

MISE EN CULTURE *IN VITRO* D'UNE COLLECTION DE CULTIVARS DE MANIOC

Bilan provisoire après 4 mois d'expérimentation

Maurice LOURD

A la suite d'une mission effectuée en Amérique latine au printemps 1980, un premier échantillon de cultivars de manioc provenant du Brésil et de Guyane Française a été regroupé dans les serres de la Faculté des Sciences d'Orsay.

Outre la possibilité de conduire des études spécifiques sur ce matériel, il fut envisagé d'utiliser la collection pour répondre aux besoins des différents programmes de recherches conduits en Afrique sur le manioc, en particulier l'amélioration génétique pour la résistance aux maladies.

Par ailleurs, la technique de culture *in vitro* mise au point dans le laboratoire du Professeur NOZERAN offrait de réelles possibilités pour la mise en place ~~de~~^{et} la conservation de la collection. Il fut donc décidé d'appliquer cette méthode pour la conservation et la multiplication des cultivars de manioc Sud américains.

I - LA CULTURE *IN VITRO*

La culture *in vitro* consiste à transplanter puis maintenir sur milieu synthétique des boutures de plantes. Partant d'un matériel très restreint, un bourgeon par exemple, il est possible d'obtenir un individu conforme à l'individu initial mais de taille réduite, capable de se développer normalement dans l'espace limité d'un tube à essai. Les repiquages successifs conduisent, de plus, à la restauration des caractères juvéniles, caractéristique intéressante pour des études morphogénétiques par exemple.

Cette technique a été appliquée avec succès à de nombreuses plantes parmi lesquelles on peut citer la pomme de terre, la vigne, l'ananas, l'igname et le manioc. Elle offre de très larges possibilités en particulier :

- l'obtention rapide d'un nombre important de clones à partir d'une bouture ;
- la pratique aisée de la désinfection par thermothérapie du fait des conditions particulières de la culture en tubes à essai ;
- la constitution et la conservation de collections de clones dans un espace restreint.

A.S.I.O.M. Fonds Documentaire

N° 8238

Cpte B

Les travaux de FERREOL consacrés au manioc mettent parfaitement en lumière l'intérêt de la culture *in vitro*. Par cette méthode, les possibilités de multiplication végétative du manioc sont très importantes. La capacité de multiplication *in vitro* a été estimée, chez des clones africains, à une production potentielle d'un million de plantes en un an à partir d'une seule bouture. Par ailleurs, la miniaturisation des plants maintenus en tubes à essai permet de pratiquer la thérapie sur un grand nombre d'individus dans des conditions rigoureusement contrôlées, favorisant l'efficacité du traitement. Ainsi, il a été possible de reconstituer rapidement des clones sains à partir de plants fortement infectés par la mosaïque africaine.

La culture *in vitro* semble donc répondre aux besoins exprimés dans le contexte de notre intervention au Brésil et en Guyane et aux objectifs que nous nous sommes fixés pour l'utilisation du matériel collecté :

- création de collections de cultivars américains ;
- multiplication rapide des clones les plus intéressants ;
- possibilités d'échanges internationaux de matériel végétal sous la forme la moins encombrante et la plus à même d'éviter la propagation de maladies et de pertes.

II - LE MATERIEL VEGETAL

Le matériel végétal introduit sous forme de boutures prêtes à planter regroupe des cultivars de deux origines :

- 58 cultivars numérotés de 1 à 63 proviennent de la collection IRAT de Cayenne. Parmi eux, 9 sont brésiliens, 2 du Surinam, 1 de Madagascar. Les autres, tous guyanais, sont soit des cultivars traditionnels des paysans créoles, soit des cultivars indiens collectés par GRENNAN chez les Wayapi du village de Trois Sauts.

- 7 cultivars numérotés de 101 à 107 ont été collectés dans les champs aux alentours de Manaus en Amazonie Centrale. Il s'agit de 5 cultivars de manioc amer (mandioca) et de 2 cultivars de manioc doux (macaxeira).

Disposant de 3 boutures par numéro, il a été possible de répartir le matériel dans 3 serres différentes. La reprise en végétation a été excellente pour l'ensemble à l'exception de 3 cultivars qui ont été perdus par suite de

pourritures bactériennes et fongiques. Plantés en Mai, tous les maniocs étaient suffisamment développés en Septembre pour permettre le bouturage et l'implantation *in vitro*.

III - DEROULEMENT DE L'EXPERIMENTATION

Les travaux de FERREOL sur maniocs africains ayant donné d'excellents résultats, les méthodes culturales qu'il a mises au point ont été reprises intégralement pour le traitement de notre matériel. Faute de temps et parce que tel n'était pas notre propos, aucune expérimentation préalable n'a été entreprise pour juger de l'adaptation des clones Sud américains aux techniques préconisées. Le milieu de culture est celui de Murashige et Skoog sans complément de substances de croissance. Les conditions de culture après installation des boutures en tubes sont les suivantes :

- pour la croissance rapide des implants : température 27°C, éclairage 3500 lux, photopériode de 12 heures, humidité élevée ;
- pour le stockage de la collection : température 20°C assurant une croissance lente, toutes les autres caractéristiques étant identiques aux précédentes.

