

50376
1974
142

N° d'ordre : 475

50376
1974
142

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

THESE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE

par

A. Edouard CAPO - CHICHI

CULTURE IN VITRO DES TISSUS DE MANIOC
(MANIHOT ESCULENTA CRANTZ)



Membres du Jury : MM.

R. BOURIQUET

Président

M. BODARD

Examineur

J. L. BONNEMAIN

Examineur

Soutenu le 8 Juillet 1974

A ma soeur Clémentine,

*dont l'aide et les conseils ont été
pour moi, tout au long de mes études,
un rappel continu des préceptes de
notre feu père et une source
intarissable de courage et de
persévérance .*

A V A N T - P R O P O S

- - - - -

Ce travail a été réalisé dans le 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, pour la confiance totale qu'il m'a témoignée.

L'Office de Recherches Scientifiques et Techniques d'Outre-Mer, après avoir accepté ma candidature à sa Section Botanique et Biologie Végétale, a bien voulu me détacher à Lille et m'autoriser à y poursuivre mes travaux sur le Manioc. Je dois cette mesure exceptionnelle aux membres de la Commission Scientifique et je les en remercie sincèrement.

Que Monsieur le Professeur BODARD me permette de lui redire ma reconnaissance. C'est à son instigation qu'après ma maîtrise, j'ai choisi d'étudier une plante de mon pays. Sa grande expérience du milieu tropical m'a été profitable. Je lui sais gré de l'intérêt qu'il porte à cette Thèse en acceptant de l'examiner.

Je remercie Monsieur le Professeur BONNEMAIN de m'avoir toujours reçu cordialement les nombreuses fois que je l'ai consulté. Je suis sensible à l'honneur qu'il me fait en participant à mon Jury de Thèse.

Ma dette de reconnaissance est très lourde envers Monsieur Patrice T. HOUECANDE, Chef de Cellule de Recherches à l'Institut de Recherches Agronomiques

Tropicales, centre de Niaouli (Dahomey). C'est grâce à son obligeance, que j'ai pu réunir les boutures de Manioc nécessaires à mes expériences.

Je ne saurais oublier mes compatriotes, qui, dans cette Université, ont su créer autour de moi une ambiance fraternelle, mes camarades de l'Institut Agricole, mes collègues et le personnel du Laboratoire de Physiologie Végétale, du Laboratoire d'Algologie, Monsieur et Madame DUBOIS, Messieurs RAMBOUR et GODIN, Mademoiselle TAHON, auprès de qui j'ai trouvé une aide désintéressée et un soutien moral constant.

SOMMAIRE

INTRODUCTION Page 1

MATERIEL ET TECHNIQUES Page 3

I LE MANIOC : ASPECTS BOTANIQUE ET IMPORTANCE AGRONOMIQUE Page 3

1°) Systematique du Manioc

2°) Origine

3°) Description

4°) Culture

5°) Etude anatomique

6°) Utilisation des différentes parties de la plante

II TECHNIQUES

1°) Culture en serre

2°) Culture "in vitro"

3°) Techniques histologiques

RESULTATS Page 32

I ETUDE DE LA RHIZOGENESE DE FRAGMENTS DE TIGE DE MANIOC Page 33

A - CULTURE DES ENTRENOEUDS Page 33

1°) Action des sucres

a) Mise en évidence de la nécessité d'un sucre

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

2°) Action des substances de croissance

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

b) Action d'autres facteurs phytohormonaux

3°) Facteurs climatiques

- a) Mise en évidence de l'influence de la température
- b) Action de températures alternées
- c) Influence de la lumière

B - CULTURE DES NOEUDS Page 49

1°) Action des facteurs trophiques sur la croissance des noeuds

a) Les sucres

α /mise en évidence du rôle du sucre

β /influence de la nature du sucre et de sa concentration

b) Les éléments minéraux et organiques

α /éléments minéraux des solutions de Heller ou de Murashige et Skoog

β /éléments organiques du milieu de Murashige et Skoog

γ /éléments minéraux et organiques du milieu de Murashige et Skoog

2°) Action des substances de croissance

3°) Facteurs climatiques

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

II ESSAIS DE TUBERISATION "IN VITRO" Page 65

A - CONCEPTIONS ANCIENNES ET ACTUELLES DU MECANISME PHYSIOLOGIQUE DE LA TUBERISATION Page 65

1°) Théorie symbiotique et Théorie osmotique

2°) Rôle des facteurs climatiques dans la tubérisation

3°) Théorie hormonale

B - ESSAIS D'INDUCTION DE LA TUBERISATION Page 67

1°) Inhibition due aux conditions climatiques

a) Inhibition photopériodique

b) Inhibition thermopériodique

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

a) Inhibition osmotique

b) Inhibition par des retardateurs de croissance

c) Inhibition auxinique

C O N C L U S I O N Page 81

B I B L I O G R A P H I E Page 84

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. La culture in vitro de la plante a fourni jusqu'à présent très peu de résultats.

Il nous a donc 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 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 rhizogenèse 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.



Le Manioc dans son milieu naturel



Le Manioc cultivé en serre



Figure 1 : Manihot esculenta Crantz

MATERIEL

ET

TECHNIQUES

I LE MANIOC : ASPECTS BOTANQUES ET IMPORTANCE AGRONOMIQUE

=====

1°) Systématique du Manioc :

Le Manioc est une Phanérogame, Angiosperme, Dicotylédone. Il fait partie des groupements systématiques suivants : embranchement des Cormophytes, sous-embranchement des Angiospermes, classe des Dicotylédones, ordre des Tricoques, tribu des Crotonoïdées, famille des Euphorbiacées et genre Manihot. Pour bien le situer du point de vue botanique, il est utile de rappeler ses caractéristiques importantes.

L'ordre des Tricoques comprend essentiellement la famille des Euphorbiacées, famille réduite à quelques genres dans les régions tempérées mais très riche et jouant un rôle prépondérant en milieu tropical ; les Crotonoïdées possèdent des laticifères articulés ou non, une inflorescence en cyathium, un seul ovule par loge ; le genre Manihot se caractérise par les propriétés suivantes : fleurs monoïques apétales, calice de cinq sépales généralement pétaloïdes, étamines disposées en deux verticilles, anthères à déhiscence longitudinale, ovaire triloculaire et un fruit qui est une capsule tricoque.

Les espèces du genre Manihot sont nombreuses, mais les principales sont : Manihot esculenta Crantz, Manihot glaziovii Muell., Manihot melanobasis Muell., Manihot saxicola Lanj., Manihot pringlei S. Wats ...etc.

Les premiers botanistes qui ont étudié le Manioc avaient signalé l'existence d'un grand nombre d'espèces mais aujourd'hui, de multiples synonymies ont été relevées. Par exemple, le caractère cyanogénétique avait été un critère de classification : Pohl, en 1827, 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 toutes ces épithètes comme synonymes de celle proposée par von Crantz (1766) pour toutes les espèces cultivées. Nous avons, en conséquence, préféré le terme Manihot esculenta Crantz à Manihot utilissima Pohl.

