



Effets de différentes combinaisons hormonales sur l'organogénèse *in vitro* de quelques cultivars locaux et variétés améliorées de *Manihot esculenta* Crantz (manioc-*Euphorbiaceae*) cultivées au Bénin

Gilles Habib Todjro CACAI^{1*}, Corneille AHANHANZO¹, Justine S. DANGOU²,
Serge S. HOUEJISSIN¹ et Clément AGBANGLA¹

¹Laboratoire de Génétique et des Biotechnologies, Faculté des Sciences et Techniques
(FAST/UAC), 01B.P. 526, Cotonou, Bénin.

²Laboratoire d'Etude et de Recherche en Chimie Appliquée 01 BP 2009 Cotonou République du Bénin.

*Auteur correspondant, E-mail : caghat@yahoo.fr ; Tel : 00229 95-79-13-83

RESUME

Manihot esculenta (Euphorbiacée) est une plante à racine amyliacée d'une grande importance économique. La multiplication par voie végétative bien que favorisant une grande homogénéité génétique demeure le principal facteur d'attaque par les ravageurs. Ce travail vise à analyser les effets de différentes combinaisons hormonales sur l'organogénèse *in vitro* de quelques cultivars locaux et variétés améliorées du Bénin. Les microboutures uninodales sont désinfectées et mises en culture dans les milieux de base MS (Murashige et Skoog) additionnés de différentes combinaisons de régulateurs de croissance : ANA (acide naphthalène α -acétique); (BAP) (benzylaminopurine); kinétine. Les effets des différentes combinaisons ont été étudiés sur les paramètres de croissance après huit semaines de culture. la combinaison (MS+ANA) a permis d'obtenir les moyennes les plus élevées de caulogénèse ($8,62 \pm 0,8$ cm) et de phyllogénèse ($5,5 \pm 0,3$) chez le cultivar Ahouandjan, alors que la combinaison (MS+KIN) a donné l'effet contraire chez la variété 92/0057 avec une hauteur ($0,14 \pm 0$ cm) et une phyllogénèse ($1,30 \pm 0,1$). Le nombre moyen élevé de racines formées ($4,0 \pm 0,5$) a été obtenu chez le cultivar Agric Sazoué sur la combinaison (ANA+KIN) pendant qu'on obtenait la longueur moyenne la plus élevée de racine chez le cultivar Ahouandjan ($6,30 \pm 0,7$ cm) sur le milieu (MS+ANA). Ces résultats permettront d'améliorer les techniques de production de vitroplants utilisés pour semence.

© 2012 International Formulae Group. All rights reserved.

Mots clés : Culture *in vitro* ; *Manihot esculenta* Crantz ; organogénèse ; ANA ; BAP ; kinétine.

INTRODUCTION

Le manioc (*Manihot esculenta* Crantz), est une culture pérenne, une plante herbacée à racines tubéreuses, amyliacées et à tige noueuse. Il s'adapte à un large éventail de milieux et présente une bonne résistance à la sécheresse et à l'acidité des sols. Il se classe au cinquième rang mondial des productions

végétales alimentaires derrière le maïs, le riz, le blé et la pomme de terre (FAO, 2008). Il se cultive dans toutes les régions du Bénin en l'occurrence dans les régions centrales et celles du Sud (MEPN, 2008). Le manioc, culture de subsistance à l'origine, tend à devenir une culture commerciale comme le coton, le café, le palmier à huile, et procure

des revenus substantiels aux producteurs. Plus de 72% de la production des ménages sont vendus contre 67% pour le maïs (Nweke, 1996). Il est consommé sous plusieurs formes: gari, tapioca, pilée et bien d'autres pâtes, tandis que les feuilles sont consommées comme légume, ou servent d'emballage dans les régions du sud et du centre du pays. Le manioc est aussi utilisé comme aliment pour le bétail.

Malgré cette importance, le manioc reste l'une des rares cultures dont les techniques culturales ont connu très peu d'amélioration. La multiplication par voie végétative reste le principal mode de reproduction de cette plante et favorise de ce fait une augmentation du taux de contamination de ce fait, une bonne production exige de matériel de plantation libre de tout pathogène (Yaninek et al., 1997). Aussi, la culture du manioc se trouve-t-elle confrontée à d'autres séries de contraintes comme les maladies virales et bactériennes, les attaques par les ravageurs, les facteurs agronomiques, édaphiques et socio-économiques qui conduisent à une insuffisance de matériels de propagation. Du fait de l'importance grandissante des maladies et ravageurs à partir des années 1970, de nombreux programmes de recherche conduits par Mingui et al. (1992) puis Mabanza et Mingui (1998 a et b) ont permis de réaliser des prospections et collectes des cultivars locaux de manioc. Mais la mise en collection *ex-situ* de ces cultivars a posé de nombreux problèmes de maintenance eu égard aux aléas climatiques, aux maladies et ravageurs et aux difficultés financières. Le Réseau Biotechnologique du Manioc aussi combine les forces pour mobiliser la biotechnologie comme un outil d'accroissement de la valeur du manioc pour la sécurité alimentaire et comme un moyen d'accès au développement économique. L'attention s'est donc tournée vers les possibilités offertes par les biotechnologies et, de manière plus spécifique, par la culture *in vitro*. Au cours des 30 dernières années, les techniques de

culture *in vitro* se sont largement développées et elles ont été appliquées à plus de 1000 espèces différentes (George 1993a,b). Ces techniques de cultures de tissus sont d'un grand intérêt d'une part pour la collecte, la multiplication et la conservation du matériel génétique (Engelmann, 1991); d'autre part pour la production de matériel sain de plantation. Les systèmes de culture de tissus permettent de propager le matériel végétal avec des taux de multiplication élevés, dans un environnement aseptique.

