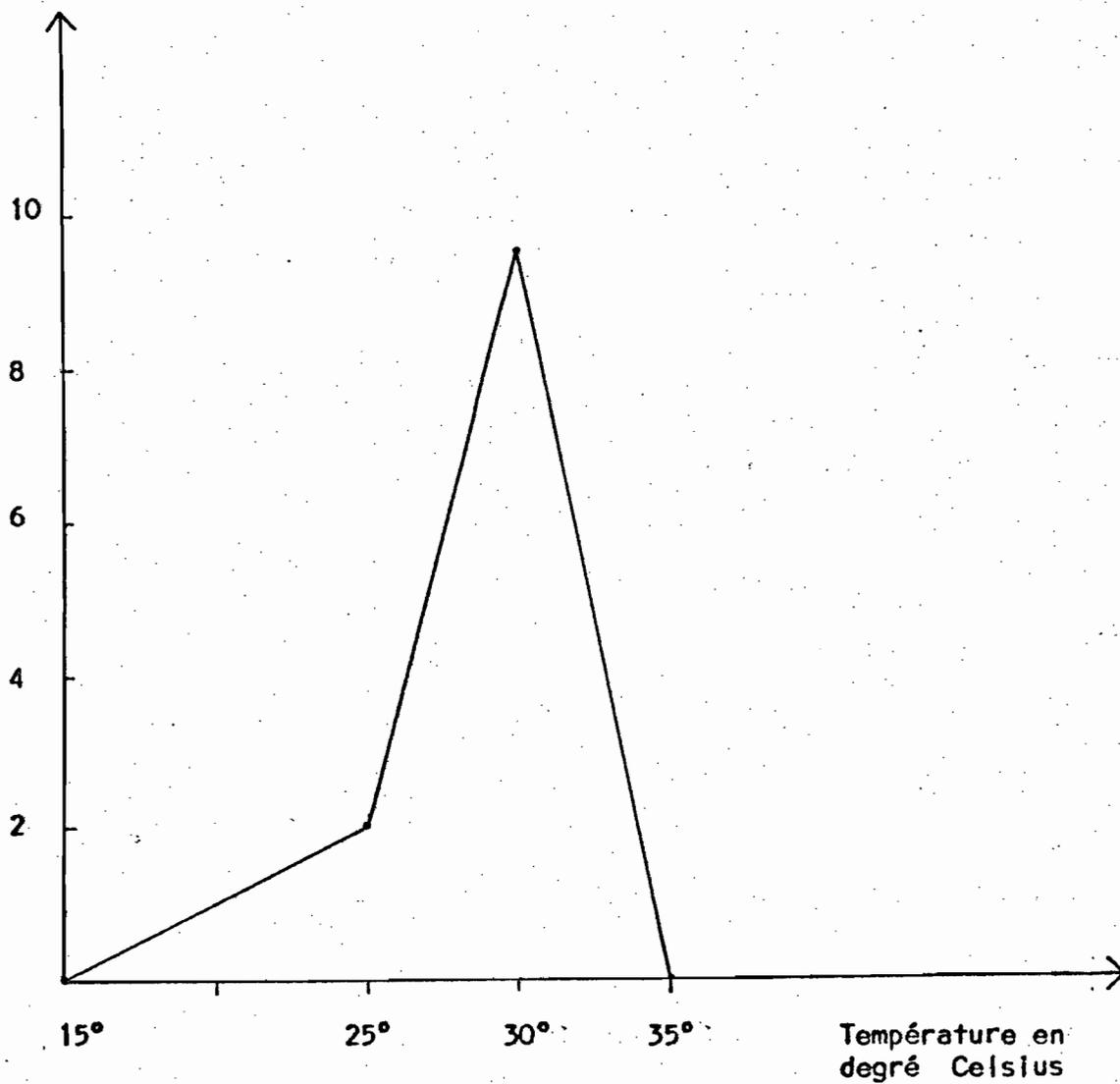
Si 30°C semble la température la plus favorable au développement des tissus parce qu'elle accélère les phénomènes de prolifération et de différenciation, il faut noter qu'elle hâte également le vieillissement des tissus, sur lesquels des nécroses apparaissent dès la 4ème semaine de culture. D'autre part, lorsque les explantats sont placés à cette température aussitôt après l'ensemencement, 60 % d'entre eux seulement produisent des racines. Nous avons amélioré ce pourcentage (96 %) en plaçant les tissus à 25°C pendant une semaine avant de les porter à 30°C.

#### b) Action de températures alternées :

Compte tenu des résultats précédents, nous avons étudié l'action de modifications de la température au cours de la culture. Pour éviter les interférences entre la lumière et la température, les essais ont été réalisés en lumière continue.

En plaçant les tissus à des températures froides (4°C) ou fraîches (15°C) pendant 48 h soit au début de la culture, soit au moment où les racines commencent à apparaître, c'est-à-dire au 10e jour de culture, les résultats obtenus sont différents.

Nbre moyen de racines par explantat  
après 45 jours (moyenne calculée sur  
48 explantats)



**Figure 5** : Influence de la température sur la rhizogenèse  
d'entre-nœuds de Manioc ensemencés sur le milieu de Heller  
+ 3 % de glucose +  $10^{-6}$  g/ml d'A I A .

Nbre moyen de racines par explantat après 45 jours (moyenne calculée sur 48 explantats)

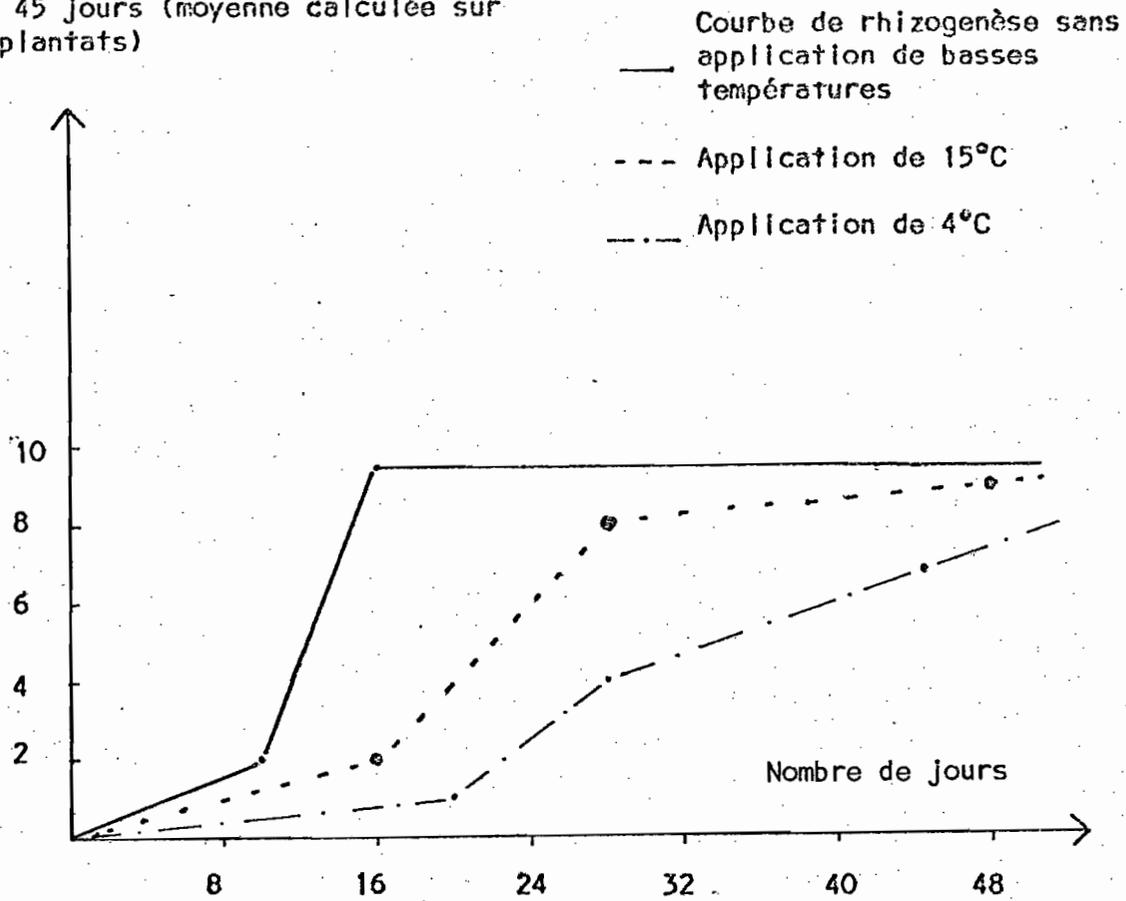


Figure 6 : Influence, sur la rhizogenèse des entrenoeuds de Manioc, d'un traitement à 4°C ou à 15°C pendant les premières 48 h de culture.

Nbre moyen de racines par explantat après 45 jours (moyenne calculée sur 48 explantats)