2°) Origine :

Les avis sont très partagés sur l'origine du Manioc mais, de nos jours, la plupart des spécialistes s'accordent à admettre que la patrie de cette plante est le Nord-Est du Brésil. Du reste, dans cette région, plusieurs légendes foisonnent dont celle-ci, très connue, rapportée par le "Diccionario folklórico argentino" cité par Henain A.E. et Cenoz H.M. (1971) : la fille d'un chef indien mit au monde une enfant, Mani, qui mourut en bas âge et fut enterrée au pied d'un grand arbre ; peu de temps après, sur la tombe, on vit apparaître une plante inconnue jusqu'alors, dont les racines donnèrent un tubercule excellent. Pour cette raison, on appela la plante Mani-so-ho qui signifie chair de Mani, nom qui par transformation serait devenu Maniho ou Mandio d'où sont tirés les termes Maniôot et Mandioca.

Au XVI^e siècle, lors de la colonisation de la côte brésilienne par les Portugais, les immigrants favorisèrent la culture du Manioc dont l'introduction en Afrique serait due au trafic d'esclaves. Toutes ces hypothèses restent à confirmer. Des études paléobotaniques en cours dans certaines universités sud-américaines feront peut-être la lumière sur le problème de l'origine du Manioc.

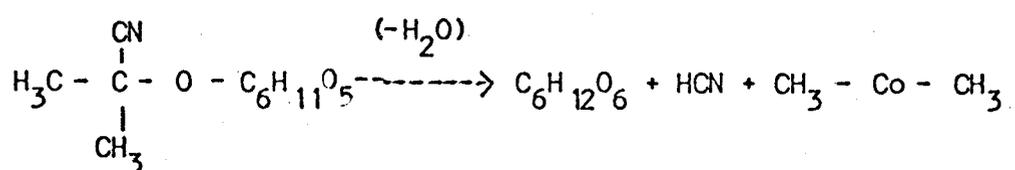
3°) Description :

Le Manioc est une plante arbustive pérenne de deux à quatre mètres de haut dans les cultures ; il atteint facilement cinq ou six mètres si on ne le récolte pas. Son port peut être en boule, rampant, étalé ou dressé. D'une manière générale, la tige a tendance à se ramifier lorsque les conditions de culture sont meilleures.

La tige et les feuilles (fig. 2a et b) La tige est noueuse et remplie de moelle ; elle porte des feuilles alternes, caduques, de vie assez courte, généralement pétiolées, palmipartites ou palmiséquées, 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.

Les racines et les tubercules (fig. 2c)

Les boutures émettent, au début, un grand nombre de racines plus ou moins traçantes. Celles-ci s'enfoncent rapidement dans le sol puis se gorgent de réserves à partir du collet, donnant de longs et gros tubercules fasciculés. Un pied peut en produire de trois à cinq kilogrammes. Ces tubercules, comme le montre le Tableau 1, 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 1880, 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 plus de 200 µg par gramme de matière fraîche, il est amer ; s'il en renferme moins de 50 µg par gramme de matière fraîche, il est doux. Ajoutons que selon Adriaens (L.) 1946 une dose de 1,4 mg de HCN 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 cortex et la zone axiale sont neuf fois plus riches que les autres régions et cela, les paysans autochtones le savent empiriquement puisqu'ils débarassent, avant la cuisson, les tubercules de ces deux parties riches en toxique. Les méthodes de préparation du Manioc (division, pulpage, rouissage etc...) éliminent par surcroît une grande partie de la manihotoxine.

Les organes reproducteurs - Le fruit (fig. 3)

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 régulier, composé de 5 sépales libres et pétaloïdes, caduques après la fécondation. L'ovaire, très développé, est constitué de 3 carpelles. Il est trilobulaire et à placentation axiale. La fleur femelle contient des staminodes qui sont des étamines réduites à leur filet (fig. 3a).

La fleur mâle est plus petite que la fleur femelle ; son calice est formé de 5 sépales pétaloïdes soudés à la base. L'androcée comprend deux verticilles de 5 étamines (fig. 3b).

Dans la même inflorescence, la maturation des fleurs femelles précède de quelques jours celle des fleurs mâles : la fécondation est, par conséquent, une dichogamie et le Manioc est essentiellement allogame.

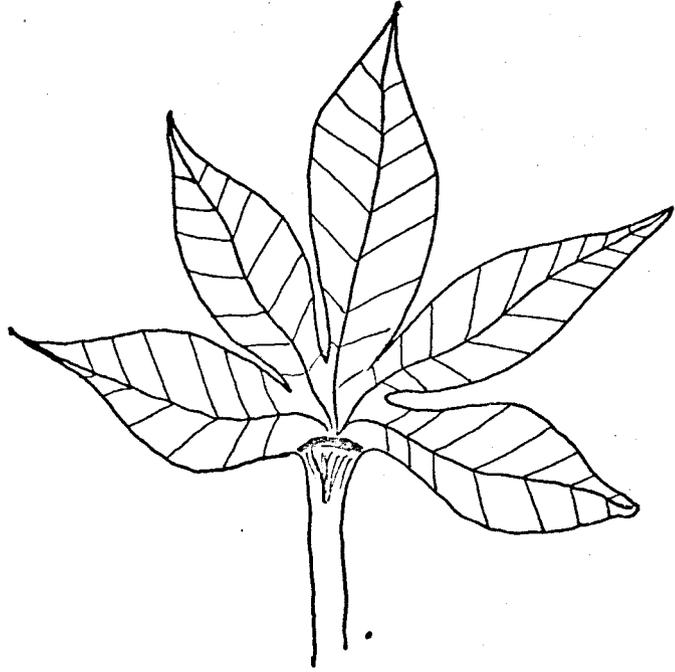
Le fruit est une capsule qui arrive à maturité au bout de cinq mois environ, éclate et propulse à une dizaine de mètres les 3 graines qu'il renferme. Ces graines mettent plusieurs mois pour germer (fig. 3c).

4°) Culture :

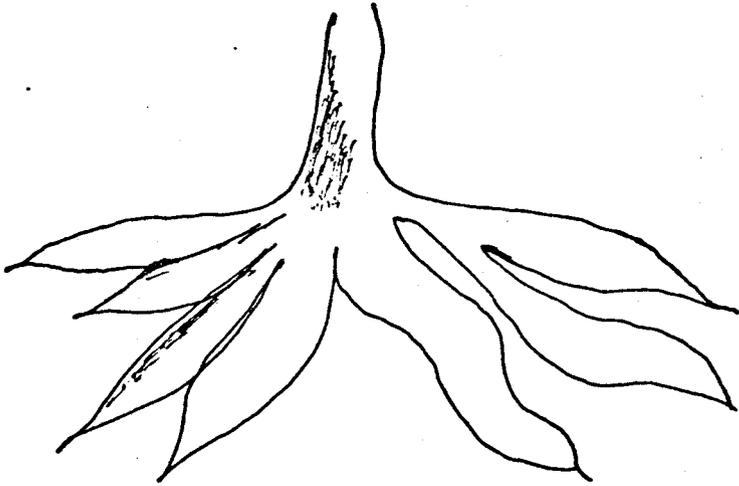
Le Manioc a une aire de culture pantropicale, c'est-à-dire qu'il se développe de préférence entre le Tropique du Cancer et le 30ème degré de latitude Sud. Les principaux centres de culture sont le Brésil, l'Indonésie, la Malaisie, les Philippines, la Thaïlande, le Ceylan, Madagascar et différentes régions d'Afrique où il occupe une place analogue à celle de la Pomme de Terre dans certains pays de la zone tempérée. En Afrique, ce sont surtout les variétés douces qui sont cultivées et les méthodes traditionnelles de culture ne diffèrent guère d'un endroit à l'autre : le sol est, la plupart du temps, préparé sommairement. La multiplication de la plante se fait uniquement par bouturage. Pour bouturer, on choisit des fragments de 20 à 30 cm de long dans la partie moyenne des tiges bien aoûtées, saines et vigoureuses ; on les enfonce aux $\frac{3}{4}$ environ dans la terre, horizontalement ou obliquement en prenant soin de laisser hors du sol, 2 à 4 yeux. Cette opération s'effectue généralement au début de la saison des pluies, période qui correspond, dans nos régions, à la reprise de l'activité végétative. 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. Le développement de la plante s'effectue en plusieurs phases : la phase de la reprise au cours de laquelle les racines apparaissent au niveau des noeuds recouverts par le sol, celle du développement foliaire, puis celle d'accumulation de réserves au terme de laquelle s'effectue la récolte ; cette récolte se fait dès le 8ème ou 10ème mois, mais c'est après 16 ou 18 mois que l'on obtient