1) La mise en culture

Les implants primaires sont constitués de portions de tige comprenant un bourgeon prélevé sur le matériel cultivé en serre. La stérilisation des boutures avant la mise en culture est une opération importante qui conditionne la réussite de l'implantation. Des essais préliminaires que nous avons effectués à Abidjan avec du matériel local avaient montré l'insuffisance des conditions de traitement préconisées par FERREOL. Nous avons donc adopté les conditions suivantes :

- bain d'alcool à 70° pendant 30 secondes ;
- trempage dans une solution à 17 g/litre d'hypochlorite de calcium pendant 60 minutes ;
- trois rinçages successifs de 10 minutes chacun dans l'eau stérile.

L'implantation s'effectue ensuite en conditions stériles dans des tubes à essai de 25 mm de diamètre contenant environ 20 cm³ de milieu gélosé. Travaillant sur une collection de 65 cultivars, tous traités simultanément, il n'a pas été possible d'ensemencer plus d'un panier de 24 tubes par cultivar pour des raisons évidentes de volume de manipulation et d'encombrement. Ce nombre est, en toute hypothèse, insuffisant pour garantir la réussite totale pour tous les clones au terme d'une expérimentation longue au cours de laquelle les risques de contamination et de perte d'implants sont nombreux.

Six semaines après la mise en culture, tous les cultivars étaient représentés en culture *in vitro*, la réussite à la première implantation se situant entre 50 et 100 %. Il apparut rapidement que la vitesse de croissance pouvait être extrêmement variable selon les cultivars et même selon les implants d'un même cultivar. Dès lors, la synchronisation des repiquages pour l'ensemble de la collection n'était plus envisageable entraînant l'échelonnement dans le temps des manipulations et nécessitant une présence quasi permanente afin de suivre le développement de chaque clone.

2) Les repiquages successifs

Les bouturages successifs à partir des premiers implants sont nécessaires pour obtenir des cultures homogènes et en nombre suffisant avant le traitement par la thermothérapie.

Les repiquages sont effectués en conditions stériles par prélèvement de boutures sur les plants issus de l'implant primaire. Ces plants doivent atteindre un développement minimum de 6 à 7 noeuds avant d'être multipliés.

A ce stade de l'expérimentation sont apparues les premières difficultés. De très nombreux échecs ont été enregistrés du fait d'une reprise très lente et même nulle dans beaucoup de cas, des jeunes boutures. Le plus souvent, on observe d'abord le gonflement normal du bourgeon suivi d'un début de croissance de la jeune tige puis le développement s'arrête. Des racines sont parfois émises mais leur croissance est faible et devient rapidement nulle. Au bout de quelques semaines la bouture se dessèche et meurt.

Pour les cultivars les plus affectés par ce phénomène, les repiquages se sont soldés par 100 % d'échecs. A l'exception d'une dizaine de cultivars, ces symptômes ont été notés, dans des proportions variables, dans tous les repiquages de deuxième et troisième générations. Etant donné la quantité de matériel à traiter, ces échecs nous ont obligé à multiplier les repiquages afin de maintenir un effectif suffisant pour chaque cultivar. Il faut admettre que ces tentatives n'ont pas toutes été couronnées de succès, certains cultivars n'étaient plus représentés que par quelques tubes, voire un seul, en deuxième génération.

3) La thermothérapie

Selon le schéma établi par FERREOL, le traitement par thermothérapie se déroule comme suit : les jeunes plants au stade 4-5 noeuds sont placés en étuves closes à 36-37°C pendant 15 jours, puis à 39-40°C pendant 30 jours et ramenés à 36-37°C pendant 45 jours. Tout au long du traitement, un éclairage sous 3500 lux est assuré avec une photopériode de 12 heures. Une humidité élevée est maintenue à l'intérieur des étuves.

Ce traitement s'est avéré suffisant pour obtenir une guérison définitive chez la plupart des clones africains atteints de mosaïque que FERREOL a testés. Les plus gravement contaminés par la maladie ont cependant dû être soumis à un traitement plus long de 50-jours.

Pour ce qui concerne notre collection, la mosaïque africaine est sans doute absente des cultivars Sud américains puisqu'elle est encore inconnue à ce jour sur le nouveau continent. Par contre nous pouvons redouter la présence d'autres maladies virales en particulier la mosaïque commune qui n'existe pas en Afrique et contre laquelle il convient de se prémunir dans la perspective d'exportation du matériel vers la Côte d'Ivoire ou le Congo.