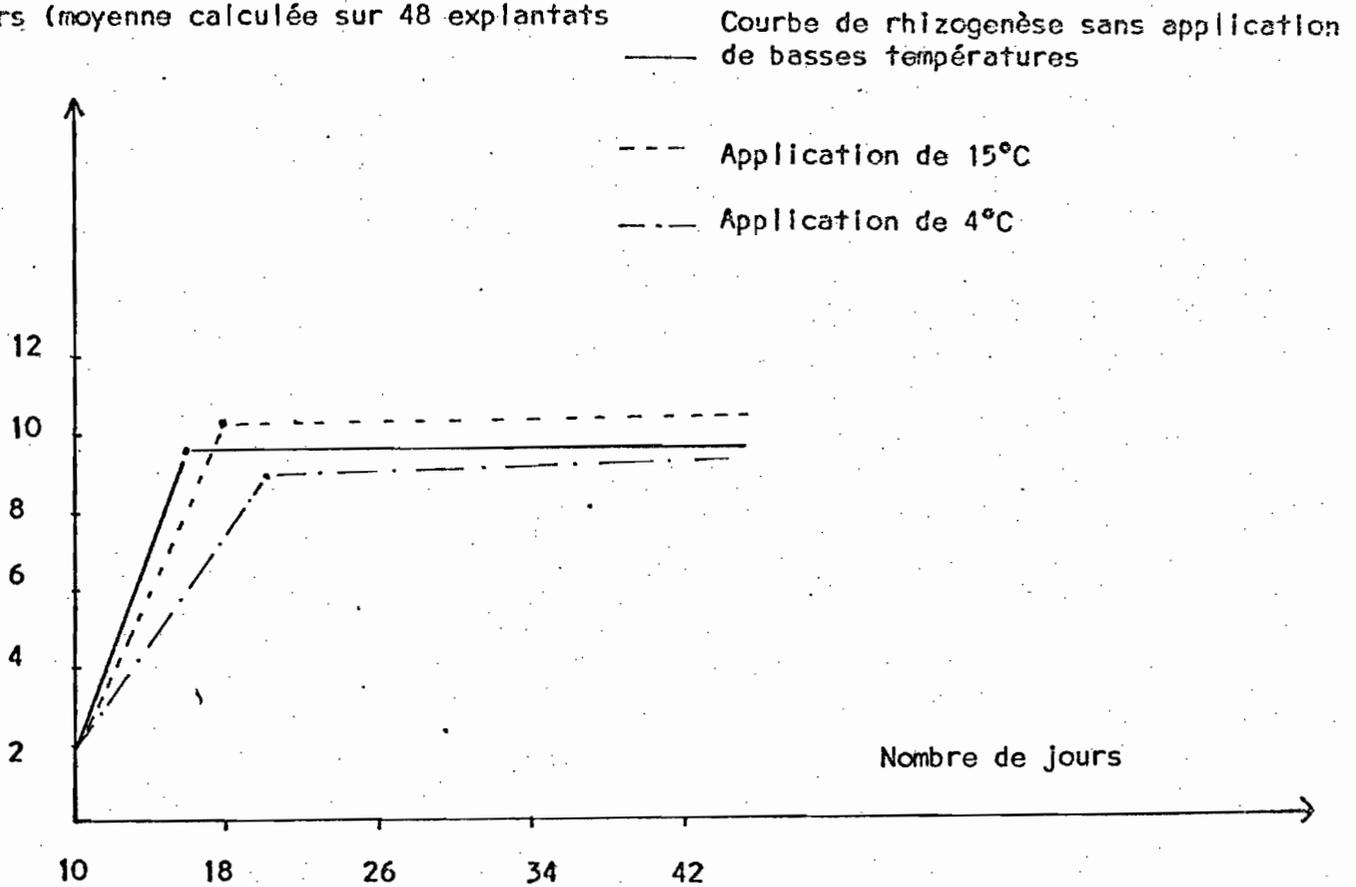


Figure 7 : Influence de la rhizogenèse des entrenoeuds de Manioc d'un traitement à 4°C ou à 15°C pendant 48 h, entre le 10ème et le 11ème jour de culture.

Lorsque les tissus sont soumis pendant 48 h aux températures basses au début de la culture (fig. 5), l'apparition des racines est retardée et après 45 jours de culture, le nombre des racines néoformées est réduit, très légèrement à 15°C, plus sensiblement à 4°C.

Lorsque les tissus sont soumis à ces mêmes températures après 10 jours de culture, le nombre moyen de racines produites en fin d'expérience par explantat n'est pas sensiblement modifié par un séjour à 4°C mais il augmente après un séjour à 15°C (figure 7).

c) Influence de la lumière :

Pour étudier l'influence de la lumière sur le développement des fragments d'entre-noeuds, nous les avons, soit placés à l'obscurité, ou en lumière continue, soit soumis à des éclairagements photopériodiques variables, 8h, 12 h, 16 h de lumière par jour.

Les résultats, résumés dans le Tableau VII montrent que l'allongement de la période journalière d'éclairagement favorise la prolifération des explantats mais défavorise la néoformation des racines qui apparaissent plus tardivement et en nombre moins important.

En résumé, les fragments d'entre-noeuds de Manioc ont absolument besoin de sucre et de facteurs auxiniques pour proliférer et produire des racines. La nature et la concentration du sucre ou du facteur phytohormonal, de même que les conditions physiques, influent sur ces phénomènes.

Conditions de l'expérience	Début de la rhizogenèse	Nbre moyen de racines/expl. en fin de culture	Début de la nécrose	Poids frais moyen de cal/explantat obtenu après 45 j. sur un milieu contenant $10^{-6}$ g/ml d'A N A (en g)
Obscurité	7e j. après l'ensemencem.	9,3	21e j.	1,100
8 h de lumière	7e	9,1	24e j.	1,200
12 h de lumière	10e	9,5	30e j.	1,560
16 h de lumière	14e	7,1	28e j.	1,320
lumière continue	15e	6,8	32e j.	1,612

TABLEAU VII : Influence de la durée journalière d'éclairement sur la rhizogenèse et la callogenèse des fragments d'entre-noeuds de Manioc.

## B - CULTURE DES NOEUDS :

Les fragments d'entre-noeuds s'étant révélés incapables de néoformer des bourgeons, il nous a paru intéressant de cultiver les noeuds. Ceux-ci, pourvus de bourgeons axillaires, peuvent produire des tiges plus ou moins développées.

La culture des noeuds revient en quelque sorte à réaliser le bouturage in vitro de fragments de tige. Sur ce matériel, nous avons étudié le rôle des facteurs trophiques et phytohormonaux, celui de la température et de la lumière, puis nous avons tenté de voir si le développement de la partie aérienne pouvait avoir une influence sur la rhizogenèse des explantats.

### 1°) Action des sucres

#### a) Mise en évidence du rôle du sucre :

Les noeuds ont été cultivés sur un milieu renfermant les sels minéraux de la solution de Heller.

Si ce milieu est privé de sucre, le bourgeon axillaire se développe lentement et les premières racines n'apparaissent que le 30ème jour.

La croissance des bourgeons et l'organogenèse sont plus importantes en présence de sucre.

Le sucre n'est donc pas indispensable à la formation des racines par les noeuds de Manioc, mais il exalte le phénomène. C'est le bourgeon axillaire qui induit la rhizogenèse. On peut expliquer ce fait comme une conséquence du développement des bourgeons : les produits élaborés et les phytohormones présentes au niveau du bourgeon, interviendraient et permettraient l'organogenèse.

#### b) Influence de la nature du sucre et de sa concentration

Les faibles concentrations de sucre (1 %, 2 %) accroissent considérablement le développement des noeuds par rapport au témoin sur milieu sans sucre.

Le glucose à 3 % est favorable à la rhizogenèse (9 racines en moyenne par explantat au bout de 3 semaines) mais il est inhibiteur à partir de 5 % (Tableau VIII).

Le saccharose est nettement plus efficace et sa dose optimale est de 3 % ; il accélère la croissance du bourgeon et la rhizogenèse (Tableau IX)

Résultats Glucose en %	Taille moyenne des explantats au bout de 21 jours (en cm)	Début de Rhizogenèse	Nombre moyen de racines par explantat au bout de 21 jours	Longueur moyenne des racines au bout de 21 jours (en cm)	Nombre moyen de feuilles par explantat au bout de 21 jours
0	0,7	30e jour	0 (1,1 au bout de 45 jours)	0,5	1,10
1	0,9	17e	2,3	0,5	1,10
2	2,15	15e	4,2	0,7	1,88
3	2,10	12e	9	1,5	1,92
4	2,05	18e	5	1,0	1,90
5	Les bourgeons se renflent et croissent à peine				
6					

TABLEAU VIII : Influence de différentes concentrations de glucose sur la croissance des noeuds de Manioc  
 \*\*\*\*\*  
 ensemencés sur un milieu contenant les éléments minéraux de la solution de Heller.

Résultats Saccharose en %	Taille moyenne des explantats au bout de 21 jours (en cm)	Début de Rhizogenèse	Nombre moyen de racines par explantat au bout de 21 jours	Longueur moyenne des racines au bout de 21 jours (en cm)	Nombre moyen de feuilles par explantat au bout de 21 jours
1	1	14e Jour	3,0	0,8	1,40
2	2,10	14e	5,3	1,2	1,55
3	2,55	9e	12,0	2,1	2,87
4	2,40	9e	10,0	1,9	2,90
5	2,30	17e	2,6	0,9	1,48
6	0,9	17e	1,2	0,5	1,0
8	Les bourgeons se renflent et croissent à peine.				

TABEAU IX : Influence de différentes concentrations de saccharose sur la croissance des noeuds de Manioc  
ensemencés sur un milieu contenant les éléments minéraux de la solution de Heller.

## 2°) Action des substances de croissance :

Le développement des bourgeons et des racines au niveau des noeuds n'exige pas la présence de facteurs de croissance dans le milieu. Pour vérifier si ces facteurs peuvent le modifier, nous avons cultivé les noeuds sur le milieu habituel additionné de différentes doses de vitamine B, d'acide gibbérellique, de kinétine ou d'A I A (figure 8).

La vitamine B<sub>1</sub>, à 10<sup>-8</sup> ou 10<sup>-7</sup> g/ml, n'a modifié ni la date d'apparition des racines, ni l'intensité de la rhizogenèse. A 10<sup>-6</sup> g/ml, elle réduit légèrement le nombre moyen de racines par explantat.

L'acide gibbérellique aux faibles doses (10<sup>-8</sup> et 10<sup>-7</sup> g/ml) favorise la croissance du bourgeon, hâte l'apparition des racines alors qu'à 10<sup>-6</sup> g/ml, il inhibe fortement la croissance des bourgeons.

Utilisée seule, la kinétine retarde le début de la rhizogenèse (35ème jour au lieu du 9ème jour pour le témoin) et diminue le nombre total de racines., en particulier lorsqu'elle est employée à forte dose (10<sup>-6</sup> g/ml).

Les doses 10<sup>-7</sup> et 10<sup>-6</sup> g/ml d'A I A inhibent la croissance et la rhizogenèse. Lorsqu'on associe l'A I A à différentes concentrations de kinétine, contrairement à ce qui a été observé dans les autres cas, il y a prolifération cellulaire à la base des explantats ; en présence de 10<sup>-6</sup> g/ml de kinétine et de 10<sup>-7</sup> g/ml d'A I A, l'inhibition de la production de racines apparaît moins importante que lorsque les deux phytohormones sont utilisées séparément aux mêmes doses. Ceci est peut-être le résultat de l'influence de la kinétine sur la partie aérienne de la plante.