Selon certains travaux utilisant les techniques de multiplication rapide, la réussite de la culture *in vitro* des tissus végétaux dépend de plusieurs facteurs que sont le génotype (Gandonou et al., 2005), et l'effet des régulateurs de croissance (Ahanhanzo, 2010). Les types de régulateurs de croissance qui rentrent souvent dans la composition des milieux de culture sont les auxines, les cytokinines, l'acide gibbérellique et parfois l'acide abscissique. Les auxines les plus souvent utilisées en organogenèse ou en embryogenèse somatique sont le 2,4-D (acide 2,4-dichlorophénoxy acétique), l'AIA (acide indole-3-acétique), l'AIB (acide indole-3-butérique) et l'ANA (acide α -naphtalène acétique). Quant aux cytokinines, elles sont représentées par la kinétine, la benzylaminopurine (BAP), la 2-isopentenyladénine et la zéatine. Le rapport hormonal (auxine / cytokinine) conditionne, en grande partie, le type de néoformation obtenu. Ce rapport a conduit, dans le cas de la culture *in vitro* de l'igname, à l'orientation des tissus, soit vers la caulogenèse, soit vers la rhizogenèse (Ahanhanzo, 2010). Ainsi, la néoformation de bourgeons est souvent favorisée par des teneurs élevées en cytokinine alors que les fortes doses en auxine stimulent la formation de racines et améliorent leurs qualités. L'influence de ce rapport hormonal n'est, cependant, pas une règle générale pour toutes les espèces végétales. Les différents travaux réalisés jusque là sur la culture *in vitro* du manioc ont peu porté sur l'amélioration de

l'organogénèse. Pour la réussite de l'acclimatation dans le processus du renouvellement du pied de cuve, les vitroplants doivent présenter un développement harmonieux des différents organes (tige, feuilles et racines). En effet, pour une multiplication rapide des vitroplants de manioc, Mabanza et Jonard (1981) ont utilisé un milieu composé de MS + 0,05 mg/L d'ANA alors qu'une composante utilisée à l'IITA (Institut International d'Agriculture Tropicale) par Ng (1990) : MS + 0,01 mg/L d'ANA + 0,05 mg/L de BAP (6-benzylaminopurine) a servi de milieu de multiplication des vitroplants. Les travaux de Ahanhanzo et al. (2008) ont montré que les régulateurs de croissance (l'acide naphthalène acétique la benzylaminopurine et la kinétine) influencent différemment la morphogénèse *in vitro* de trois variétés améliorées de manioc (RB 89509, BEN 86052, TMS 30572) vulgarisées au Bénin. Si l'ANA est identifié pour favoriser la rhizogénèse, les cytokinines assurent le développement des organes aériens. Si Mabanza et Jonard (1981) et Ng (1990) n'ont du tout pas utilisé la kinétine dans leurs travaux, Ahanhanzo et al. (2008) l'ont utilisé en n'évaluant que l'effet de la kinétine sur trois variétés. La présente étude vise à analyser les effets de différentes combinaisons hormonales dont la kinétine sur l'organogénèse *in vitro* de deux variétés et huit cultivars locaux de *Manihot esculenta* Crantz (manioc-*Euphorbiaceae*) cultivés au Bénin.

MATERIEL ET METHODES

Préparation du matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de huit cultivars locaux et de deux variétés de manioc. Les noms des cultivars locaux correspondent soit aux localités où elles ont été collectées, soit à certaines significations ethniques (Tableau 1).

Les boutures à raison de dix par variété, après collecte, sont désinfectées par un fongicide, le Topsin'M à 0,5% pendant cinq

minutes, et sont mises dans des pots en polyéthylène remplis de terreau traité par un désinfectant (carbofuran), puis disposées dans une serre pour obtention des plantes-mères. Les prélèvements d'explants à partir des plantes-mères pour la culture *in vitro* ont débuté après quatre semaines avec une périodicité de 15 jours. Les explants prélevés des plantes-mères en serre sont soigneusement lavés à l'eau courante puis désinfectés. Le protocole de désinfection et les conditions de culture sont ceux utilisés par Ng (1990). Pour cela, les explants sont immergés à l'éthanol 70° pendant 5 minutes puis dans une solution à 10% d'hypochlorite de sodium et quelques gouttes de tween 20 pendant 20 minutes. Ils sont ensuite soumis à trois rinçages successifs à l'eau distillée stérile sous une hotte à flux laminaire horizontal. Les explants ainsiensemencés sont mis en culture dans une salle de culture, à une température de 27 ± 1 °C, une photopériode de 12 heures d'éclairage par jour sous une intensité lumineuse de 6000 lux. L'humidité relative de la salle est de 80%.

Milieus de culture *in vitro*

Les milieux de culture utilisés ont pour base le milieu de Murashige et Skoog (1962) noté MS, auquel est ajouté un régulateur de croissance ou une combinaison de régulateurs de croissance. Il s'agit de l'acide naphthalène α -acétique (ANA), la benzylaminopurine (BAP) et la kinétine. Ainsi, les milieux MI, MII et MIII, contiennent respectivement 0,1 mg/l d'ANA ; 0,2 mg/l de BAP et 0,2 mg/l de kinétine. Les milieux MIV et MV sont respectivement des combinaisons entre l'ANA et la BAP : 0,1 mg/l d'ANA+0,2 mg/l de BAP d'une part et entre l'ANA et la kinétine : 0,1 mg/l d'ANA+0,2 mg/l Kinétine d'autre part. Le pH des milieux de culture est ajusté à $5,7 \pm 0,1$. Une fois préparés, ils sont stérilisés dans un autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

Tableau 1: Variétés et cultivars locaux de manioc collecté.

Localités	Echantillons de manioc collectés	
	Variétés	Cultivars locaux
Adjohoun Sèmè Podji	-	Ahouandjan, Sèkandji
Grand Popo Comè	-	Agric Sazoué Agric Comé
Djakotomey (Sud du Bénin) Djakotomey (Sud du Benin)	-	Kpètévikoutou Gbèzé
Savè (CRA-Centre)	BEN 86052	Okoyao
Savè (CRA-Centre)	92/0057	
IITA Ibadan (Nigeria)		Ibadan

Paramètres étudiés et analyses

A l'issue de huit semaines de culture, les observations ont porté sur les paramètres de croissance à savoir la hauteur de la tige (caulogénèse), la phyllogénèse, le nombre de racines, la longueur des racines (rizhogenèse), la masse de matière fraîche et la masse de matière sèche. La masse de matière fraîche est obtenue en débarrassant d'abord les vitroplants de leur gélose. Ils sont ensuite pesés sur une balance de précision de l'ordre des mg de la marque *SCALTEC*. La masse de matière sèche est obtenue après dessiccation des vitroplants dans une étuve à 70 °C pendant 5 jours. La hauteur de tige est obtenue en mesurant la longueur allant du collet aux ramifications de la pousse feuillée. Pour la phyllogénèse, toutes les feuilles de chaque vitroplant sont comptées. Le nombre de racines et leur développement sont obtenus en comptant toutes les racines par vitroplant et en mesurant pour chacune d'elles la longueur allant du collet à l'extrémité. Pour l'analyse statistique, un modèle mixte avec "Milieu de culture" comme facteur principal et "variétés/cultivars locaux" comme facteur aléatoire a été adopté. La moyenne de dix vitroplants constituant l'unité d'échantillon est utilisée dans le modèle à trois répétitions. Au total, le dispositif d'analyse ANOVA est

constitué de 5 milieux de cultures x 10 variétés/cultivars locaux x 3 répétitions de 10 échantillons de vitroplants nécessaires. Les expérimentations ont porté sur dix vitroplants par variété ou accession. Chacune de ces expérimentations est répétée trois fois. Pour comparer chacun des paramètres de croissance entre les variétés/cultivars locaux, nous avons utilisé l'analyse de la variance (ANOVA) et les moyennes significativement différentes ont été séparées par le test de Student Newman Keuls aux seuils de probabilité de 0,1%, 1% et 5 %.