a. bouture



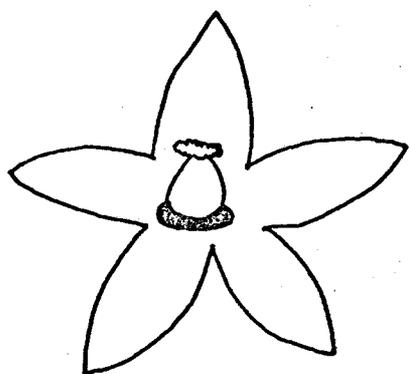
b. feuille



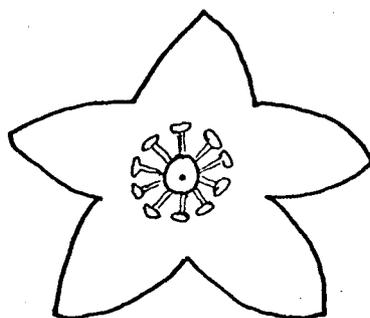
c. tubercules

Figure 2

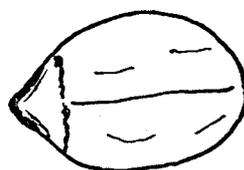
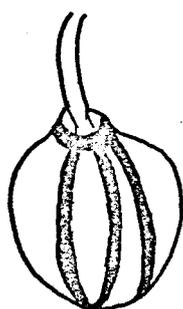




a. fleur femelle



b. fleur mâle



fruit et graine

Figure 3



TABLEAU I : Composition des tubercules de cinq plantes féculentes (par 100 g de racines fraîches)

Extrait de : *Nutrition et fumure des plantes tropicales à tubercules* par Jacoby (T.), 1965.

	UNITE	POMME DE TERRE	PATATE DOUCE	MANIOC	IGNAMES	TARO
Valeur énergétique	Calories	82	117	146	105	104
Eau	g	78	70	62,5	72,4	72,5
Hydrates de carbone	g	18,9	27,3	34,7	24,1	24,2
Protéines	g	2,1	1,3	1,2	2,4	1,9
Lipides	g	0,1	0,4	0,3	0,2	0,2
Calcium	mg	8	34	33	22	23
Fer	mg	0,7	1,0	0,7	0,8	1,1
Vitamine A	Unités intern.	traces	500	traces	traces	traces
Aneurine (vit. B ₁)	mg	0,10	0,10	0,06	0,09	0,15
Riboflavine (vit. B ₂)	mg	0,03	0,05	0,03	0,03	0,03
Niacine (acide nicotinique)	mg	1,4	0,6	0,6	0,5	0,9
Vitamine C	mg	10	23	36	10	5



dans les racines la plus forte proportion de féculs. Les tubercules doivent être utilisés aussitôt après l'arrachage car ils se conservent difficilement plus de 4 jours hors du sol ; le paysan peut donc choisir la période de récolte et les racines en terre sont disponibles selon les besoins. L'optimum de rendement est obtenu à une température comprise entre 26 et 32°C. La culture du Manioc nécessite des précipitations abondantes, un ensoleillement suffisant et de fortes humidités, mais l'humidité constante est défavorable.

En résumé, le Manioc est une plante peu exigeante qui présente de nombreux et précieux avantages, ce qui justifie l'engouement manifesté à son égard.

5°) Etude anatomique :

a) La racine : (planches I et II)

Une coupe transversale de jeune racine montre, de la périphérie vers l'intérieur :

- des formations secondaires subéro - phellodermiques avec un suber bien développé ;
- un parenchyme cortical avec des cristaux d'oxalate de calcium maclés en oursins et beaucoup de grains d'amidon ;
- des formations libéro-ligneuses secondaires continues (pachyte continu) qui occupent toute la région interne de la racine ; la moelle est absente.

b) Le tubercule : (planches III et IV)

Le tubercule de Manioc a une structure histologique comprenant :

- des formations secondaires subéro- phellodermiques ;
- un parenchyme cortical amylofère ;
- un phloème secondaire peu important

- un parenchyme ligneux secondaire, cellulosique, très riche en amidon, qui occupe pratiquement les 5/6 de la racine. On y distingue de petits vaisseaux entourés de cellules lignifiées. La tubérisation provient du développement de ce tissu.

- La moelle est absente et le centre de la racine est occupé par du xylème secondaire.

c) La tige : (planches V, VI)

Une coupe transversale de jeune tige montre :

- un épiderme avec cuticule dont certaines cellules contiennent des cristaux d'oxalate de calcium ;

- un parenchyme cortical constitué de 4 à 5 assises de cellules avec des cristaux d'oxalate de calcium ;

- un collenchyme continu écrasé dont les parois sont épaissies ;

- un parenchyme cortical avec des cristaux d'oxalate de calcium ;

- un sclérenchyme typique, continu, avec des cellules isodiamétriques bien lignifiées ;

- un parenchyme cortical plus important que les précédents, avec des cristaux d'oxalate ; on y distingue des laticifères dont la lumière se colore en brun lorsque la coupe est traitée à l'eau iodée, au perchlorure de fer ou au bichromate de potassium ;

- des formations secondaires libéro-ligneuses en 2 anneaux concentriques ;

- 5 faisceaux de bois primaire, entre les vaisseaux desquels se trouve un parenchyme vasculaire ligneux peu lignifié ;

- une moelle importante ;

A la périphérie de la moelle et en face du protoxylème, il y a un autre parenchyme constitué de petites cellules complètement cellulósiques.

Sur une tige plus âgée, une assise subéro-phellodermique fonctionne entre l'épiderme et le premier parenchyme cortical.

d) La feuille :

α) Le pétiole : (planches VII et VIII)

La structure du pétiole est comparable à celle de la tige : en effet, la section de cet organe est circulaire et à symétrie axiale.

La coupe transversale montre la même structure d'ensemble que dans une tige ; mais, dans le cylindre central, on rencontre 7 ou 8 faisceaux libéro-ligneux superposés, formant un cercle complet.

