

L'INTRODUCTION, L'ENTRETIEN ET LA MULTIPLICATION IN VITRO DU *Manihot glaziovii* Muell

Bien que ne tubérisant pas, le *Manihot glaziovii* Muell apparaît comme une source de résistance à diverses maladies du *M. esculenta* Crantz (MABANZA & JONARD, 1984.; CHARRIER & LEFEVRE, 1987). Ainsi pour être utilisé dans les travaux d'amélioration du manioc cultivé par les biotechnologies, le *Manihot glaziovii* Muell devrait pouvoir être entretenu facilement en culture in vitro.

L'intérêt porté ces dernières années sur le *Manihot glaziovii* Muell par plusieurs chercheurs nous a conduit à nous intéresser à la maîtrise de l'entretien et de la multiplication in vitro de cette espèce, afin qu'elle puisse mieux participer aux travaux d'amélioration par les biotechnologies de l'espèce cultivée.

II - Matériel et méthodes

Les implants du *Manihot glaziovii* Muell et de ses hybrides naturels avec le *Manihot esculenta* Crantz constituent le matériel végétal. Trois arbres de *M. glaziovii* Muell (GL1, GL2 et GL3) ont été sélectionnés et deux hybrides utilisés (HG1 et HG2).

Nous appelons microbouture, une portion de tige non adouée munie d'un oeil ou bourgeon axillaire. Les microboutures utilisées ont une longueur de 1 cm.

Nous avons utilisé aussi l'embryon zygotique. Les embryons utilisés ont une longueur comprise entre 0,8 - 1 cm (embryon avec cotylédons) et 0,1 - 0,2 cm (embryon sans cotylédons).

Le milieu de base utilisé est celui de MURASHIGE & SKOOG (1962) noté MS sous forme gélosée. Au milieu minéral de base, nous ajoutons le sucre à 30 g/l, l'inositol 0,1 g/l, les phytohormones à diverses concentrations. Le pH est ajusté à 5,7 - 5,8.

Nous avons aussi utilisé les composantes déjà mises au point par MABANZA en 1980 (Milieu 1 noté MA1 : MS + 1 ANA + 0,5 BAP + 0,1 AG3, le milieu 6 noté MA6 : MS + 0,1 ANA + 0,5 BAP, et le milieu 15 noté MA15 : MS + 0,05 ANA), par l'ITA (MI : MS + 0,01 ANA + 0,05 BAP) et par KARTHA en 1974 (MK : MS + 0,2 ANA + 0,5 BAP + 0,1 AG3). Nous avons nous-mêmes formulé d'autres compositions appelées MO qui sont MO1 : MS 0,05 AIA, MO2 : MS + 0,05 AIB, MO3 : MS + 0,01 AIA + 0,05 BAP et MO4 : MS + 0,01 AIB + 0,05 BAP

Les phytohormones utilisées appartiennent à trois groupes : les auxines (acide naphthalène acétique ou ANA, acide indole acétique ou AIA et acide indole butyrique ou AIB), les cytokinines (benzylaminopurine ou BAP), et les gibbérélines (acide gibbérélique AG3).

Notre matériel de culture a été désinfecté selon le procédé suivant : on ajoute quelques gouttes du tween 20 dans l'hypochlorite de calcium à 4 % pour permettre à l'hypochlorite de pénétrer dans les explants. Le trempage a été de 15 minutes et suivi de trois rinçages à l'eau distillée stérile à intervalle de 5 minutes chacun.

En ce qui concerne le bouturage direct, après rinçage, les microboutures désinfectées sont déposées sur du papier filtre stérile. A l'aide de pinces brucelles nous prélevons la microbouture et nous l'installons verticalement dans le tube à essai contenant le milieu stérile sans enfouir l'oeil. En outre, les embryons issus de trois arbres de *M. glaziovii* ont été utilisés et quatre milieux de culture essayés : il s'agit des milieux MS, MA1, MA15 et MK. Après ensemencement, les tubes sont gardés à l'obscurité pendant 5 jours. Au 6ème jour les tubes sont exposés à la lumière à 3500 lux pendant 16 heures de jour sur 8 heures de nuit.