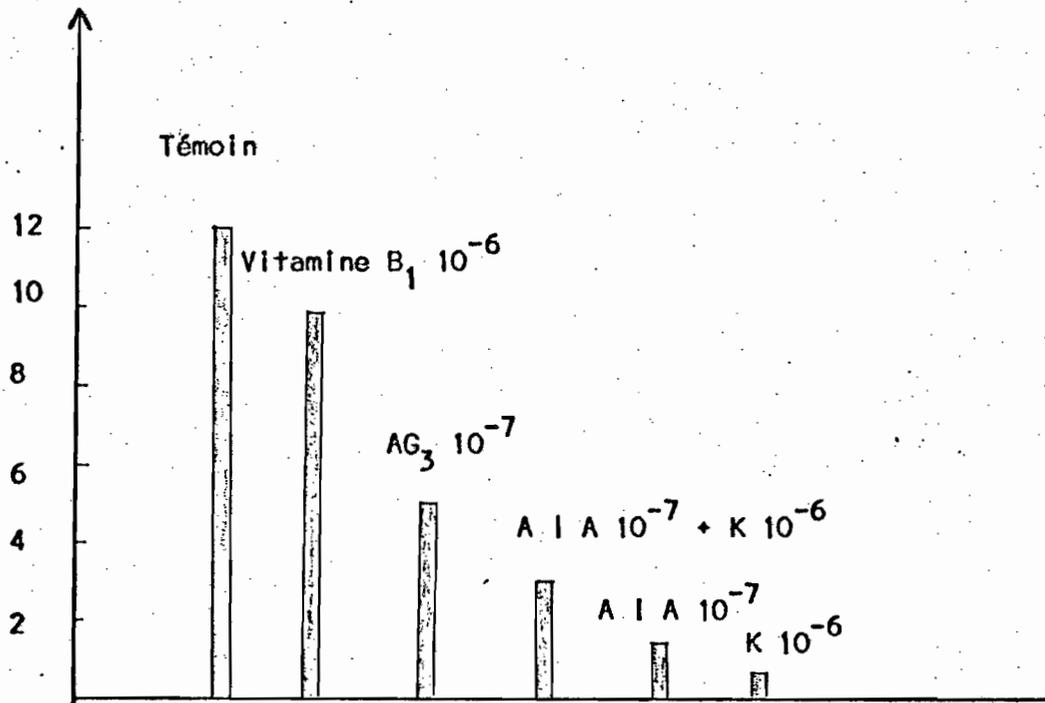
Ces différentes expériences ont en particulier confirmé que la kinétine a une action inhibitrice sur la rhizogenèse. Les facteurs de croissance étudiés ont modifié le développement des bourgeons et des racines.

## 3°) Action des facteurs climatiques

Comme pour les entrenoeuds, la température la plus favorable au développement des noeuds est de 30°C, mais elle exalte la croissance des tiges qui atteignent très rapidement les cotons obturant les tubes (Tableaux X et XI).

L'étude de l'influence de la lumière sur la croissance des noeuds a donné des résultats très classiques : à l'obscurité ou en jours courts, les plantes s'étioilent.

Nbre moyen de racines par explantat  
après 21 jours de culture à 30°C  
(moyenne calculée sur 48 explantats)



**Figure 8** : Influence de différentes substances de croissance sur la rhizogenèse de noeuds de Manioc.

T°	Nombre de jours après l'ensemencement	Longueur de la partie aérienne en cm	Nombre moyen de racines par explantat	Nombre moyen de feuilles par explantat
25°C	11	1	0	1,1
	15	1,6	2	1,5
	21	2,5	2,7	1,8
	30	2,9	3,2	2,5
30°C	11	1,5	4	1,7
	15	2,2	6	3,4
	21	2,5	12	2,9
	30	4	12	5,1

TABEAU X : Influence de la température sur le développement des bourgeons axillaires de noeuds de Manioc  
 \*\*\*\*\*  
 ensemencés sur un milieu contenant les éléments minéraux de la solution de Heller + 3 % de saccharose

T	Nombre de jours après l'ensemencement	Longueur de la partie aérienne en cm	Nombre moyen de racines par explantat	Nombre moyen de feuilles par explantat
25°C	11	1,10	0	1,20
	15	1,52	1,10	1,93
	21	2,0	2,1	2,0
	30	2,3	2,3	2,4
30°C	11	2,02	2	2,7
	15	4,2	6	5,6
	21	7,0	10	7,17
	30	9,5	10	6,8

TABLEAU XI : Influence de la température sur le développement des bourgeons axillaires de noeuds de Manioc ensemencés sur un milieu contenant les éléments minéraux de la solution de Murashige et Skoog + 3 % de saccharose

#### 4°) Influence de la partie aérienne de la tige sur la rhizogenèse

Les résultats précédents (Tabl. VIII, IX), suggèrent l'existence d'une relation entre la partie aérienne de la plante régénérée par les noeuds et les racines néoformées. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé des cultures à 25° C et 30° C, aussi bien sur le milieu habituel que sur un milieu contenant les éléments minéraux de Murashige et Skoog et 3 % de saccharose. Pour chaque type de milieu, il y a donc une seule variable, la température, qui, comme cela a été démontré précédemment, influe sur la croissance du bourgeon.

Quel que soit le milieu utilisé, (Tableaux X et XI), le nombre moyen de racines par explantat augmente avec la longueur de la tige et le nombre de feuilles portées par cette tige. Toutefois, à partir d'une certaine taille, qui est fonction du milieu, ce nombre atteint un maximum et ne croît plus, même si le développement du bourgeon se poursuit.

Dans une seconde série d'expériences, les facteurs physiques ont été maintenus constants (25° C, 12/12) ; seule la composition du milieu habituel varie par la présence de phytohormones (acide gibbérellique ou acide indolyl-acétique. Nous avons vu qu'aux faibles doses ( $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  g/ml), l'AG<sub>3</sub> favorise la croissance du bourgeon tandis que l'A I A l'inhibe. La comparaison du nombre moyen de racines obtenues dans ces deux cas, confirme que la partie aérienne de la tige influe sur la formation des racines (Tableau XII).

On peut donc interpréter les différents résultats obtenus en présence des substances de croissance : les phytohormones, qui inhibent le développement du bourgeon telles que l'A I A par exemple, retardent la formation des racines.

En conclusion, il a été établi que le bourgeon axillaire induit la rhizogenèse des noeuds de Manioc et que le sucre joue un rôle favorable, dans la reprise d'activité des bourgeons. La partie aérienne de la tige influe sur la formation des racines. Le retard du début de rhizogenèse et la réduction du nombre moyen de racines par explantat doivent être vraisemblablement liés à une modification entre les substances présentes dans la plante et dans

Substance de croissance	Nombre de jours après l'ensemencement	Longueur de la partie aérienne en cm	Nombre moyen de racines par explantat	Nombre moyen de feuilles par explantat
$10^{-7}$ g/ml d'AG <sub>3</sub>	11	1,5	1,2	1,10
	15	2,0	2,4	2
	21	3,0	3,5	2,3
	30	3,1	4,0	2,8
$10^{-7}$ g/ml d'A I A	11	1,0	0	1,1
	15	1,0	0	1,1
	21	1,5	1,3	1,3
	30	1,5	1,3	1,3

TABLEAU XII : Action de l'AG<sub>3</sub> et de l'A I A sur le développement des bourgeons de Manioc  
 \*\*\*\*\*  
 cultivé sur un milieu contenant les éléments minéraux de la solution de Heller  
 + 3 % de saccharose.

le milieu, modification qui agirait sur la croissance de la partie aérienne et secondairement sur la rhizogenèse elle-même.

## II ESSAIS DE TUBERISATION "IN VITRO"

=====

Les expériences décrites précédemment ont permis d'établir les modalités de la formation des racines par des fragments de tige (noeuds ou entrenoeuds) de Manioc. Dans les conditions normales, les racines du Manioc sont susceptibles de tubériser. Nous pouvons nous demander s'il serait possible de reproduire ce phénomène in vitro et d'en établir le déterminisme. Afin de mieux justifier nos méthodes expérimentales, il convient de rappeler brièvement les théories proposées pour expliquer le mécanisme physiologique de la tubérisation.

### A - CONCEPTIONS ANCIENNES ET ACTUELLES DU MECANISME PHYSIOLOGIQUE DE LA TUBERISATION

Chez de nombreuses plantes, la tubérisation peut affecter des organes très divers : tiges, feuilles, racines qui acquièrent l'aptitude à tubériser au cours d'une phase dite d'induction. La phase d'initiation des tubercules est généralement considérée comme le résultat de deux processus : un arrêt d'élongation de l'organe suivi d'une stimulation de la croissance en épaisseur.

#### 1°) Théorie symbiotique et théorie osmotique :

Noël Bernard (1900), à la suite de ses recherches sur la symbiose entre les végétaux supérieurs et les bactéries ou les champignons, émit l'idée que la tubérisation résulte de l'infection d'une plante par un champignon. Cette hypothèse a cependant été abandonnée quand on a pu réaliser la tubérisation dans des conditions aseptiques. Magrou (1939), a alors imaginé que la tubérisation des stolons était due à une forte concentration de substances nutritives à leur extrémité, cette concentration augmentant considérablement la pression osmotique.

Werner (1935, 1940), quant à lui, propose que les facteurs du milieu favorables à la tubérisation augmentent le rapport  $\frac{C}{N}$ . Sa théorie met l'accent sur le rôle des facteurs externes dans la tubérisation.

### 2°) Rôle des facteurs climatiques dans la tubérisation :

Garner et Allard (1923) ont souligné l'importance de la photopériode dans la tubérisation. Les jours courts sont parfois favorables (Pomme de Terre, Dahlia...). Quelques espèces exigent des jours longs (Oignons, Echalote, All...) tandis que d'autres enfin paraissent indifférentes à la longueur du jour (Igname...). Certains auteurs constatent le rôle de la température et pensent que c'est l'association d'une température adéquate à une photopériode donnée qui jouerait le rôle essentiel. Ainsi, par exemple, les jours courts et les nuits fraîches sont des conditions optimales à une bonne induction de la tubérisation chez la Pomme de Terre.

### 3°) Théorie hormonale :

Zimmermann et Hitchcock (1936) ont avancé l'hypothèse que chez le Topinambour, des substances de nature hormonale, synthétisées par le sommet de la plante et véhiculées jusqu'aux racines sont responsables de la tubérisation. Plus récemment, Grégory (1956) montre que chez la Pomme de Terre (variété Kennebec), la tubérisation est due à un stimulus synthétisé ou activé dans des conditions précises de lumière et de température, puis transporté à l'extrémité du stolon ; il démontre par des expériences de greffage entre boutures induites et non induites, que ce stimulus est transmissible.