β) Le limbe (planches IX et X)

Sur une coupe transversale pratiquée dans la feuille au niveau de la nervure principale, on observe :

- un épiderme avec une cuticule et parfois des poils ;
- un mésophylle qui comprend vers la face supérieure, un tissu palissadique formé de cellules allongées perpendiculairement à l'épiderme et contenant de nombreux chloroplastes, vers la face inférieure, un tissu lacuneux constitué de cellules irrégulières ;
- au niveau de la nervure, sous les 2 épidermes, on note la présence d'un parenchyme fortement collenchymateux ;
- le système vasculaire comprend 2 faisceaux libéro-ligneux, un grand disposé en arc de cercle, et un petit, d'orientation inverse.

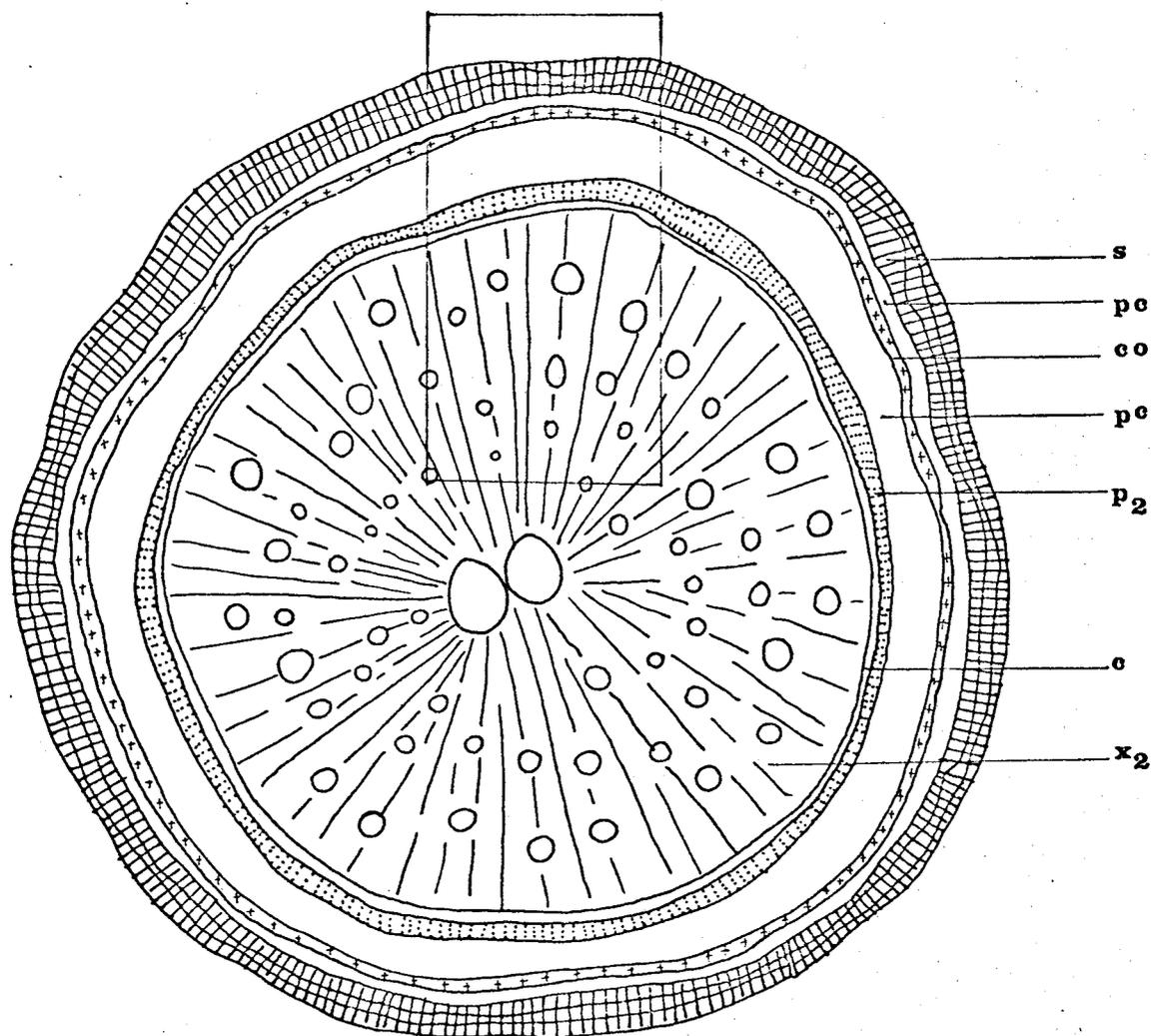
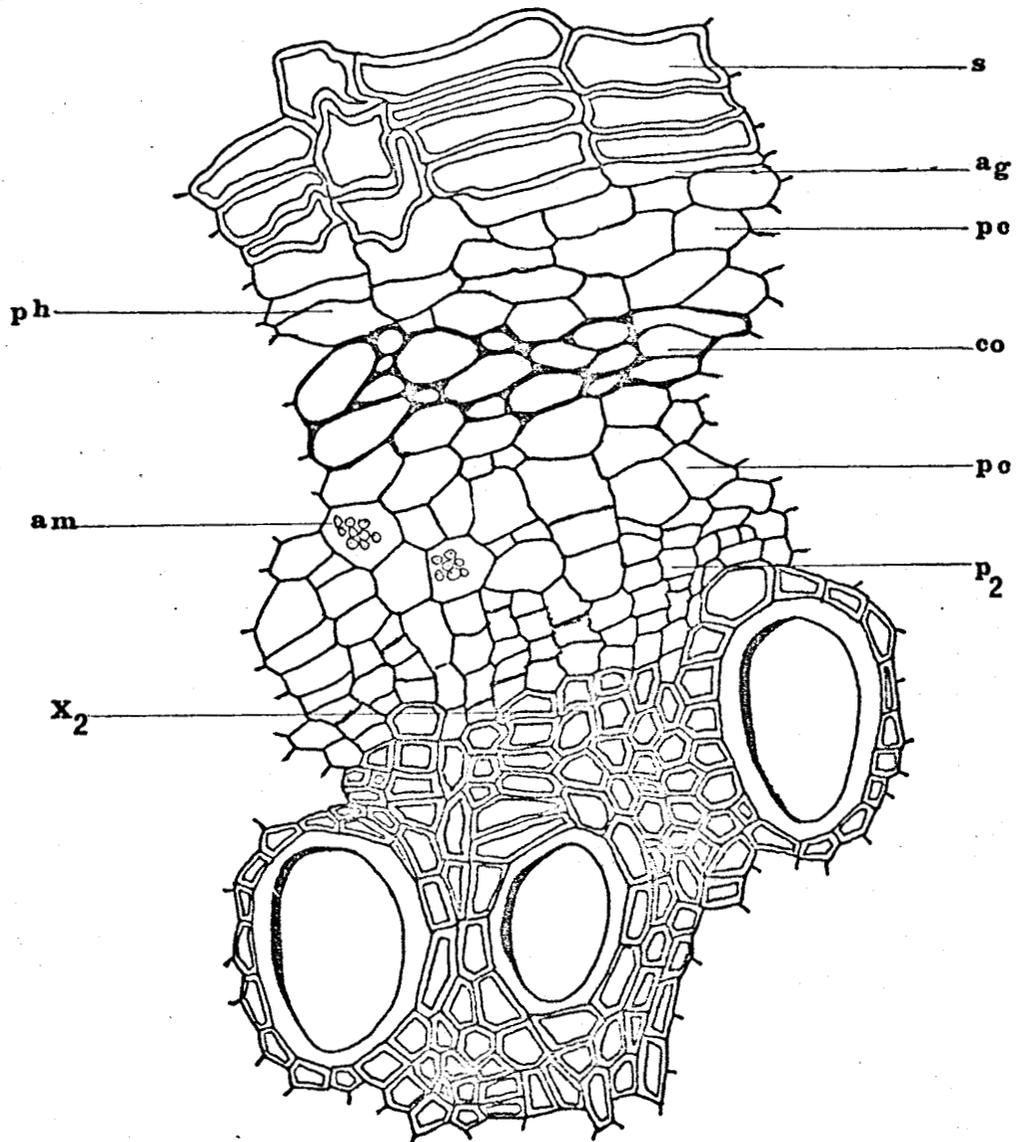


PLANCHE I : Coupe transversale de jeune racine
de Manioc.