III - Résultats

En ce qui concerne l'introduction du matériel végétal par le bouturage direct, nous n'avons obtenu des plantes entières avec succès qu'avec les hybrides HG1 et HG2. Les plantes obtenues des explants HG1 et HG2 se développent normalement comme dans nos techniques de multiplication de *Manihot esculenta* Crantz. Dans notre expérimentation, avec le *Manihot glaziovii* Muell nous avons connu des déboires qui nous ont amené à utiliser des organes juvéniles comme les embryons.

Dans ce dernier cas, nous remarquons que les milieux MS et MA15 donnent facilement des plantes. A 15 jours les plantes obtenues ont une bonne croissance et sont très vigoureuses. Le pourcentage de réussite est de 58,3 % dans MS et 83,3 dans MA15 pour le génotype GL1 : pour GL2, le pourcentage de réussite est de 91,7 % dans MS et 100 % dans MA15. Le milieu MA15 est donc favorable à la culture in vitro des embryons du *Manihot glaziovii* Muell (voir tableau ci-après et figure A).

Les milieux MA1 et MK, bien qu'ils favorisent la régénération des plantes entières, provoquent également la formation des cal. Les plantes obtenues dans ces deux milieux n'ont pas une bonne croissance et ne sont pas viables.

Le tableau suivant indique les résultats enregistrés au niveau de la culture des embryons.

Hauteur des plantes obtenues dans différents milieux de culture (les mesures sont faites après 30 jours et présentées en cm)

Génotypes	MS	MA1	MA15	MK
GL1	5,7	9,9	1	1,7
GL2	6,7	9,8	1,02	1,8
GL3		7,05		

Le meilleur développement des plantes a été obtenu dans le milieu MA15. Comme l'indique la figure A, nous notons que la hauteur moyenne des plantes est bien grande et atteint 2,9 cm à 15 jours et 9,9 cm à 45 jours pour le génotype GL1 avec un pourcentage de réussite de 83,3 % ; 1,9 cm à 15 jours et 9,8 cm à 45 jours avec un pourcentage de réussite de 100 % pour GL2 ; pour GL3 nous enregistrons une hauteur de 1,4 cm à 15 jours et 7,05 cm à 45 jours avec un pourcentage de réussite de 100 %.

L'échec observé au niveau de nos premières tentatives de multiplication avec les milieux contenant de l'ANA nous a poussé à utiliser de nouveaux milieux contenant d'autres phytohormones comme l'acide indole acétique (AIA) et l'acide indole butyrique (AIB). Le milieu contenant 0,05 mg/l de AIA (MO1) ; 0,05 mg/l de AIB (MO2) et 0,01 mg/l de AIA auquel on ajoute 0,05 mg/l de BAP (MO3) n'ont pas donné des plantes entières quelle que soit la partie utilisée, par contre dans le milieu contenant 0,01 mg/l de AIB avec 0,05 mg/l de BAP (MO4) toutes les parties utilisées donnent des plantes entières. Cependant comme l'indique les figures C et D, la partie apicale présente le meilleur pourcentage de réussite. Les plantes obtenues se développent normalement, elles ont une bonne croissance et une bonne vigueur.

Nous observons une amélioration du développement des pousses et du pourcentage de réussite lorsqu'on maintient les cultures à l'obscurité pendant 7 jours. Pour le génotype GL2 par exemple, la réussite est passée de 41 % à 62,5 % pour la partie apicale ; 20,8 % à 41,7 % pour la partie médiane et 12,5 % à 33,3 % pour la partie basale (figure C et D). Ainsi nous avons commencé à améliorer nos réussites sur la multiplication.

Des résultats obtenus nous observons que pour une meilleure multiplication, il convient d'utiliser les pousses apicales de *M. glaziovii* avec 2 à 3 feuilles. Les pousses ayant un nombre de feuilles inférieur à 2 donnent des résultats moins satisfaisants.

Le milieu MA15 est favorable à la culture in vitro des embryons du *Manihot glaziovii* Muell comme le souligne MABANZA (1990). Il permet l'obtention des plantes vigoureuses avec une bonne croissance et un bon pourcentage de réussite (100 %).