Aucune expérimentation n'a encore été entreprise pour évaluer l'efficacité de la thermothérapie sur les cultures *in vitro* à l'encontre de la mosaïque commune. Nous partons cependant de l'hypothèse que ce traitement constitue une précaution supplémentaire ajoutée à la quarantaine pour garantir le parfait état sanitaire des plants. Une surveillance sanitaire permanente est par ailleurs assurée sur les pieds-mères installés en serre.

La thermothérapie a débuté à la fin du mois de Novembre pour les plants ayant eu la croissance la plus rapide. Nous avons actuellement plusieurs lots en traitement à des stades différents du fait de l'étalement des cultures. Le passage à des températures élevées, à la limite de la viabilité pour les plantes est très destructeur pour les clones les moins vigoureux. Le premier traitement de 2 semaines à 37°C s'est ainsi soldé par une perte globale de 30 %. Les survivants semblent se comporter convenablement à 39-40°C si le traitement n'est pas trop prolongé.

Devant l'ampleur des pertes, il nous a paru raisonnable de scinder le passage de 30 jours à 40°C en deux périodes de 2 semaines chacune séparées par un retour à 37°C pendant 2 semaines. Ceci afin de sauvegarder la faible quantité de matériel dont nous disposons pour chaque cultivar.

L'expérience se poursuit donc d'après ces nouvelles normes.

IV - BILAN PROVISOIRE ASSORTI DE QUELQUES REMARQUES

A l'heure actuelle, c'est-à-dire 4 mois après le début de l'expérimentation le bilan se présente ainsi :

- 57 cultivars sont en culture *in vitro* après les 2 premières phases de la thermothérapie c'est-à-dire 2 semaines à 37° + 2 semaines à 40°. Il faut cependant noter que seulement 13 d'entre eux sont représentés par plus de 5 tubes. Tous les autres sont dans une situation précaire, le très faible effectif de tubes ne les mettant pas à l'abri d'une disparition du fait du traitement par la chaleur, du risque de contamination ou de tout autre accident en cours d'expérience.

Les repiquages qui doivent avoir lieu pendant la thermothérapie et qui sont déjà commencés pour une part, pourront assurer une multiplication du matériel faiblement représenté dans la mesure où les échecs à la reprise seront faibles. Nous pouvons toutefois espérer parvenir au terme de la thermothérapie pour au moins 50 % du nombre des cultivars de la collection.

- 8 cultivars sont totalement absents en culture *in vitro* par suite des échecs successifs au repiquage ou en thermothérapie. Ils pourront être repris à partir des pieds-mères à condition seulement que les problèmes rencontrés aient trouvé une solution.

Ce bilan qui peut sembler modeste, apparaît, aux yeux des personnes possédant une longue expérience de la culture *in vitro*, satisfaisant étant donné le faible effectif par cultivar mis en place au départ de l'expérimentation et les multiples aléas rencontrés au cours de celle-ci.

Par ailleurs, il nous apparaît nécessaire de tenir compte des données pratiques et techniques propres à cette expérience et des problèmes qui y sont liés :

- faute de moyen en personnel, toute la partie technique - fabrication des milieux, répartition en tubes, repiquages, marquages, et parfois lavage de la vaisselle - a dû être assurée par une seule personne ;
- le volume de matériel en expérimentation a parfois posé des problèmes d'espace en chambres de culture notamment, celles-ci étant utilisées par ailleurs pour d'autres recherches ;
- les conditions d'environnement rigoureuses, nécessaires à la bonne croissance des plants ont été difficiles à maintenir compte tenu des aléas techniques. Ainsi, une panne d'humidificateur intervenue en chambre de culture lors d'une importante série de repiquages a sans doute eu des effets non négligeables sur le taux de reprise.

Ces problèmes pratiques, parmi d'autres, et qu'il est bon de rappeler, ne doivent cependant pas nous faire oublier les problèmes de fond. Il apparaît ainsi que l'utilisation d'une seule technique pour le traitement d'un matériel important et diversifié est aléatoire. Il faut remarquer que les techniques de culture ont été mises au point par FERREOL pour seulement 7 cultivars de manioc africains. Pour les cultivars Sud-américains, au moins pour certains d'entre eux, des variantes dans la composition du milieu de culture, dans les conditions d'environnement doivent sans doute être recherchées pour supprimer les échecs au repiquage par exemple. Il en est de même de la thermothérapie pour laquelle des conditions adaptées à chaque type de matériel doivent être étudiées.

Tels sont quelques éléments qu'il convient de prendre en compte lors de la mise en place d'une expérimentation assez lourde étant donné la quantité de matériel végétal à traiter et sa diversité.

La culture *in vitro* est sans doute promise à un bel avenir pour la constitution et le stockage de collections de clones ainsi que dans certaines recherches en Phytopathologie par exemple - screening en grande série pour la résistance - mais elle demandera d'importants moyens en personnel et en matériel pour être conduite dans de bonnes conditions quand il sera question de collections de plusieurs centaines, voire milliers de cultivars.

Fait à ORSAY, le 17 Février 1981