- pc : parenchyme cortical
 co : collenchyme
 P₂ : phloème secondaire
 X₂ : xylème secondaire
 s : suber



100 μm

PLANCHE II : Coupe transversale de jeune racine de Manioc.

ag : assise génératrice subéro-phellodermique

ph : phelloderme

am : grain d'amidon



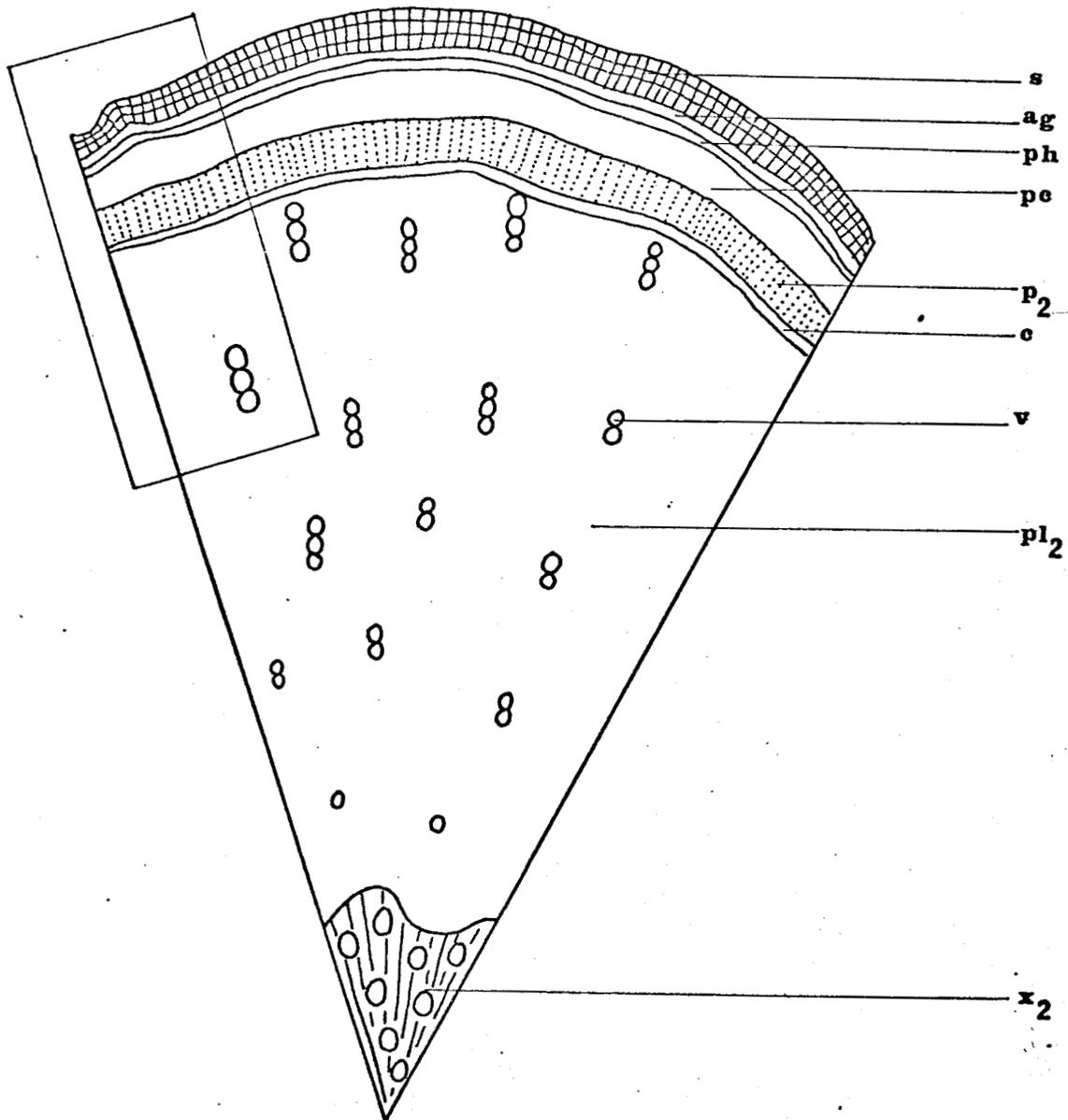


PLANCHE III : Coupe transversale de jeune tubercule de Manioc.

- ag : assise génératrice subéro-phellodermique
- ph : phelloderme
- v : vaisseaux entourés de cellules lignifiées
- pl₂ : parenchyme ligneux secondaire cellulosique.
- c : cambium