RESULTATS

Effets des différentes combinaisons hormonales sur la hauteur des tiges (caulogénèse)

Les résultats des effets des combinaisons hormonales sur la caulogénèse sont mentionnés sur la Figure 1. La réaction des cinq milieux n'est pas la même d'une variété/cultivar local à une autre. Ainsi, MS+KIN et MS+ANA ont respectivement donné la hauteur moyenne la plus élevée de tige chez les cultivars locaux Agric Sazoué ($3,54 \pm 0,4$ cm) et Gbèzé ($6,36 \pm 0,3$ cm) d'une part et Ahouandjan ($8,62 \pm 0,8$ cm) d'autre part. Chez les variétés 92/0057 ($1,63 \pm 0,1$ cm),

BEN 86052 ($4,20 \pm 0,6$ cm), et les cultivars locaux Sèkandji ($6,6 \pm 0,4$ cm), Okoyao ($1,85 \pm 0,3$ cm), c'est par contre la combinaison ANA+KIN qui donne des moyennes les plus élevées de hauteur. Pour les cultivars locaux Agric Comé et Ibadan, ce sont respectivement les combinaisons ANA+KIN, les milieux MS+ANA et MS+BAP d'une part, et les milieux MS+ANA; MS+KIN avec les combinaisons ANA+BAP d'autre part qui ont donné la hauteur moyenne de tige la plus élevée chez ces deux variétés (Figure 1). Les résultats montrent l'existence d'une différence au moins significative au seuil de 5% entre les cinq milieux de cultures utilisées sur toutes les variétés/cultivars locaux, excepté le cultivar local Kpètévikou chez qui la différence entre les milieux est non significative au seuil de 5%.

Effet des différentes combinaisons hormonales sur la phyllogénèse

La Figure 2 permet de faire les constats ci-après. La réaction des cinq milieux n'est pas la même d'une variété/cultivar local à une autre. Les milieux MS+ANA; MS+BAP; MS+KIN; et les combinaisons ANA+BAP; ANA+KIN ont donné respectivement le plus grand nombre moyen de feuilles chez les accessions Ahouandjan ($5,5 \pm 0,3$ feuilles), Agric comé ($4,2 \pm 0,6$ feuilles), Gbèzé ($4,5 \pm 0,3$ feuilles), Kpètévikoutou ($3,4 \pm 0,3$ feuilles) et la variété 92/0057 ($1,7 \pm 0,1$ feuilles). Chez les accessions Sèkandji ($3,5 \pm 0,3$ feuilles), Ibadan ($4,1 \pm 0,3$ feuilles), Agric sazoué ($4,2 \pm 0,4$ feuilles), c'est par contre les milieux MS+ANA; MS+ANA ou MS+KIN; MS+BAP qui ont donné respectivement le nombre moyen élevé de feuilles. Chez la variété BEN 86052 c'est plutôt le milieu MS+KIN qui a donné une bonne phyllogénèse avec une moyenne de $4,9 \pm 0,2$ feuilles. L'ensemble des régulateurs c'est-à-dire

l'ANA, la BAP et la kinétine et les combinaisons ANA+BAP et ANA+KIN ont un effet hautement significatif au seuil de 0,1% chez les variétés 92/0057; BEN 86052 d'une part et les accessions Ahouandjan; Gbèzé; Kpètévikoutou; Sèkandji; Agric Sazoué et Ibadan d'autre part. Les résultats montrent l'existence d'une différence au significative au seuil de 5% entre les cinq milieux de cultures utilisés sur toutes les variétés/cultivars locaux excepté le cultivar local Okoyao chez qui la différence entre les milieux est non significative au seuil de 5%.

Effet des différentes combinaisons hormonales sur la rizhogenèse (nombre de racines formées et longueur des racines)

Effet des différentes combinaisons hormonales sur le nombre de racines formées

Les résultats des effets des combinaisons hormonales sur le nombre moyen de racines formées sont mentionnés sur la Figure 3. La réaction des cinq milieux n'est pas la même d'une variété/cultivar local à une autre. L'analyse de ces données montre que les milieux MS+ANA; MS+KIN et la combinaison ANA+KIN favorisent la rizhogenèse chez les accessions Agric Sazoué, Sèkandji et Gbèzé avec une moyenne élevée de racines formées respectivement sur MS+KIN ($4,0 \pm 0,5$ racines), MS+ANA+KIN ($5,5 \pm 0,5$ racines) et MS+ANA ($2,0 \pm 0,3$ racines). Le milieu MS+BAP et la combinaison ANA+BAP sont peu ou pas favorables à la formation de racines chez ces variétés. Chez les accessions Ibadan, Okoyao, Agric comé, Kpètévikoutou et Ahouandjan, c'est plutôt le milieu MS+ANA qui présente la forte moyenne de racines formées avec des moyennes respectives de $5,2 \pm 0,6$ racines; $2,9 \pm 0,5$ racines; $4,3 \pm 0,3$ racines; $0,6 \pm 0,2$ racines et $5,0 \pm 0,8$ racines. Par contre, chez la

variété BEN 86052, les milieux MS+ANA ; MS+KIN, et les combinaisons ANA+BAP et ANA+KIN ont permis d'obtenir une forte moyenne de racines. Quant à la variété 92/0057, elle présente une meilleure performance sur les milieux MS+ANA et MS+BAP avec une moyenne de $2,5 \pm 0,3$ racines (Figure 3). Les résultats montrent l'existence d'une différence au moins significative au seuil de 5% entre les cinq milieux de cultures utilisés sur toutes les variétés/cultivars locaux excepté le cultivar local Kpètèvikou chez qui la différence entre les milieux est non significative au seuil de 5%.