Il faut toutefois noter que si l'existence d'un stimulus capable d'induire la tubérisation semble être prouvée, sa nature n'est pas encore élucidée.

De ces différentes conceptions et de l'ensemble des travaux effectués jusqu'à ce jour sur le sujet et en particulier par Courduroux (1966), Gregory (1956), Madec (1961), Perrenec (1962), Tizio (1964), on peut retenir les points suivants :

-les facteurs climatiques jouent un rôle non négligeable dans la tubérisation.

- le déroulement du mécanisme met en évidence deux processus : une inhibition de la croissance axiale et une stimulation de la croissance en épaisseur. La plupart des auteurs estiment que le ralentissement de la croissance précède la tubérisation et serait indispensable à son déclenchement.

B - EXPERIENCES D'INDUCTION DE LA TUBERISATION "IN VITRO"

Nous avons recherché les facteurs capables d'inhiber in vitro la croissance du Manioc et d'induire éventuellement la tubérisation de ses racines. Pour cela, les entrenoeuds et les noeuds pourvus de racines néoformées ont été, soit soumis à des conditions physiques différentes, soit transférés dans un milieu contenant des retardateurs de croissance. L'évolution des racines a été appréciée par une étude morphologique et histologique.

Les températures froides (4°C, 10°C) ou les fortes doses d'auxines (10<sup>-6</sup>g/ml) ont ralenti le développement des racines des fragments d'entrenoeuds, mais, quelles que soient les conditions de l'expérience, ces racines n'ont subi aucune modification, ni dans leur morphologie, ni dans leur structure.

Dans la nature, une phase végétative de 4 à 5 mois, au cours de laquelle le Manioc synthétise ses réserves, précède la tubérisation ; on peut penser que la partie aérienne de la plante joue un rôle dans l'induction de la tubérisation. Après 3 semaines de culture sur le milieu habituel, à 30°C et en photopériode de 12/12, photopériode qui d'après Bolhuis (1966) est la plus favorable à la tubérisation du Manioc, les explantats sont divisés en 2 lots (figure 9) : le lot A est placé directement dans différentes conditions climatiques, les plantes du lot B sont transférées sur un milieu semi-liquide ou liquide, ou sur de la vermiculite. Dans ce dernier cas, les plantes sont arrosées avec une solution de composition identique à celle du milieu semi-liquide ou liquide ; de plus, pour obtenir un développement normal de la plante, il est indispensable de lui assurer une humidité convenable. La

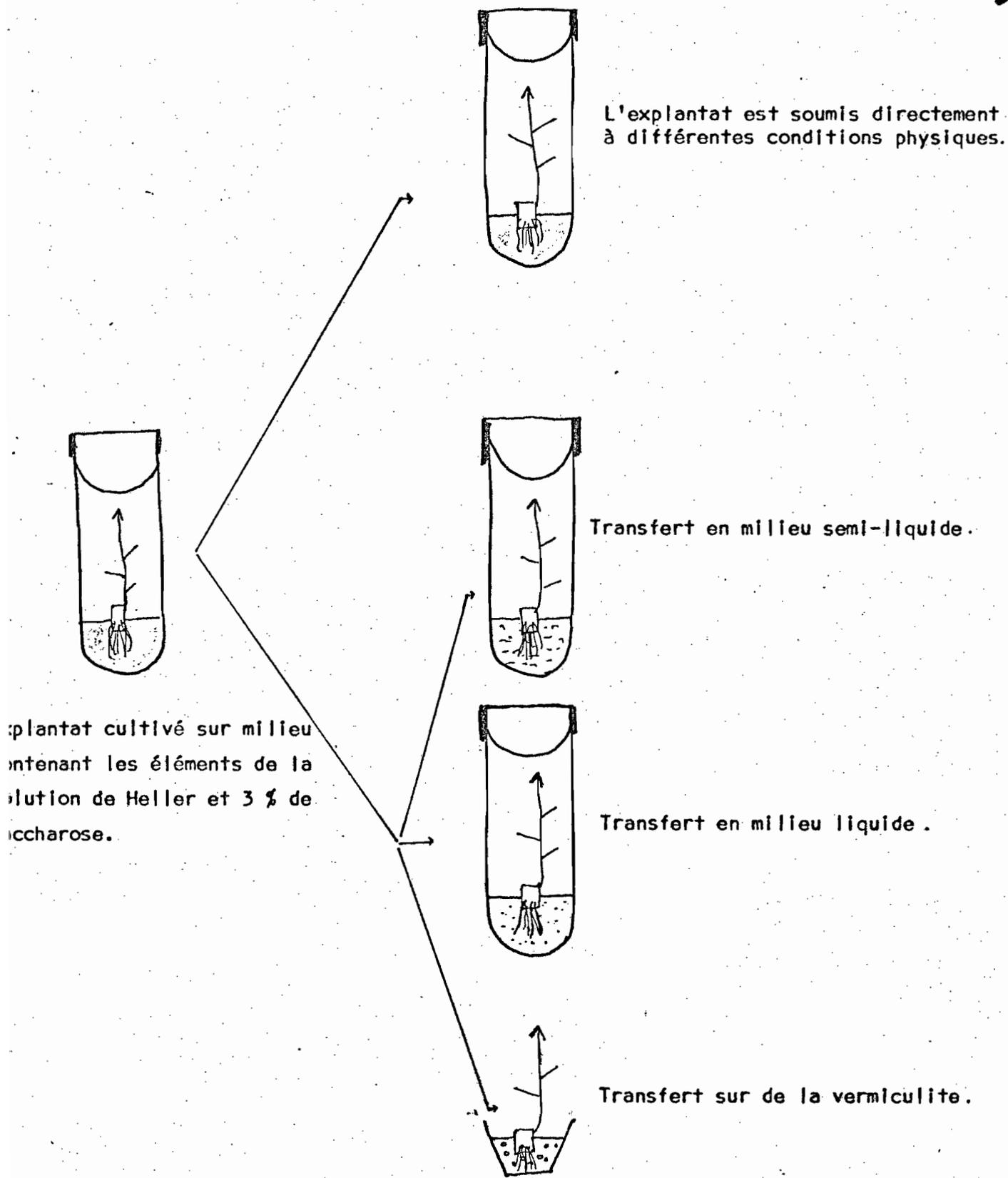


Figure 9 : Protocole expérimental.

vermiculite offre l'avantage de permettre régulièrement l'examen des racines et la remise en place de la plante sans endommager celles-ci. Chaque condition expérimentale est représentée par 24 échantillons.

1°) Inhibition due aux conditions climatiques :

a) Inhibition photopériodique :

Nous avons opéré à différentes températures et à chaque température les lots A et B sont soumis aux éclairagements suivants : 24 h, 16 h, 12 h, 8 h, obscurité. Il ressort de ces expériences que d'une façon générale, les basses températures ralentissent la croissance des explantats et que l'éclairage journalier ne permet pas, dans les conditions où nos essais ont été réalisés, d'induire la tubérisation (tableau XIII).

b) Inhibition thermopériodique :

Les explantats ont été cultivés à des températures variables entre le jour (25°C) et la nuit 10°C.

La température froide nocturne ralentit la croissance de la tige et de la racine mais ne provoque pas l'accroissement en épaisseur de cette dernière.

La température et la lumière convenablement associées ont pu réduire le développement axial des plantes mais la plupart du temps cela a entraîné leur mort précoce.

2°) Inhibition due à l'action des substances inhibitrices de croissance

Les explantats sont transférés aseptiquement sur des milieux contenant des inhibiteurs ; ils sont ensuite placés dans différentes conditions physiques.

a) Inhibition osmotique :

Le développement végétatif du Manioc précédant de plusieurs mois la tubérisation, on peut imaginer que les sucres jouent un rôle dans le mécanisme de la tubérisation.

Les fortes concentrations de glucose ou de saccharose (8, 10, 12 %) utilisées afin d'augmenter la pression osmotique du milieu et perturber ainsi la croissance des plantes, n'induisent pas la tubérisation ; elles accélèrent la nécrose des tissus, provoquent tout au plus un renflement inhabituel des

Conditions climatiques		Allongement moyen de la partie aérienne de la tige au bout de 15 jours (en mm)	Nbre moyen de nouvelles racines formées 30 jours après le transfert	Allongement moyen des racines au bout de 30 jours (en mm)	Diamètre moyen des racines (en mm)		Durée moyenne de survie des explantats
Température	Durée journal. d'éclair.				Partie médiane	Extrémité	
10° C	Obscurité 8 <sup>h</sup> /24	0	0	0	0,5	} 0,6	4 sem.
	12 <sup>h</sup> /24 16 <sup>h</sup> /24 24 <sup>h</sup>						} 0,8
15° C	Obscurité 8 <sup>h</sup> /24	} 5	0	0	0,5	} 0,6	6 sem.
	12 <sup>h</sup> /24 16 <sup>h</sup> /24 24 <sup>h</sup>						
25° C	Obscurité 8 <sup>h</sup> /24	} 30	1,5	28	0,4	0,4	La croissance se poursuit jusqu'à ce que l'apex de la tige touche le coton
	12 <sup>h</sup> /24 16 <sup>h</sup> /24 24 <sup>h</sup>						
30° C	Obscurité 8 <sup>h</sup> /24	} 35	1	5	0,4	0,4	
	12 <sup>h</sup> /24 16 <sup>h</sup> /24 24 <sup>h</sup>						

TABLEAU XIII : Influence de la durée journalière d'éclaircissement sur le développement de la tige et des racines formées sur des noeuds de Manioc cultivés à 30° 12 /12 pendant 3 semaines et transférés à 10°C, 15°C, 25°C.

bourgeons apicaux.

b) Inhibition par des retardateurs de croissance :

L'hydrazide maléique, l'A M O 16-18 et le C C C ont été incorporés au milieu de base à des doses allant de  $10^{-8}$  à  $10^{-6}$  g/ml. Dans ces conditions, le diamètre des racines varie peu, mais ces retardateurs de croissance hâtent la fanaison des feuilles et entraînent la mort des plantes.

c) Inhibition auxinique :

Selon certains auteurs , les auxines ne joueraient pas un rôle important dans l'induction de la tubérisation. Tizio (1964) montre qu'elles interviennent chez la Pomme de Terre en agissant sur les racines. Devant les échecs obtenus avec les autres substances, il semblait intéressant de vérifier si ces hormones peuvent intervenir dans le mécanisme de la tubérisation du Manioc.