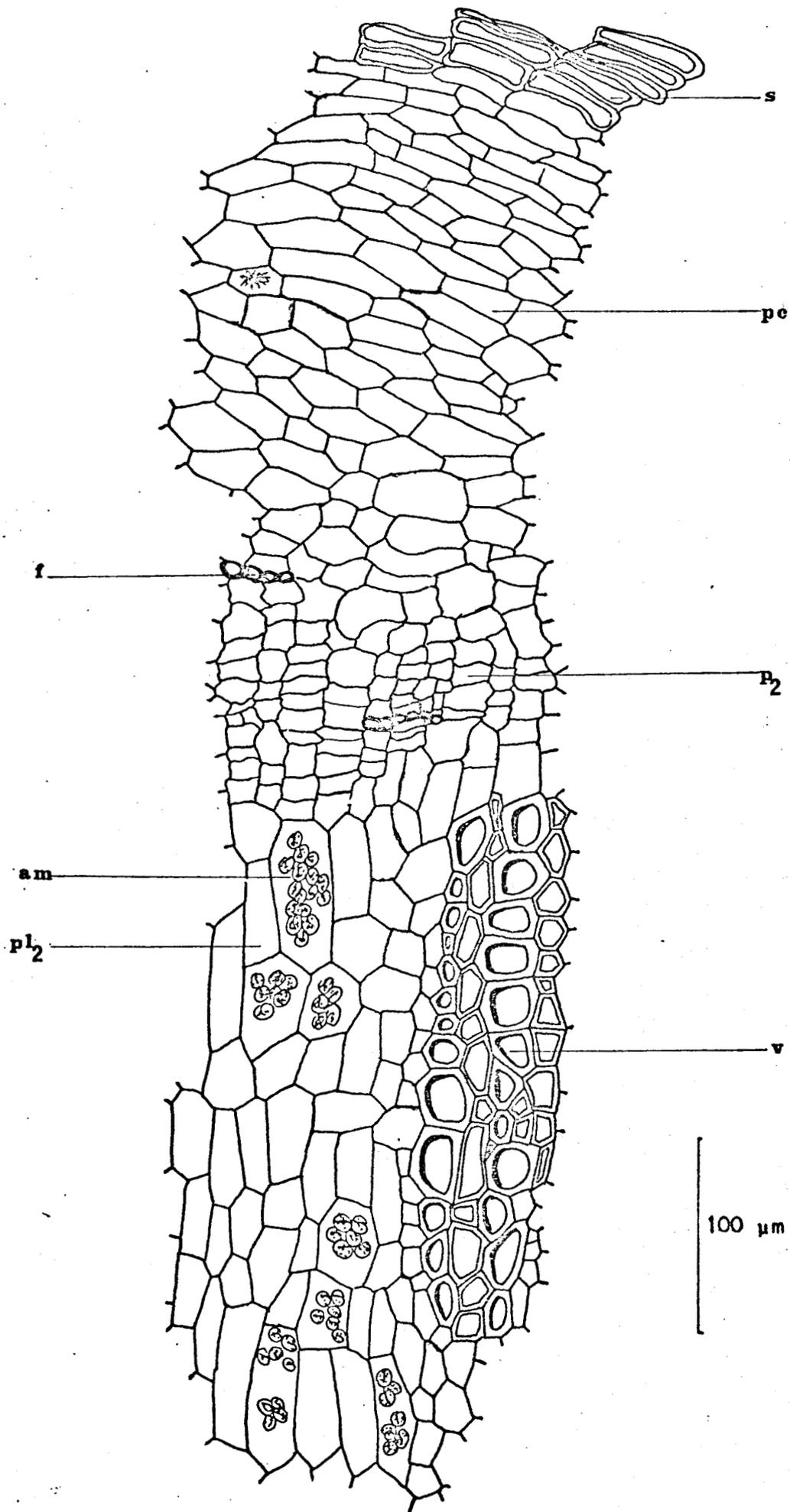


PLANCHE IV : Coupe transversale de jeune tubercule de Manioc.

f : fibre libérienne

am : grain d'amidon

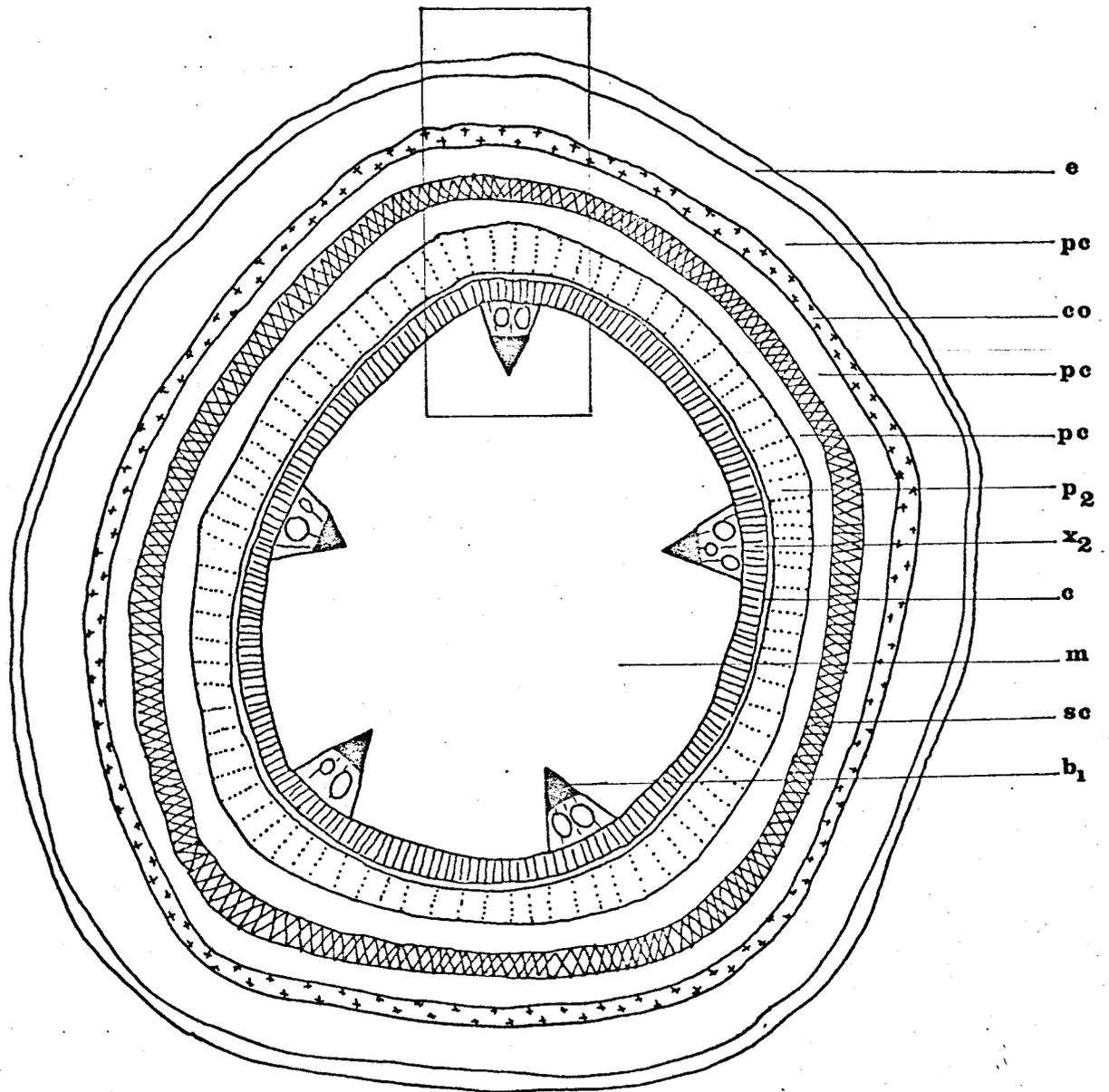


PLANCHE V : Coupe transversale de jeune tige de Manioc.