Effet des différentes combinaisons hormonales sur la longueur des racines

Les résultats des effets des combinaisons hormonales sur la longueur des racines sont mentionnés sur la Figure 4. La réaction des cinq milieux n'est pas la même d'une variété/cultivar local à une autre. L'analyse de ces données montre que les accessions Agric Sazoué, Sèkandji, Agric comé et la variété BEN 86052 ont une longueur moyenne élevée de racines sur la combinaison ANA (0,1 mg/l) + KIN (0,2 mg/l) avec pour valeur respective $6 \pm 0,2$ cm ; $6,20 \pm 0,5$ cm ; $5,08 \pm 0,4$ cm et $4,15 \pm 0,3$ cm. Chez les accessions Ibadan, Kpètèvikoutou, Gbèzé et Ahouandjan c'est plutôt le milieu MS + ANA (0,1 mg/l) qui a permis d'obtenir une forte longueur moyenne de racines respectivement $5,0 \pm 0,8$ cm ; $1,85 \pm 0,6$ cm ; $2,77 \pm 0,3$ cm et $6,3 \pm 0,7$ cm. Chez l'accession Okoyao, la longueur moyenne maximale de racines est obtenue sur le milieu MS + KIN (0,2 mg/l) avec une moyenne de $5,2 \pm 0,4$ cm. La variété 92/0057 présente la même longueur moyenne maximale sur les milieux MS+ANA (0,1 mg/l) et MS + BAP (0,2 mg/l) à savoir $4,2 \pm 0,4$ cm. Les résultats montrent l'existence d'une différence au moins significative au seuil de 5% entre les cinq milieux de cultures

utilisés sur toutes les dix variétés/cultivars locaux.

Effet des différentes combinaisons hormonales sur la masse de matière fraîche

Les résultats des effets des combinaisons hormonales sur la masse de matière fraîche sont mentionnés sur la Figure 5. La réaction des cinq milieux n'est pas la même d'une variété/cultivar local à une autre. L'analyse de ces données montre que les accessions Okoyao, Sèkandji Agric Comé et la variété BEN 86052 ont donné la meilleure masse de matière fraîche sur le milieu MS + ANA (0,1 mg/l) + KIN (0,2 mg/l) avec des valeurs respectives de $42,51 \pm 3,4$ mg ; $132,97 \pm 8,9$ mg ; $94,87 \pm 10$ mg et $151,48 \pm 15,2$ mg. Les accessions Ibadan, Gbèzé et la variété 92/0057 présentent leur forte masse moyenne de matière fraîche sur le milieu MS+KIN (0,2 mg/l) respectivement $84,65 \pm 13,3$ mg ; $109,62 \pm 6,6$ mg et $68,65 \pm 4,5$ mg. Par contre, les accessions Agric Sazoué, et Ahouandjan ont eu une importante masse de matière fraîche sur la combinaison MS + ANA (0,1 mg/l) avec des moyennes respectives de $81,65 \pm 6,9$ mg ; $134,85 \pm 17,3$ mg. L'ensemble des régulateurs qui constituent l'objet de notre étude, c'est-à-dire l'ANA, la BAP, la kinétine et les différentes combinaisons ANA (0,1 mg/l) + BAP (0,2 mg/l) ; ANA (0,1 mg/l) + KIN (0,2 mg/l) ont un effet hautement significatif au seuil de 0,1% sur la masse moyenne de matière fraîche chez les variétés 92/0057 et BEN 86052 et les accessions Ahouandjan , Gbèzé, Agric Comé, Sékandji, Okoyao et Ibadan. Cet effet est aussi hautement significatif au seuil de 1% chez les accessions Kpètèvikoutou et Agric Sazoué.

Effet des combinaisons hormonales sur la masse de matière sèche

Les résultats des effets des combinaisons hormonales sur la masse de

matière sèche sont mentionnés dans la Figure 6. La réaction des cinq milieux n'est pas la même d'une variété/cultivar local à une autre. L'analyse de ces données montre que les accessions Ibadan, Gbèzé et la variété 92/0057 présentent leur plus forte masse de matière sèche sur le milieu MS ± 1mg ; $9,67 \pm 0,3$ mg ; $6,52 \pm 0,6$ mg. Par contre le milieu MS+ANA a permis une production importante de masse de matière sèche chez les accessions Ahouandjan avec une moyenne de $11,44 \pm 1,5$

mg (Figure 6). En effet, l'ensemble des régulateurs, c'est-à-dire l'ANA, la BAP, la kinétine et les combinaisons ANA + BAP, ANA + KIN ont un effet hautement significatif au seuil de 0,1% sur la masse moyenne de matière sèche chez toutes les variétés et accessions, exceptées les accessions Okoyao et Ibadan chez qui l'effet est peu significatif au seuil de 5%. Par contre, chez l'accession Agric Sazoué leur effet n'est hautement significatif qu'au seuil de 1%.