L'A I A, utilisé seul, entraîne une mort rapide des plantes. Nous l'avons donc associé à la kinétine : en présence de  $10^{-7}$  g/ml d'A I A et de  $10^{-6}$  g/ml de kinétine, les explantats, placés à température constante (15°C) et en photopériode 12/12 survivent 4 mois 1/2, résultat jamais obtenu dans les cas envisagés précédemment. Il y a lieu de distinguer les explantats cultivés in vitro et ceux transférés sur de la vermiculite.

In vitro, après le transfert, la croissance axiale de la tige se poursuit très lentement : 5 mm environ en 2 mois au lieu d'une moyenne de 4 cm chez les témoins non transférés dans un autre milieu et placés dans des conditions identiques. Le nombre moyen de racines par plante varie peu mais sur une même plante, certaines racines augmentent considérablement de diamètre (1,7 mm environ après 4 mois de culture) tandis que d'autres ne subissent aucun changement important (0,5 mm de diamètre moyen après la même période de culture). Ce phénomène est observé tant en milieu semi-liquide qu'en milieu liquide ; cependant, dans le premier cas (figure 10), les racines "renflées" sont trapues ; dans l'autre (figure 11) elles sont allongées et ramifiées.



Figure 10 : explantat transféré en milieu semi-liquide contenant les éléments minéraux de la solution de Heller +  $10^{-6}$  g/ml de kinétine et  $10^{-7}$  g/ml d'A I A et présentant, après 3 mois de culture, des racines "renflées" (r),

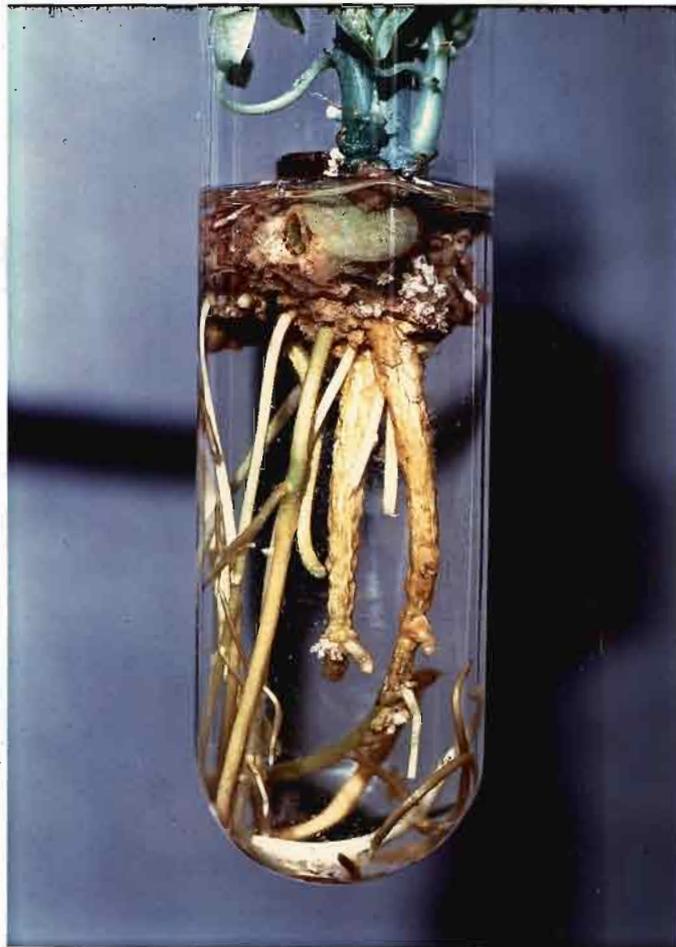


Figure 11 : Explantat transféré en milieu liquide contenant les éléments minéraux de la solution de Heller +  $10^{-6}$  g/ml de kinétine et  $10^{-7}$  g/ml d'A I A et présentant, après 3 mois de culture, des racines "renflées"(x).



Figure 12 : Explantat transplanté sur de la vermiculite et arrosé quotidiennement par une solution contenant les éléments minéraux de la solution de Heller +  $10^{-6}$  g/ml de kinétine et  $10^{-7}$  g/ml d'A I A et présentant, après 3 mois de culture, des racines "renflées"(x).

La croissance des plantes cultivées à 25°C et en photopériode 12/12 sur de la vermiculite et arrosées régulièrement par une solution contenant  $10^{-7}$ g/ml d'A I A et  $10^{-6}$ g/ml de kinétine, s'accélère au début du transfert ; le nombre moyen de feuilles et de racines par explantat est nettement plus élevé que précédemment. Les racines sont plus longues et certaines d'entre elles se renflent sur toute leur longueur après 4 mois de culture (figure 12) (Tableau XV).

Afin de savoir si le renflement des racines observé en présence de  $10^{-7}$ g/ml d'A I A et  $10^{-6}$ g/ml de kinétine correspond à un début de tubérisation ou résultait simplement de l'action tératogène des facteurs de croissance, nous avons eu recours à des observations histologiques.

Les coupes des racines témoins (Planches I et II) montrent une structure primaire typique comprenant un épiderme, un parenchyme cortical formé de grandes cellules occupant la plus grande partie de l'écorce, un endoderme, un péricycle, 5 faisceaux libéro-ligneux alternés.

La structure des racines "renflées" obtenues en tube sur milieu semi-liquide (Planche III) ne présente pas de formations secondaires malgré l'âge de l'explantat (4 mois 1/2). Toutefois, le parenchyme cortical est plus développé ; il est constitué de cellules très grandes à parois minces, sans cristaux d'oxalate. Les cellules les plus internes du parenchyme sont moins grandes et la structure du cylindre central est normale.

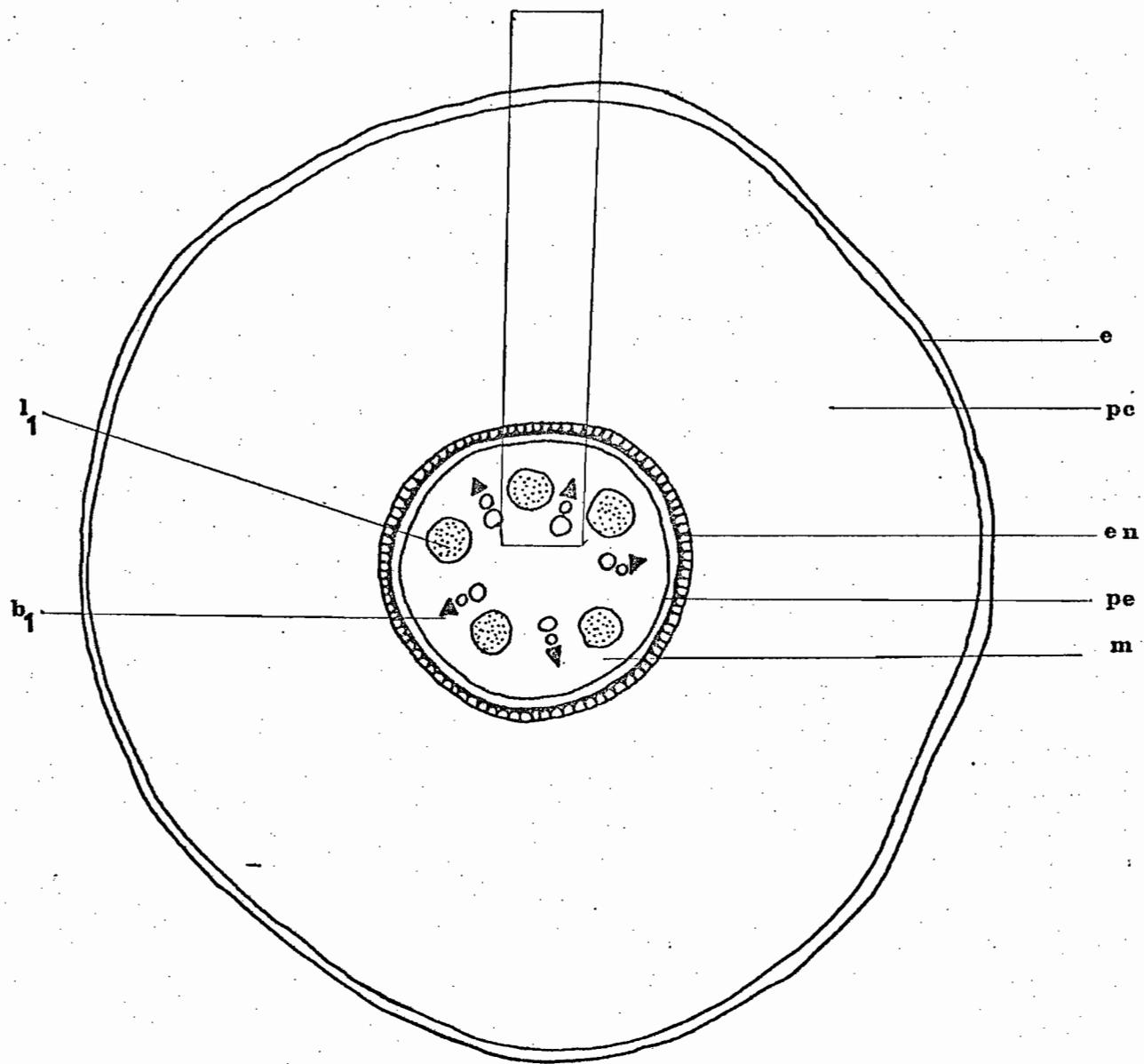
Cette structure, malgré la prolifération cellulaire du parenchyme ne correspond pas à celle d'un jeune tubercule car, la tubérisation du Manioc est due à des formations secondaires (parenchyme ligneux secondaire).

Nous pouvons donc conclure que le renflement obtenu dans ces cas est une conséquence de l'action de la kinétine et de l'A I A sur les tissus superficiels des racines.