- e : épiderme
- sc : sclérenchyme
- b₁ : bois primaire
- m : moëlle



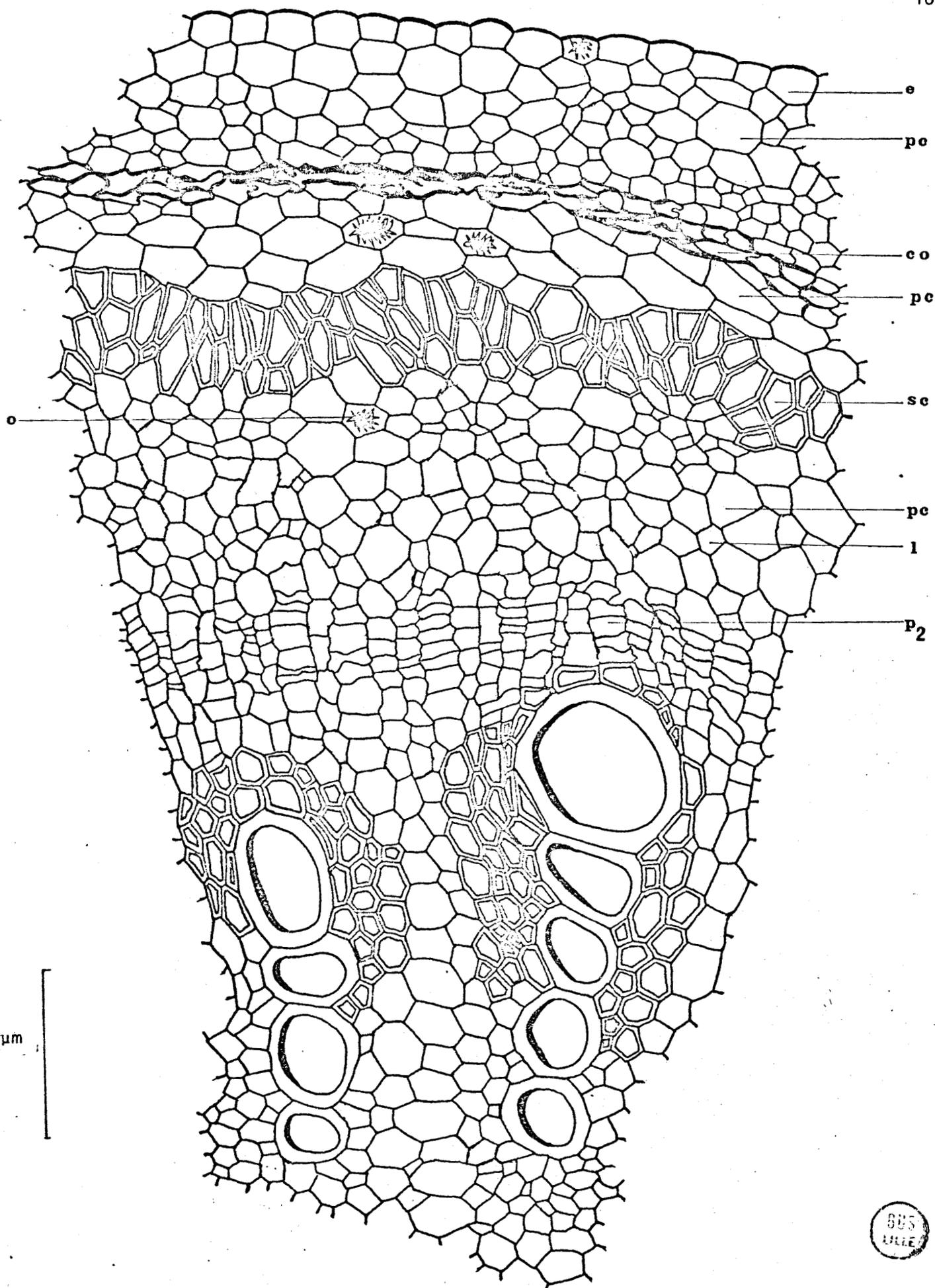


PLANCHE VI : Coupe transversale de jeune tige de Manioc.

o : cristaux d'oxalate de calcium
 l : laticifère

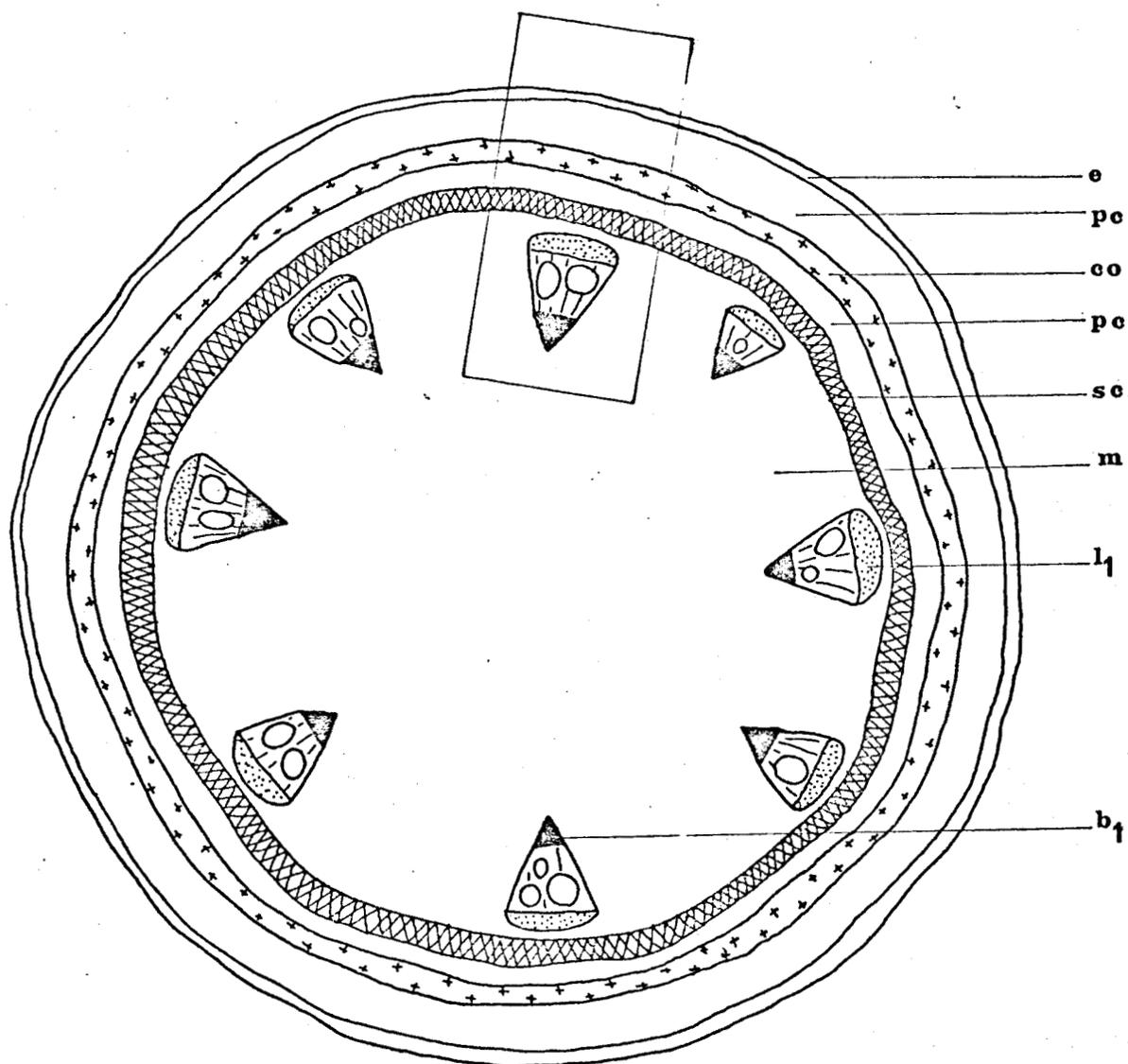


PLANCHE VII : Coupe transversale de jeune pétiole.