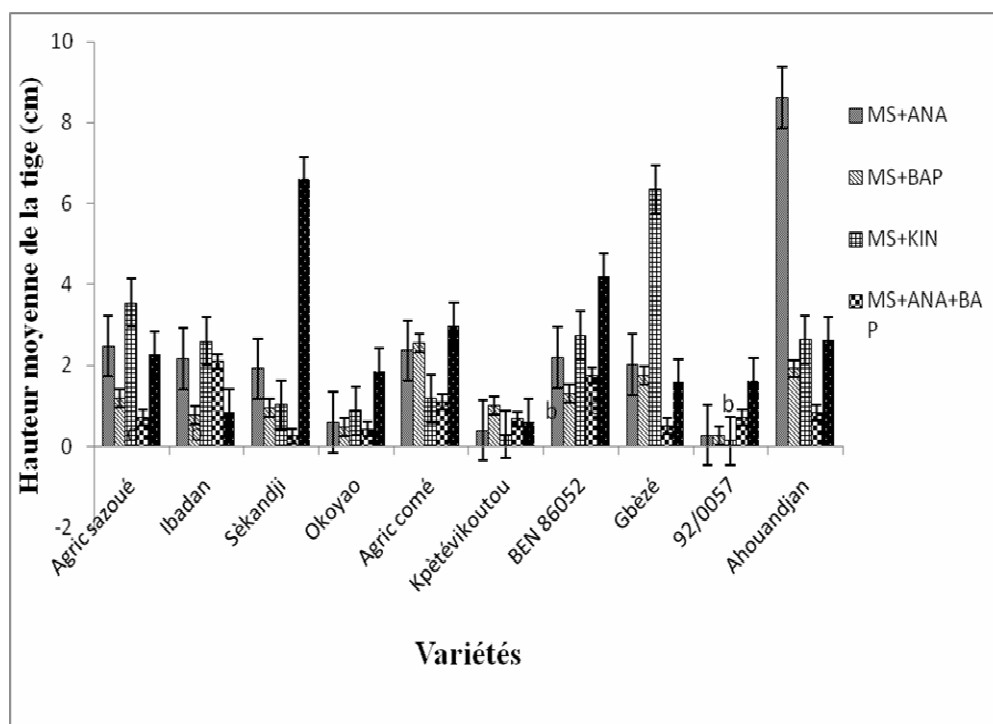


Figure 1: Effets des différentes combinaisons hormonales sur la hauteur des tiges des accessions et variétés de manioc.

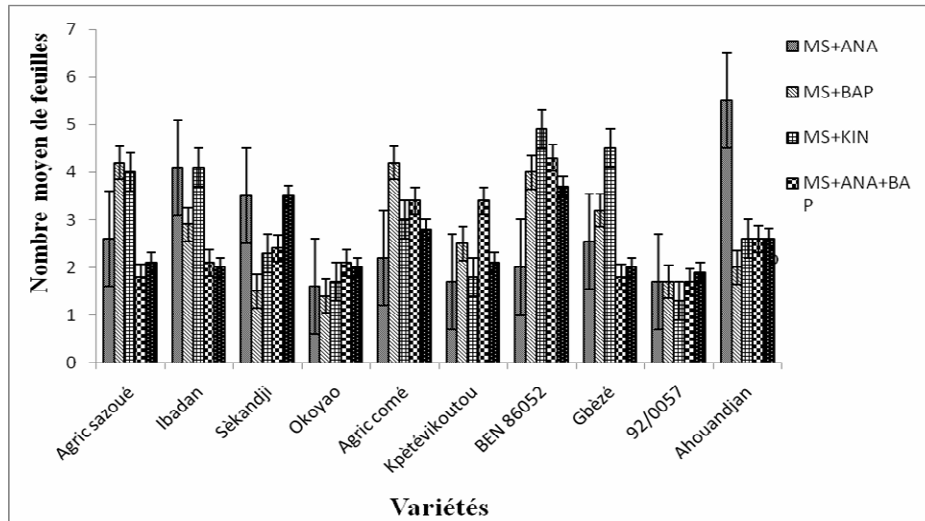


Figure 2: Effet des différentes combinaisons hormonales sur la phyllogénèse des accessions et variétés de manioc.

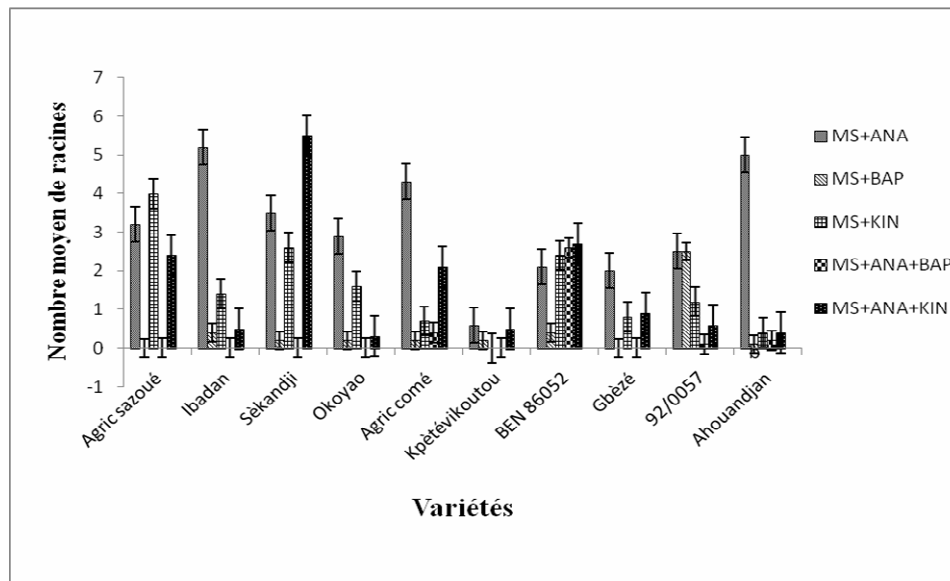


Figure 3: Effet des différentes combinaisons hormonales sur le nombre de racines formées des accessions et variétés de manioc.

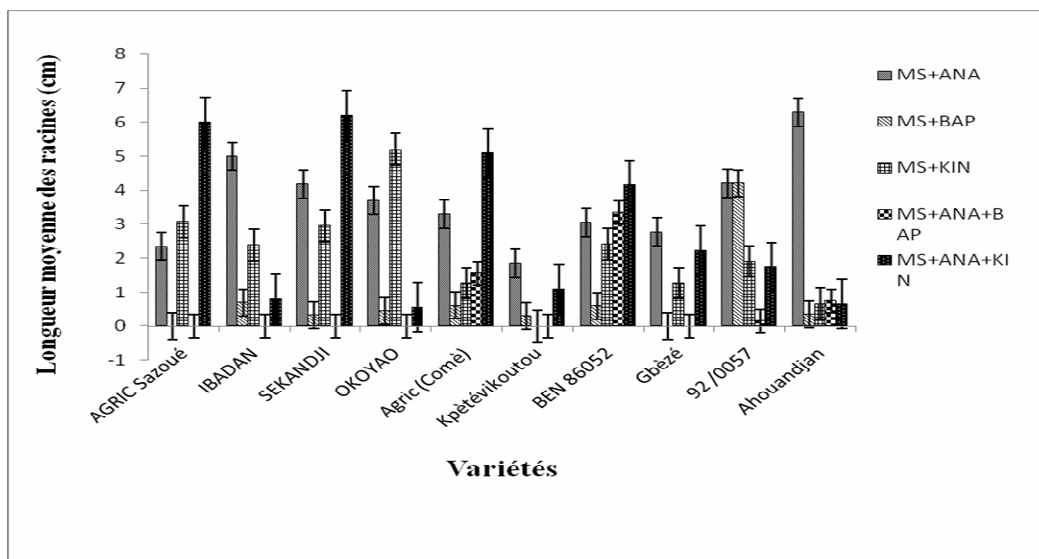


Figure 4: Effet des différentes combinaisons hormonales sur la longueur des racines des accessions et variétés de manioc.