La structure des racines "renflées" obtenues au bout de 4 mois 1/2 sur de la vermiculite est totalement différente : en effet, une coupe transversale de ces organes (Planches IV et V) montre des formations secondaires subéro-phellodermiques, un parenchyme amylofère, un phloème secondaire peu important, un parenchyme ligneux secondaire cellulosique, très riche en amidon.

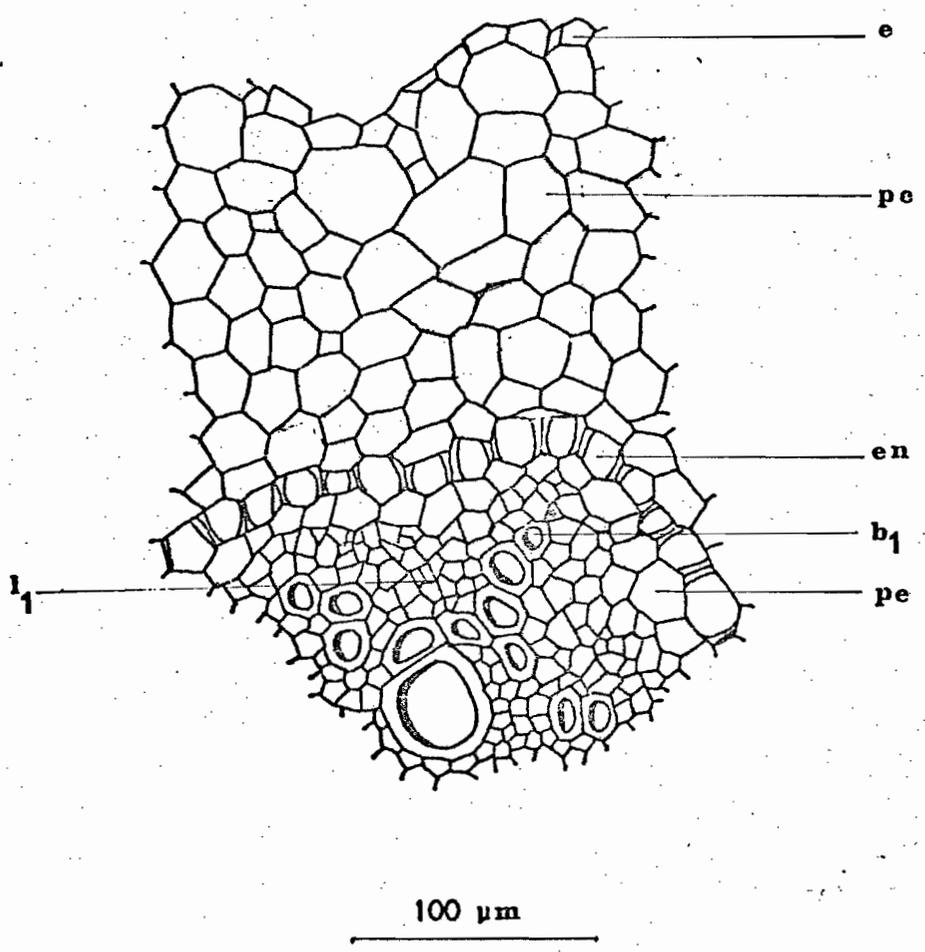
	MILIEU SEMI-LIQUIDE	MILIEU LIQUIDE	VERMICULITE
Croissance axiale	très ralentie	très ralentie	s'accélère au début mais se ralentit par la suite
Allongement moyen de la partie aérienne de la tige au bout de 4 mois (en mm)	24	18,7	68
Nombre moyen de feuilles dénombrées au 4ème mois	4,5	6	10,4
Nombre moyen de plantes présentant des racines "renflées" (moyenne sur 24 tubes ou pots de vermiculite)	10	8	14
Nombre moyen de racines "renflées" par plante au bout de 4 mois	2,3	1,9	3,2

TABLEAU XV : Action de  $10^{-7}$  g/ml d'A 1 A et de  $10^{-6}$  g/ml de kinétine sur le développement des racines  
 d'explantats transférés en milieu semi-liquide, liquide ou sur de la vermiculite et placés  
 à 25°C et en photopériode 12/12



**PLANCHE I** : Coupe transversale d'une racine témoin non "renflée", néoformée in vitro.

- en : endoderme
- pe : péricycle



**PLANCHE XII** : Coupe transversale d'une racine témoin non "renflée",  
néoformée in vitro.

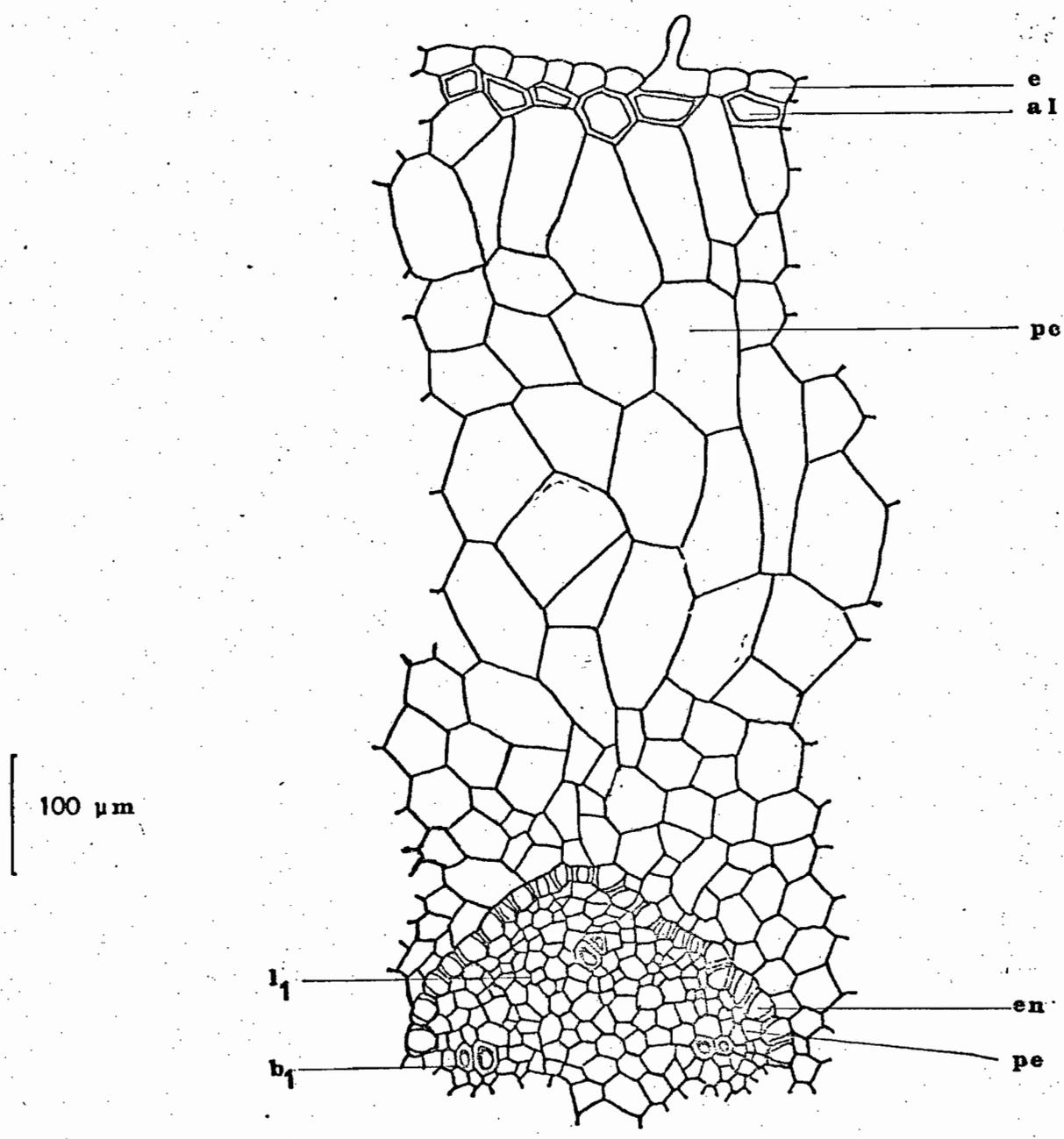
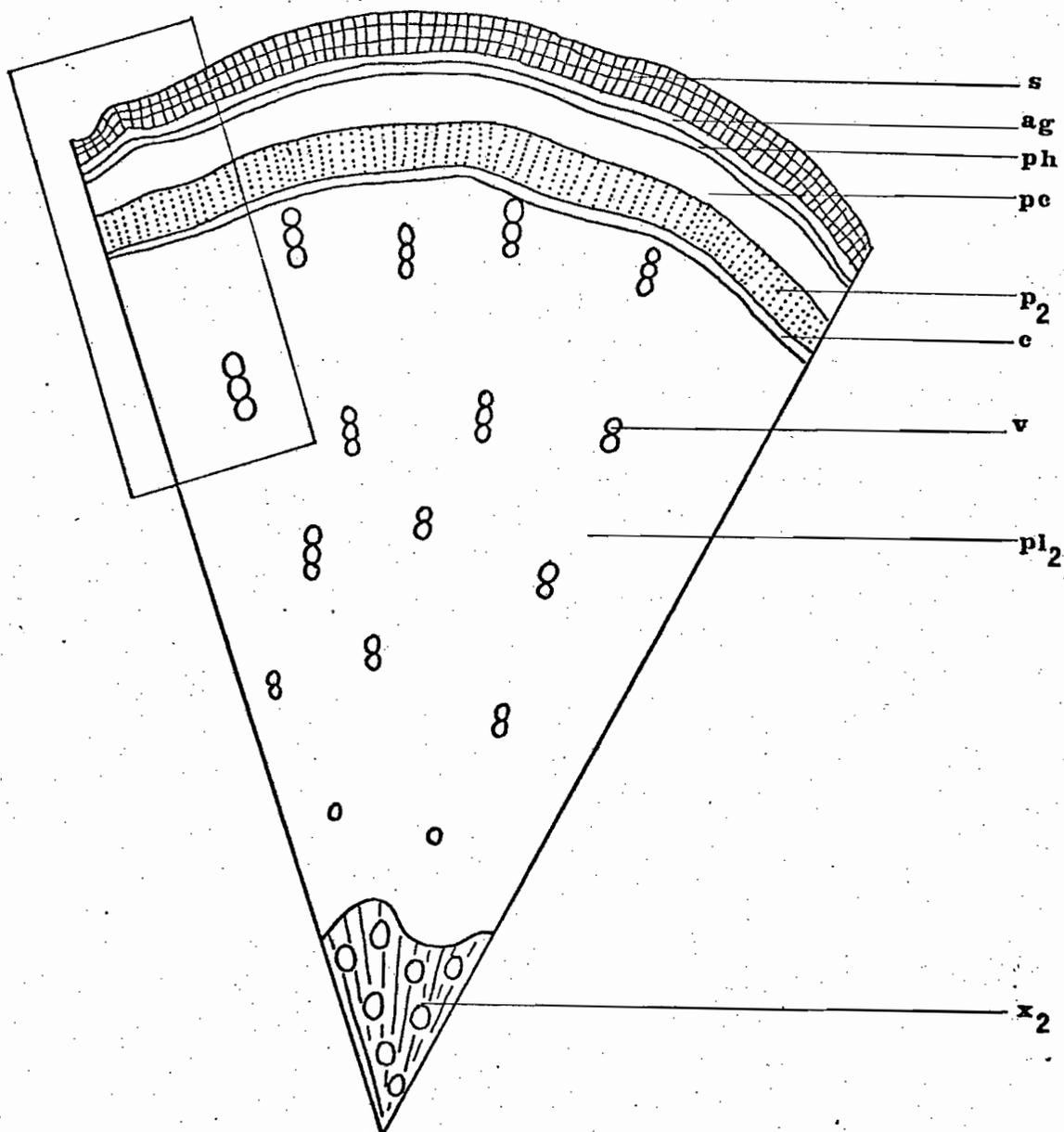