Les calcs observés dans les milieux MA1 et MK seraient dus à une forte concentration en auxine. En effet cette phytohormone (ANA) stimule la multiplication cellulaire (CHAUSSAT & BIGOT, 1982) qui est à l'origine de la formation des calcs. La faible vitesse de croissance des plantes pourrait être attribuée à l'acide gibérellique (AG3) qui selon TILQUIN (1978) a une action morphogène marquée pendant les premiers jours qui devient négative et même toxique avec le temps.

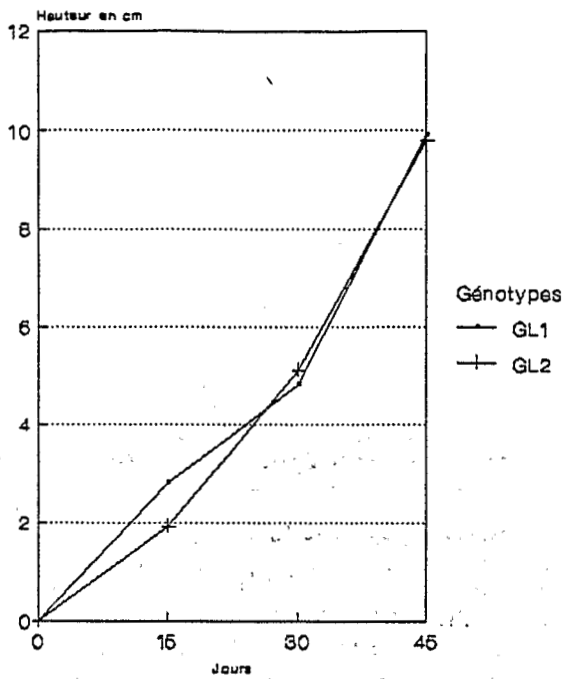
Il apparaît ainsi que l'AIB est l'auxine la plus favorable à l'entretien et la multiplication des génotypes du *M. glaziovii* Muell. Ces résultats nous font penser à l'effet très marquant des auxines (ANA et AIB) observé par de nombreux chercheurs suivant l'espèce utilisée. En effet NAKAMURA (1986, 1988, 1990) obtient des résultats très satisfaisants avec l'AIB sur la multiplication in vitro du thé, alors que MABANZA (1980) réalise avec succès la multiplication in vitro de manioc en utilisant simplement de l'ANA.

Nous avons ainsi dans notre travail mis au point un schéma d'introduction, d'entretien et de multiplication des génotypes du *M. glaziovii* Muell que nous avons utilisé dans notre expérimentation. Ce schéma permet l'obtention de 4 plantes utilisables en 45 jours. Grâce à cette expérimentation, nous pouvons désormais entretenir dans les conditions in vitro les différents génotypes de *M. glaziovii* Muell dont nous disposons et permettre ainsi des manipulations biotechnologiques visant à l'amélioration de l'espèce cultivée.