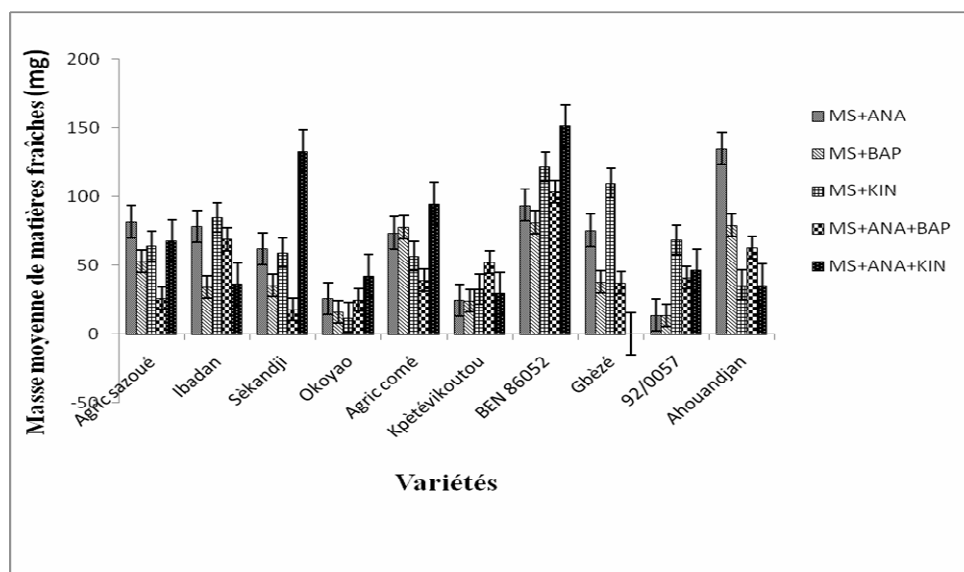


Figure 5: Effet des différentes combinaisons hormonales sur la masse de matière fraîche des accessions et variétés de manioc.

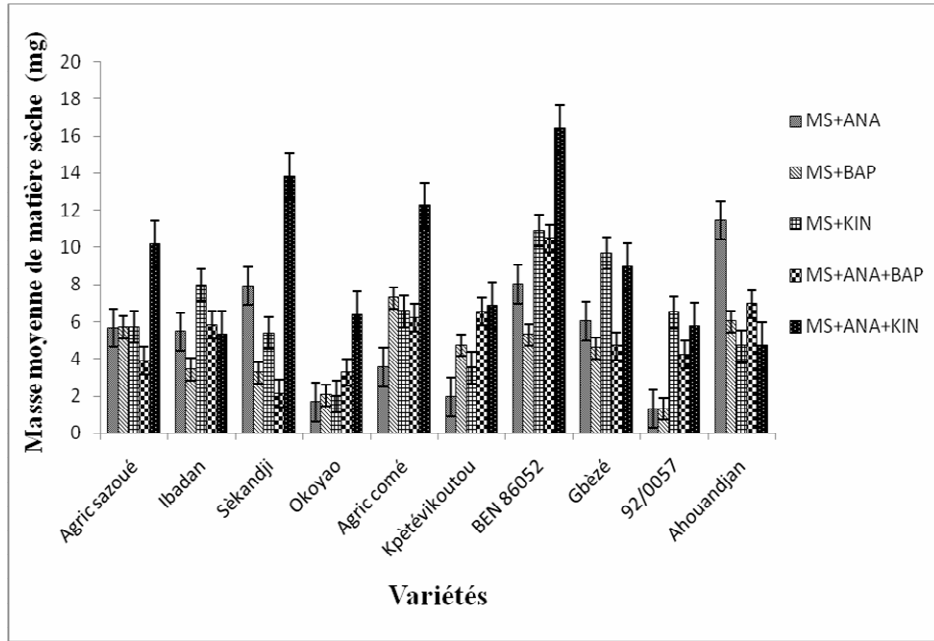


Figure 6: Effet des combinaisons hormonales sur la masse de matière sèche des accessions et variétés de manioc.



Figure 7: Photographie illustrant l'effet des régulateurs de croissance sur la hauteur des tiges des vitroplants de huit semaines de l'accession Sèkandji.



Figure 8 : Photographie illustrant l'effet des régulateurs de croissance sur la phyllogénèse des vitroplants de huit semaines du cultivar Ahouandjan.



Figure 9 : Photographie illustrant l'effet des régulateurs de croissance sur le développement des racines des vitroplants de huit semaines de l'accession Agric Comé.

DISCUSSION

La réponse des variétés/cultivars locaux de manioc par rapport aux paramètres étudiés est variable pour le même type de régulateur de croissance. Il existe alors une interaction entre les régulateurs de croissance et les génotypes étudiés. Aucun cal n'est régénéré sur les différentes combinaisons hormonales dont le rapport auxine sur kinétine est toujours différent de 1. Une différenciation en racine et tige dont le sens varie selon le type de combinaison est ainsi obtenue. Ce résultat confirme les travaux de Malaurie et al. (1995) selon lesquels les variations du rapport auxine sur cytokinine ont des effets précis sur le développement des explants et déterminent de ce fait le sens de l'organogénèse. En effet, un rapport élevé (plus d'auxine que de cytokinines) va engendrer la différenciation de racines et un rapport faible (plus de cytokinines que d'auxine) va engendrer la différenciation de tiges. A concentration égale, le développement est favorable à une callogenèse. Cependant, Ahanhanzo et al. (2008), en utilisant ANA (0,5 mg/l) + BAP (0,5 mg/l) d'une part et ANA (0,5 mg/l) + KIN (0,5 mg/l) d'autre part n'ont pas obtenu de cal sur trois variétés améliorées de manioc (RB 89509 ; BEN 86052 ; TMS 30572) initiées. Le type de cytokinine et sa combinaison à l'ANA a influencé la longueur des tiges. Les cultivars locaux Agric Sazoué, Ibadan, Agric Comè, Kpètèvikoutou, Okoyao et les variétés BEN 86052 et 92/0057 ont connu leur croissance maximale sur le milieu contenant la Kinétine (0,2 mg/l) et la combinaison ANA (0,1 mg/l) + KIN (0,2 mg/l). Cet effet d'allongement des tiges par la kinétine a été observé par Ndoumou et al. (2003) sur *Irvingia gabonensis* chez qui on note un accroissement de 3,1 cm à 3,5 cm à partir de 2 ou 3 mg/L de kinétine. Filiz (2009) a également obtenu une meilleure longueur des pousses d'*Amygdalus communis* L. avec 0,5 mg/L de kinétine. Cependant, Ondo et al. (2007) ont obtenu une réduction de la