PLANCHE III : Coupe transversale d'une racine "renflée" en milieu liquide, semi-liquide.

al : assise de cellules dont les parois sont légèrement lignifiées.



**PLANCHE IV :** Coupe transversale de jeune tubercule de Manioc.

- ag : assise génératrice subéro-phellodermique
- ph : phelloderme
- v : vaisseaux entourés de cellules lignifiées
- pl<sub>2</sub> : parenchyme ligneux secondaire cellulosique
- c : cambium

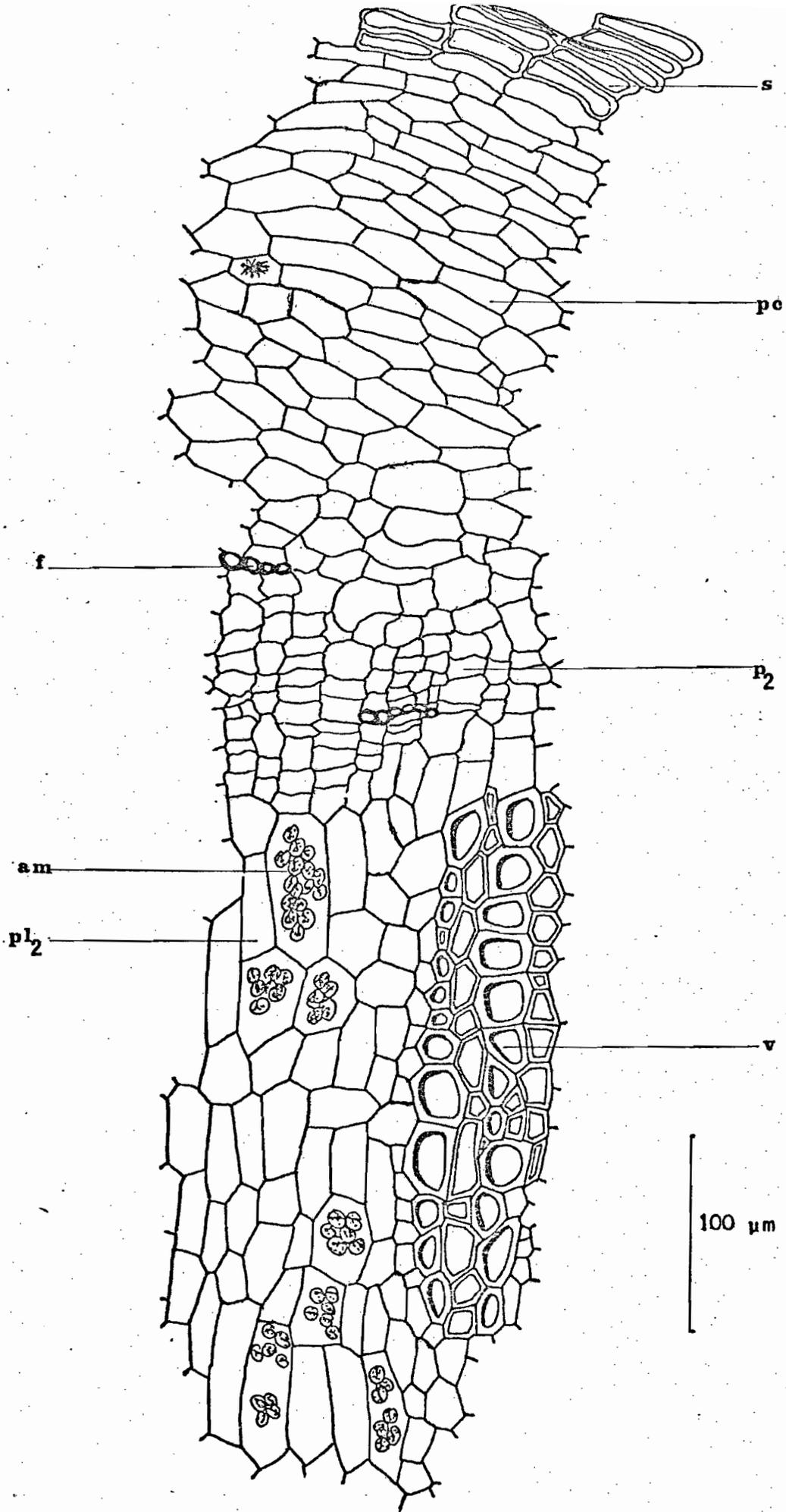


PLANCHE IV : Coupe transversale de jeune tubercule de Manioc.

f : fibre libérienne  
am : grain d'amidon

Le renflement des racines obtenu sur les plantes cultivées sur de la vermiculite correspond donc bien à un début de tubérisation.

## CONCLUSION

Notre but était d'étudier le comportement des tissus de Manioc cultivés In vitro et d'entreprendre des recherches préliminaires sur le mécanisme de la tubérisation de cette plante.

Nous avons montré que les fragments d'entre-nœuds ont un besoin absolu de sucre et de facteurs auxiniques pour produire des racines. Ce rôle du sucre et des auxines dans la rhizogenèse est connu chez de nombreuses plantes. Bouillenne et Went (1933) l'ont démontré pour les plantules de Balsamine, Went et Thimann (1937) pour les épicotyles de Pois, Spanjesberg et Gautheret (1963) pour les explantats de Topinambour. Stoltz et Hess (1966) l'ont confirmé par des expériences de ligatures de boutures. Ce procédé leur permettait d'arrêter un certain nombre de substances rhizogènes transportées par le phloème ; au niveau de la ligature, ils mirent en évidence des glucides et des auxines.

Les explantats de Manioc sont plus rhizogènes en présence de saccharose. Leroux (1971) a trouvé des résultats identiques pour les fragments de tige de Pois, mais, il faut signaler que l'influence de la nature du sucre dépend des espèces étudiées : en effet, avec les fragments de tubercules de Topinambour (Spanjersberg et Gautheret, 1963), le saccharose n'est pas le sucre le plus efficace.

La néoformation des racines sur les fragments d'entre-nœuds de Manioc est nettement polarisée, ce qui confirme le transport polarisé bien connu de l'auxine. L'A N A se révèle plus énergique que l'A I A.

La température optimale pour la prolifération cellulaire et la rhizogenèse du Manioc est de 30°C, mais, le potentiel rhizogène des explantats s'exprime mieux lorsque ceux-ci sont placés d'abord à 25°C pendant une semaine avant d'être transférés à 30°C. L'action de la température semble donc plus efficace après la mise en place des assises génératrices néoformées au sein des tissus. Ceci est en accord avec les travaux de Gautheret (1968) sur l'influence de la température sur la néoformation des racines de tissus de Topinambour.

Sucre et auxine sont donc des facteurs indispensables à la rhizogenèse des fragments d'entre-nœuds. Les conditions physiques n'interviennent que pour réduire ou exalter le phénomène.

Par contre, le développement des bourgeons et des racines au niveau des noeuds n'exige aucun facteur de croissance dans le milieu ; le bourgeon induit la néoformation des racines, ce qui est conforme aux notions classiques.

Le sucre favorise la reprise d'activité des bourgeons et hâte l'apparition des racines. Il a été établi également que la partie aérienne produite in vitro par le noeud, joue un rôle dans la rhizogenèse et que la température la plus efficace pour la croissance des explantats est de 30°C. Lorsqu'on introduit des substances phytohormonales dans le milieu de culture, celles-ci modifient la croissance de la tige, ce qui entraîne secondairement une influence sur la rhizogenèse.

Les résultats de nos observations qui ont porté sur la rhizogenèse des fragments d'entrenoeuds ou des noeuds de Manioc ont, dans leur ensemble, confirmé les conclusions de travaux réalisés sur d'autres matériels ; ils précisent néanmoins les conditions optimales de culture pour Manihot esculenta Crantz (variété 1151).

Ayant déterminé les modalités de la rhizogenèse, nous avons entrepris des expériences sur l'induction de la tubérisation des racines obtenues.

Les travaux consacrés au mécanisme physiologique de la tubérisation démontrent, en particulier, un antagonisme fondamental entre la croissance axiale de la plante et l'accroissement en épaisseur des organes susceptibles de tubériser. Nous avons donc recherché les facteurs capables d'inhiber in vitro le développement du Manioc. Des expériences de transfert étaient indispensables, puisqu'il fallait obtenir dans un premier temps les racines, puis ensuite essayer d'induire la tubérisation.

Les entrenoeuds pourvus de racines n'ayant donné aucun résultat, nous avons expérimenté avec des plantes entières obtenues in vitro à partir des noeuds.

Les différentes conditions photopériodiques ou thermopériodiques ou les inhibiteurs ont, parfois, réduit la croissance axiale des plantes mais ils n'ont dans ces cas, entraîné qu'un renflement de l'extrémité de la racine puis un dépérissement de la plante. Le fait que le Manioc est essentiellement une plante tropicale justifie l'action néfaste des basses températures.