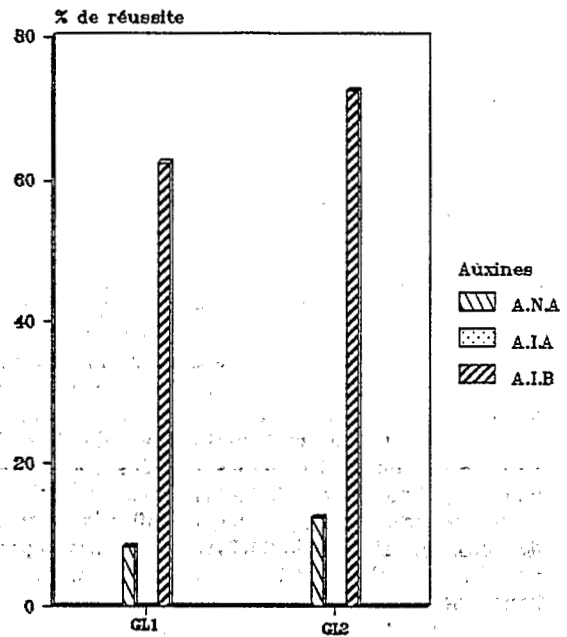
Références bibliographiques

- 1.- CHARRIER, A. & LEFEVRE, F., 1987 : La diversité génétique du manioc : son origine, son évaluation et son utilisation. In mosaïque africaine du manioc et son contrôle. Yamoussoukro, ORSTOM, p. 71-81
- 2.- CHAUSSAT ; BIGOT al., 1980 : La multiplication végétative des plantes supérieures. Paris, Gauthier-Villars, 227 p.
- 3.- MABANZA, J., 1980 : Essai d'isolement de clones de manioc (*M. esculenta* Crantz) en vue d'isoler ultérieurement des clones résistants à la bactériose. DEA, Agronomie-phytotechnie, Montpellier, 61 p.
- 4.- MABANZA, J., 1990 : Rapport scientifique sur le projet "amélioration des cultivars Africains de manioc". Contrat CEE-DGRST, Brazzaville, CERAG, p. 21-24
- 5.- MABANZA & JONARD, 1984 : L'isolement et le développement in vitro des protoplastes de *Manihot glaziovii* Muell. C.R. Acad. Sci., série 3, (Sciences de la vie), Paris 298 (19), 563-566
- 6.- NAKAMURA, 1987 : Shoot tip culture of tea cultivar Yabukita. Japan, 7 p.
- 7.- NAKAMURA, 1988 : Effects of the kind of auxine on callus induction and root differentiation from stem segment culture of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. Shizuoka, tea experiment station, Japan, 8 p.
- 8.- NAKAMURA & MARIKO SHIBATA, 1990 : micropropagation of tea plant (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) through in vitro cuttings : Effects of various hormones on the growth of shoot from axillary buds. Shizuoka, tea experiment station, Japan, 23 p.
- 9.- TILQUIN, J.P., 1978 : Régénération et multiplication du manioc par la culture d'entre-noeuds et de calcs. In diseases of tropical food crops. Proc. of an Intern. Symp., Louvain la Neuve, Belgique, 297-306

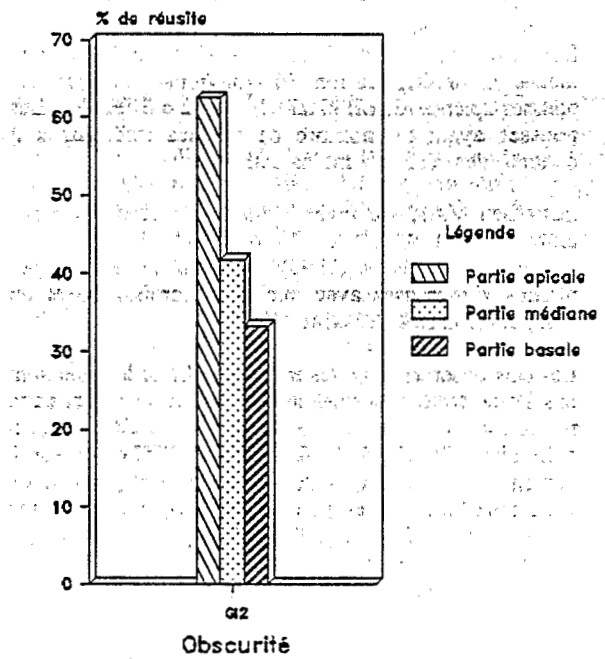
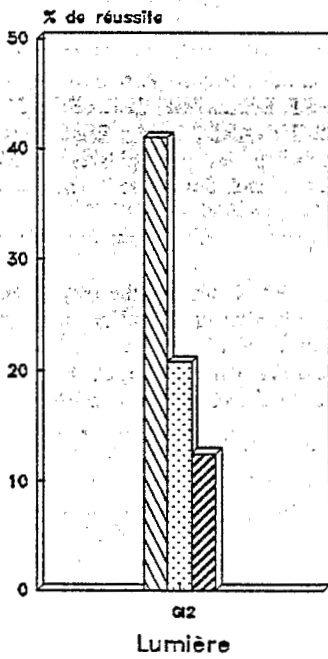
CULTURE EMBRYONS DANS M15
Développement des embryons GI dans M15



Comportement de GL1 et GL2 en fonction des auxines



L'introduction s'opère favorablement par les embryons dans le milieu 15 de MABANZA et la multiplication dans le milieu MO4 mis au point.



MULTIPLICATION IN VITRO DU MANIHOT GLAZIOVII