croissance des tiges chez le complexe *Dioscorea cayenensis-Dioscorea rotundata* avec 2 mg/L de kinétine. L'effet de la kinétine sur la croissance de la tige varie donc selon la dose mais aussi selon l'espèce. La BAP (0,2 mg) utilisée seule ou en association avec l'ANA (0,1 mg) n'est pas favorable pour l'accroissement des variétés/cultivars locaux étudiés. Cela confirme les travaux réalisés par Filiz et al. (2009) sur *Amygdalus communis* L. où la BAP (1 mg/l) a été recommandée pour la prolifération et une meilleure croissance des pousses. Le cultivar Ahouandjan a eu une meilleure croissance en tige sur le milieu contenant ANA (0,1 mg/l).

Le milieu contenant l'ANA (0,1 mg/l) a permis d'avoir un nombre maximal de feuilles chez les accessions Ibadan, Sèkandji, Ahouandjan et la variété 92/0057. Par contre, ce milieu a donné de faible moyenne de feuilles formées chez Kpètèvikoutou et BEN 86052, il existe donc une interaction entre l'ANA (0,1 mg/l) et ces deux génotypes. La présence de BAP (0,2 mg/l) a donné un nombre important de feuilles chez les accessions Agric Sazoué, Agric Comè. Cependant, Joseph et al. (2012) travaillant sur des clones de l'IITA introduits par le programme et des clones de divers programmes nationaux (Togo, Benin, Congo Démocratique, etc...) ont fait remarquer que le milieu ne contenant que l'ANA (0,05 mg/l) a plus favorisé la formation des feuilles que le milieu contenant la combinaison ANA(0,01 mg/l) + BAP(0,05 mg/l). La forte dose de BAP (0,2 mg/L) utilisée dans nos expérimentations contre 0,05 mg/L serait à la base de la forte phyllogénèse observée. Chez BEN 86052 et Gbèzé, c'est plutôt la kinétine (0,2 mg/L) qui a permis d'obtenir la meilleure phyllogénèse. Les cultivars Agric Sazoué, Ibadan et Gbèzé ont connu une réduction de feuilles si l'ANA est combinée à une cytokinine : kinétine (0,1 mg/l) ou BAP (0,2 mg/l). Cependant, une étude réalisée par Ahanhanzo et al. (2008) sur les variétés RB

89509, BEN 86052 et TMS 30572 de la même espèce a fait remarquer que l'addition d'une cytokinine (kinétine ou BAP) : 0,5 mg/L à l'ANA (0,5 mg/l) s'est accompagnée d'une augmentation du nombre de feuilles. Le nombre de racines comptées par explant ainsi que leur allongement ont varié considérablement en fonction des différentes combinaisons hormonales et des génotypes mis en culture. L'ANA (0,1 mg/l) et la kinétine (0,2 mg/l) utilisés seuls ou combinés exercent une action positive sur le nombre et la longueur des racines chez les cultivars Agric Sazoué, Sèkandji, Agric Comè, Gbèzé et la variété BEN 86052. La combinaison ANA (0,1 mg/l) + KIN (0,2 mg/l) comparativement à celle de ANA (0,1 mg/l) + BAP (0,2 mg/l) a plus favorisé la rhizogenèse chez le cultivar Sèkandji. Pour notre travail, la kinétine (0,2 mg/l) favorise une meilleure rhizogenèse contrairement à la BAP (0,2 mg/l). Ce qui confirme les résultats de Malaurie et al. (1995), Miller et Skoog (1957), James et Newton (1977), Navatel (1979) Ammirato (1984), Bennett et al. (1986), Saleil et al. (1990), Romano et al. (1992), Bougacha (1992) Cesty Borda Yopez et al. (2001), Kbiach (2002). Ndoumou et al. (2003), Ahanhanzo et al. (2008), qui ont montré que la kinétine induit plus de racines que la BAP. Cet effet d'inhibition du développement racinaire exercé par la combinaison ANA (0,1 mg/L) + BAP (0,2 mg/L) a été remarqué sur les variétés RB 89509 et TMS 30572 de manioc par Ahanhanzo et al. (2008). Les Ahouandjan et Agric Comé ont présenté de faible longueur de racines sur le milieu contenant la kinétine. En utilisant 2 mg/l de kinétine, Ondo et al. (2007) ont également remarqué une réduction de la longueur des racines chez le complexe *Dioscorea cayenensis-Dioscorea rotundata*. Le milieu contenant l'ANA (0,1 mg/l) présente une importante masse de matière (fraîche et sèche) pour les cultivars Agric Sazoué, Ibadan et Ahouandjan. Par contre la combinaison ANA

(0,1 mg/l) + KIN (0,2 mg/l) a permis d'obtenir la plus importante masse de matière (fraîche et sèche) chez les cultivars Sèkandji, Okoyao, Agric Comè et la variété BEN 86052. De même, la combinaison ANA (0,1 mg/l) + BAP (0,2 mg/l) a permis d'obtenir une importante masse de matières (fraîche et sèche) avec l'accession Kpètévikoutou. Cette augmentation de matière en présence des cytokinines (Kinétine et BAP) met en évidence leur rôle dans la division cellulaire. Ces résultats confirment ceux obtenus par Saleil et al. (1990) qui ont constaté que la nature et la dose de la cytokinine avaient déterminé des variations de croissance significative sur certains génotypes de *Dioscorea sp.* De même, les travaux réalisés par Ahanhanzo et al. (2010) sur différents génotypes d'ignames ont aussi confirmé que la réponse des microboutures à l'action des cytokinines dépend du génotype de la plante.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le Programme d'Appui pour le Développement Rural (PADER) dont les activités dans le cadre du don de l'UNION EUROPEENNE ont permis d'équiper le Laboratoire de Génétique et des Biotechnologies de l'Université d'Abomey-Calavi en importants matériels en vu du renforcement de sa capacité de production des vitroplants de manioc. Aussi, voudrions nous témoigner des soutiens du Centre Béninois de la Recherche Scientifique et Technique (CBRST) notamment ses contributions pour l'exécution des activités de recherches menées dans notre laboratoire.