Seule l'action combinée de l'A I A ( $10^{-7}$ ) et de la kinétine ( $10^{-6}$ g/ml) a provoqué un accroissement de taille important des racines tant en milieu semi-liquide, liquide que sur vermiculite. L'étude histologique de ces racines "renflées" et des racines témoins obtenues in vitro indique qu'en milieu semi-liquide et liquide, le renflement constaté provient plutôt de l'action tératogène des phytohormones et de l'action néfaste du milieu liquide. Les racines "renflées" obtenues sur vermiculite présentent par contre une structure typique de jeune tubercule.

Ces différents résultats préliminaires à l'étude de la tubérisation suggèrent plusieurs réflexions : Il importe de perfectionner les techniques afin de réduire ou de supprimer les traumatismes dus au transfert et les effets néfastes des milieux liquides. Le fait que les entrenoeuds pourvus de racines n'aient donné aucune racine "renflée" permet de penser que la partie aérienne joue un rôle important dans le phénomène de tubérisation.

# BIBLIOGRAPHIE

ADRIAENS (L.) - 1946.- Contribution à l'étude de la toxicité du Manioc au Congo Belge.  
Mém. Inst. r. colon. belge. Sect. Sci. nat. méd.- T. XIII, fasc. 4 ; 140 p.

BAILLON (M.H.) - 1958.- Etude générale du groupe des Euphorbiacées. Masson édit.

BERNARD (N.) - 1900.- Sur les tuberculisations précoces chez les végétaux.  
C.R. Acad. Sci. Paris, 131 : 626-629.

BERNARD (N.) - 1902.- Etudes sur la tubérisation.  
Rev. gén. Bot. 14 : 5-25.

BOHLUIS (G.) - 1966.- Influence of length of the illumination period on root formation in Cassava, Manihot utilissima Pohl.  
Netherland J. agric. sci., 14, n° 4 : 251-254.

BOUILLENNE (R.), WENT (F.) - 1933.- Recherches expérimentales sur la néoformation des racines dans les plantules et les boutures des plantes supérieures.  
Ann. Jard. Bot. Buitenzorg., 43 : 25-202.

BOUILLENNE (R.) - 1952.- Nature chimique des substances de croissance et rhizogénèse.  
C. R. IIIe Congr. Intern. Phytopharm., Paris : 699-704.

CAPO-CHICHI (E.A.) - 1974.- Culture in vitro des tissus de Manioc (Manihot esculenta Crantz).  
Thèse 3ème Cycle, Fac. Sc. Lille.

COURS (G.) 1951.- Le Manioc à Madagascar.  
Mémoire de l'Institut Scientifique de Madagascar, 3, série B : 203-400.

COURDUROUX (J.C.) - 1966.- Etude du mécanisme physiologique de la tubérisation chez le Topinambour (Helianthus tuberosus L.)  
Thèse Fac. Sci. Clermond-Ferrand.

- COURDURoux (J.C.) - 1966.- Tubérisation et biologie de la Ficaire  
(Ficaria ranunculoïdes Moench)  
Physiol. vég., 4 : 341-364.
- von CRANTZ (H.J.N.) - 1766.- Institutiones rei herbariae justa nutum maturae  
digestae exhibitu Viennae (cité par Rogers, 1965).
- FAVIER (J.C.), CHEVASSUS-AGNES (J.), GALLON (G.) - 1969.- Les amyliacées  
du Cameroun.  
Centre O.R.S.T.O.M. de Yaoundé Section Nutrition.
- GAUTHERET (R.J.) - 1959.- La culture des tissus végétaux.  
Masson édit.
- GAUTHERET (R.J.) - 1961.- Action de la lumière et de la température sur la  
néoformation de racines par des tissus de Topinambour cultivés  
in vitro.  
C. R. Acad. Sci. Paris, 252 : 2791-2796.
- GAUTHERET (R.J.) - 1961.- Action de la température et de la lumière sur le  
développement de tissus cultivés in vitro, particulièrement de  
fragments de rhizome de Topinambour.  
86ème Congr. Soc. Sav., 509-525.
- GAUTHERET (R.J.) - 1961.- Nouvelles recherches sur la néoformation de racines  
par des tissus de Topinambour cultivés in vitro.  
C. R. Acad. Sci. Paris, 253 : 1514-1516.
- GAUTHERET (R.J.) - 1966.- Recherches sur la rhizogenèse des tissus de  
Topinambour cultivés in vitro.  
Congr. Intern. Liège "Les Phytohormones et l'organogenèse" : 83-94.
- GAUTHERET (R.J.) - 1966.- Action des basses températures sur les phénomènes  
de rhizogenèse manifestés par les tissus de Topinambour cultivés  
in vitro.  
C. R. Acad. Sci. Paris, 262 : 2153-2155.
- GAUTHERET (R.J.) - 1967.- Température et Rhizogenèse des tissus de rhizomes  
de Topinambour cultivés in vitro.  
Coll. Intern. C.N.R.S., Strasbourg : 15-32.

- 57
- GAUTHERET (R.J.) - 1968.- Température et rhizogénèse des tissus de Topinambour cultivés in vitro.  
C.R. Acad. Sci. Paris, 266 : 770-775.
- GAUTHERET (R.J.) - 1969.- Action du froid sur la néoformation de racines par les tissus de Topinambour cultivés in vitro.  
C. R. Acad. Sci. Paris, 268 : 2899-2903.
- GREGORY (L.E.) - 1956.- Some factors for tuberization in the potato plant.  
Amer. J. Bot. 43 : 281-288.
- GREGORY (L.E.) - 1965.- Physiology of tuberization in plants (tubers and tuberous roots).  
Hands. Pflanzenphysiol. XV/1 : 1328-1354.
- HELLER (R.) - 1953.- Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés in vitro.  
Thèse, Paris, 223 p. et Ann. Sc. Nat. Bot. Biol. vég., 14 : 1-223.
- HENAIN (A.E.), CENOZ (H.M.) - 1971.- La mandioca (Manihot esculenta Crantz)  
Facultad de Agronomía y veterinaria, Corrientes Republica argentina  
n° 12.
- HERMANN (L.S.E.) - 1968.- Bibliografia da mandioca campinas, Instituto agronomica, Boletim n° 182.
- HUTCHINSON (J.), DALZIEL (J.M.) - 1954.- Flora of West tropical Africa.  
2e édition - Millbank, London SW1.
- JOLIVET (E.) - 1969.- Physiologie de la tubérisation.  
Ann. Physio. vég. 11 (3) : 265-301.
- JONES (W.O.) - 1959.- Manioc in Africa  
Stanford Univ. Press U.S.A.
- LAGARDE (J.) - 1963.- Influence d'une forte température (27-28°) et de températures alternées sur le boulage, la croissance et la tubérisation du Crosne du Japon.  
C. R. Acad. Sci. Paris, 257, 739-742.

- LAGARDE (J.) - 1964.- Thermopériodisme et tubérisation chez le Crosne du Japon.  
C. R. Acad. Sci., Paris, 259 : 1191-1194.
- LANGERON (M.) - 1949.- Précis de Microscopie.  
Masson et Cie : 398-560.
- LEROUX (R.) - 1971.- Contribution à l'étude de la rhizogenèse de fragments de tiges de Pois (*Pisum sativum* L.) cultivés In vitro.  
Thèse Fac. Sci. Paris.
- MADEC (P.) PERENNEC (P.) - 1959.- Le rôle respectif du feuillage et du tubercule mère dans la tubérisation de la Pomme de Terre.  
Europ. Potato J. 2 : 22-49.
- MADEC (P.) - 1961.- Sur la présence et la possibilité d'extraction de substances inductrices de la tubérisation chez la Pomme de Terre.  
Ann. Physiol. vég., 3, 209-213.
- MADEC (P.), PERENNEC (P.) - 1962.- Les relations entre l'induction de la tubérisation et la croissance chez la plante de Pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.)
- MAGROU (J.) - 1939.- Concentration moléculaire et tubérisation chez la Pomme de terre.  
C. R. Soc. Biol., 130 : 1163-1166.
- MONTALDO (A.) - 1967.- Bibliografía de raíces y tuberculos tropicales.  
Revista de la facultad de agronomica de la Universidad central de Venezuela Alcana n° 13
- MURASHIGE (T.), SKOOG (F.) - 1962.- A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.  
Physiol. Plant., 15 : 473-497.
- NITSCH (J.P.) - 1965.- Existence d'un stimulus photopériodique non spécifique capable de provoquer la tubérisation chez *Helianthus tuberosus*.  
Bull. Soc. Bot. Fr., 112 : 333-339.

- 57
- NITSCH (J.P.) - 1966.- Photopériodisme et tubérisation.  
Bull. Soc. Fr. Physio. Vég., 12 : 233-246.
- SPANJERSBERG (G.), GAUTHERET (R.J.) - 1963.- Sur les facteurs de la néoformation des racines par les tissus de Topinambour cultivés in vitro.  
Bull. Soc. Bot. Ft., Mém. 110 : 47-66.
- STOLTZ (L.P.), HESS (C.E.) - 1966.- The effect of girdling upon root initiation : auxin and rooting cofactors.  
Proc. Amer. Soc. Hort. Sci., 89 : 744-759.
- TIZIO (R.) - 1964.- Effet du système racinaire sur la tubérisation de la Pomme de Terre.  
C. R. Acad. Sci., Paris, 258 : 6503-6506.
- TIZIO (R.) - 1964.- Action de l'acide gibbérellique sur la tubérisation de la Pomme de Terre.  
C. R. Acad. Sci., Paris, 259 : 1187-1190.
- TIZIO (R.) - 1964.- Remarques sur le mécanisme de la tubérisation de la Pomme de Terre.  
C. R. Acad. Sci. Paris, 259 : 2001-2004.
- WENT (F.), THIMANN (K.V.) - 1937.- Phytohormones.  
Mc Millan édit., New York, 294 p.
- WERNER (H.O.) - 1935.- The effect of temperature, photoperiod and nitrogen level upon tuberization in the potato.  
Amer. Potato J., 12 : 274-280.
- ZIMMERMANN (P.W. ), HITCHCOK (A.E. )-1936.- The localization of the mechanism which regulates tuberization in plants.  
Amer. J. Bot., 23, 690.