REFERENCES

Ahanhanzo C, Agbangla C, Agassounon DTM, Cacaï G, Dramane K. 2008. Etude comparative de l'influence des régulateurs de croissance sur la morphogénèse (*in vitro*) de quelques variétés de *Manihot esculenta* Crantz

- (manioc-euphorbiaceae) du Bénin. *Rev. CAMES - Série A*, **07**: 47-52.
- Ahanhanzo C, Gandonou Ch, Agbidinokoun A, Dansi A, Agbangla C. 2010. Effect of two cytokinins in combination with acetic acide α - naphthalene on yams (*Dioscorea spp.*) genotypes response to *in vitro* morphogenesis. *African Journal of Biotechnology*, **9**(51): 8837- 8843.
- Ammirato PV. 1976. Hormonal control of tuber formation in cultured axillary buds of *Dioscorea bulbifera* and *Dioscorea alata*. *Plant Physiology*, **57**(5): 66.
- Ammirato PV. 1984. Yams. In *Handbook of Plant Cell Culture* (vol. 3), Ammirato PV, Evans DA, Sharp WR, Yamada Y (eds). Crop Species Macmillan: New York; 327-354.
- Bennett LK, Davies FTJ. 1986. *In vitro* propagation of *Quercus shumardii* seedlings. *Hort Science*, **21**(4): 1045-1047.
- Engelmann F. 1991. *In vitro* conservation of tropical plant germoplasm: a review. *Euphytica*, **57**: 227-243.
- FAO. 2008. Système Mondial d'Information et d'alerte rapide sur l'alimentation et l'agriculture de la FAO. Programme Alimentaire Mondial – Rapport Spécial. Marchés, Prix, situation Alimentaire et perspectives au Bénin, au Niger et au Nigéria.
- Filiz Akba, Çi_dem I_kalan, Süreyya Namlı, Bekir Erol Ak. 2009. Effect of plant growth regulators on *in vitro* shoot multiplication of *Amygdalus communis* L. cv. Yaltsinki. *African Journal of Biotechnology*, **8**(22): 6168-6174.
- Gandonou CH, Errabii T, Abrinini J, Iidaomar M, Chibi FS, Senhaji N. 2005. Effect of genotype on callus induction and plant regeneration from leaf explants of sugarcane (*Saccharum sp.*). *African Journal of Biotechnology*, **4**(11): 1250-1255.
- George EF. 1993a. Plant propagation by tissue culture (Part 1). In *The Technology* (2nd edn). Exegetics Ltd.: Edington.
- George EF. 1993b. Plant propagation by tissue culture (Part 2). In *Practice* (2nd edn). Exegetics Ltd.: Edington.
- James DJ, Newton B. 1977. Auxin/cytokinin interactions in the *in vitro* micropropagation of strawberry plants. *Acta Hort.* (78 Tissue culture for horticultural purposes), 321-331 P.
- Kbiach ML, Lamart A, Abdali A, Badoc A. 2002. Culture *in vitro* des bourgeons axillaires de chêne-liège (*Quercus suber*). *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **141**: 73-78.
- Mabanza J, Jonard R. 1981. La multiplication des clones de manioc (*Manihot esculenta* Crantz) à partir d'apex isolés *in vitro*. *C.R. Acad. Sci. Paris*, **292**: 839-842.
- Mabanza J, Mingui JM. 1998a. Amélioration des cultivars africains de manioc. In Proceedings of the 6th ISTRC-AB symposium, Lilongwe, Malawi 22-28 octobre 1995 (Akoroda and Ekanayake, eds.), 266-269.
- Mabanza J, Mingui JM. 1998b. Les cultivars africains de manioc. In Proceedings of the 6th ISTRC-AB symposium, Akoroda, Ekanayake (eds). Lilongwe, Malawi 22-28 octobre 1995, p. 270.
- MEPN. 2008. L'adaptation aux changements climatiques au Sud-Bénin (Ressource électronique). Publication de MA BAUDOIN . 2010. 81 pages. Disponible sur WWW.geoecotropbe/uploads/publications/pub_341_14.pdf (consulté en juillet 2011).
- Mingui JM V, Bama J, Mabanza J. 1992. Les cultivars de manioc au Congo. In Complexes d'espèces, flux de gènes et ressources génétiques des plantes. Actes du Colloque International. CNRS Paris 8-10 janvier, 185-192 p.
- Miller CO, Skoog F. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation

- in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **11**: 118-130.
- Ng SY. 1990. Culture des tissus. In *Le manioc en Afrique tropical : un manuel de référence*. IITA & UNICEF, p. 51-61.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tissue culture. *Physiol. Plantarum*, **15**: 473-497.
- Ndoumou DO, Fotso, Oumar, Mbouna. 2004. Propagation d'*Irvingia gabonensis* par microbouturage *in vitro*. *Fruits*, **59**: 31-38.
- Nweke F. 1996. Processing Potential for Cassava Production Growth in Sub-Saharan Africa. COSCA Working Paper No. 11. Collaborative Study of Cassava in Africa, IITA Ibadan, Nigeria.
- Ondo Ovono P, Kevers C, Dommes J. 2007. Axillary proliferation and tuberisation of *Dioscorea cayenensis-D. rotundata* complex. *Plant Cell. Tiss. Organ Cult.*, **91**: 107-114.
- Romano A, Noronha C, Martins-Loução MA. 1992. Influence of growth regulators on shoot proliferation in *Quercus suber* L. *Ann. Bot.*, **70**(6): 531-536.
- Saleil V, Degras L, Jonard R. 1990. Obtention des plantes indemnes du virus de la mosaïque de l'igname (YMV) par "culture *in vitro*" des apex chez l'igname américaine *Dioscorea trifida* L. *Elsevier/INRA*, **10**: 605-615.
- Yaninek JS, Braima DJ, Wydra K. 1997. Cassava pest and disease diagnostic survey protocols guide to survey protocols and sampling procedures dans Actualisation de la banque de données sur le manioc au Bénin, p. 32.
- Zuccherelli G. 1979. Tecniche di propagazione industriale delle piantine di fragola da coltura *in vitro* per il vivaio. In *Sansavini (S.) Societa Orticola Italiane Incontro Nazionale Sulla Coltura della Fragola*. S.O.I.: Ferrara; 169-178p.