l_1 : liber primaire

b_1 : bois primaire

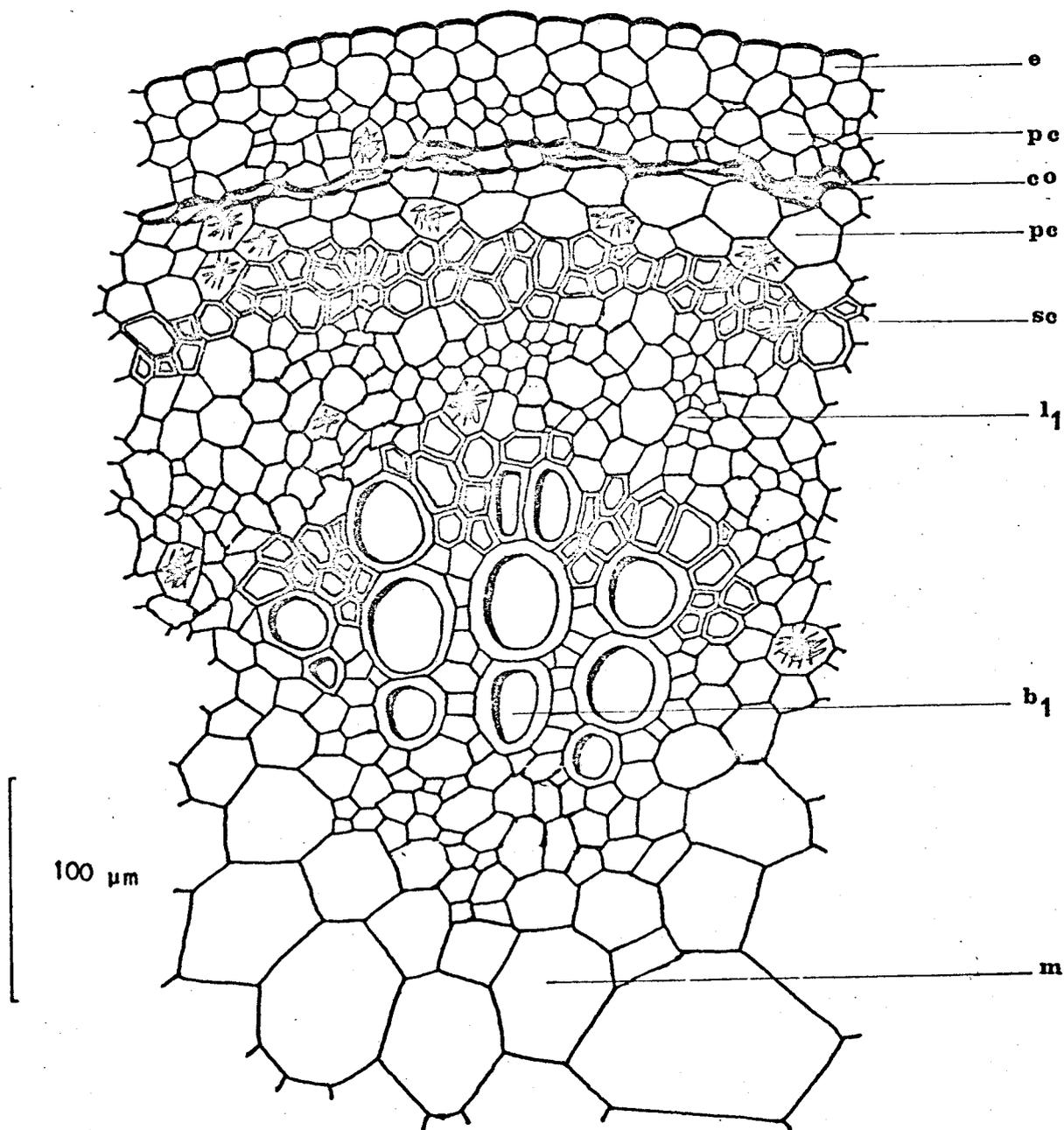


PLANCHE VIII : Coupe transversale de jeune pétiole.

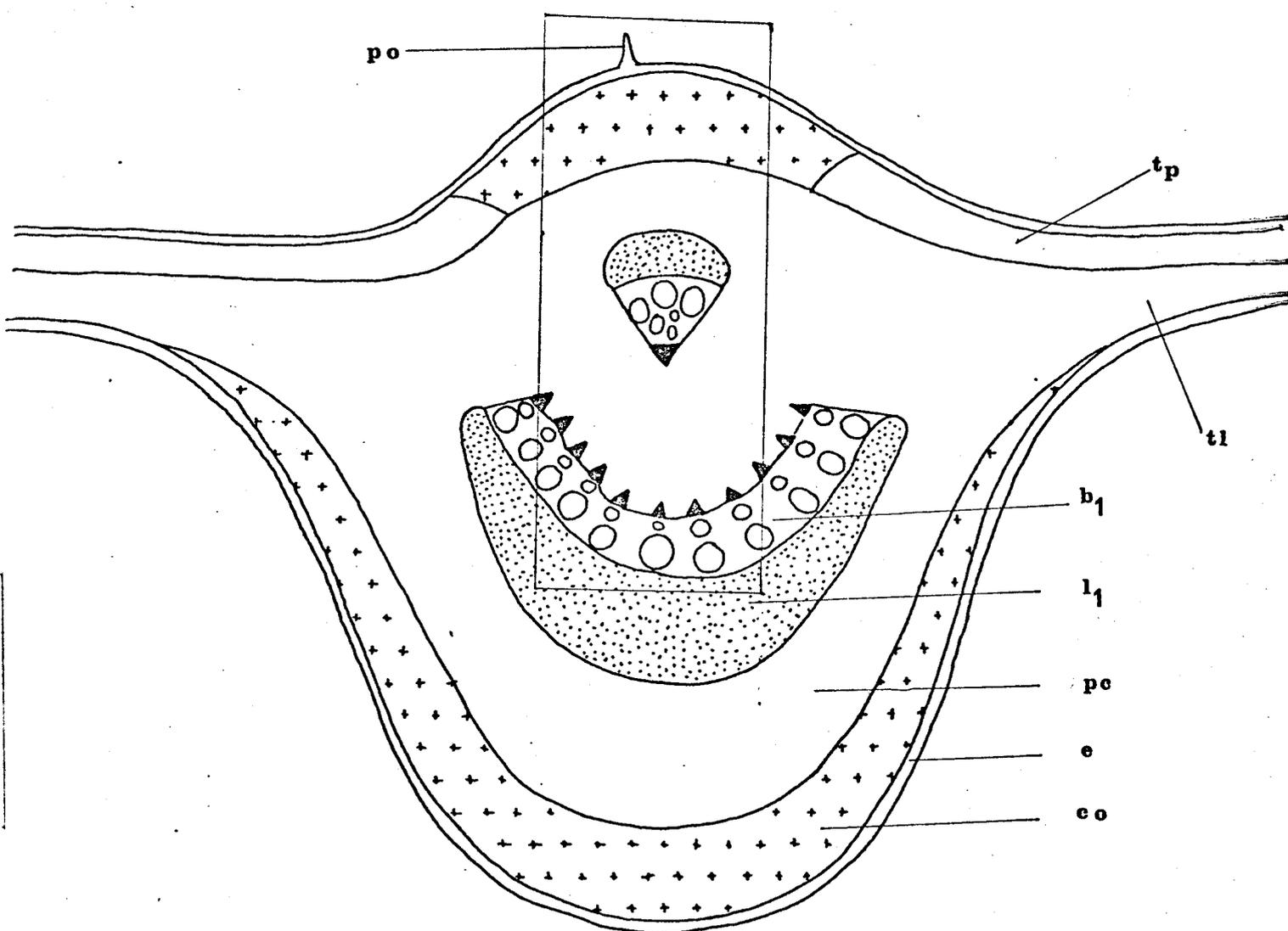


PLANCHE IX : Coupe transversale de feuille au niveau de la nervure principale.

- tp : tissu palissadique
- tl : tissu lacuneux
- po : poil



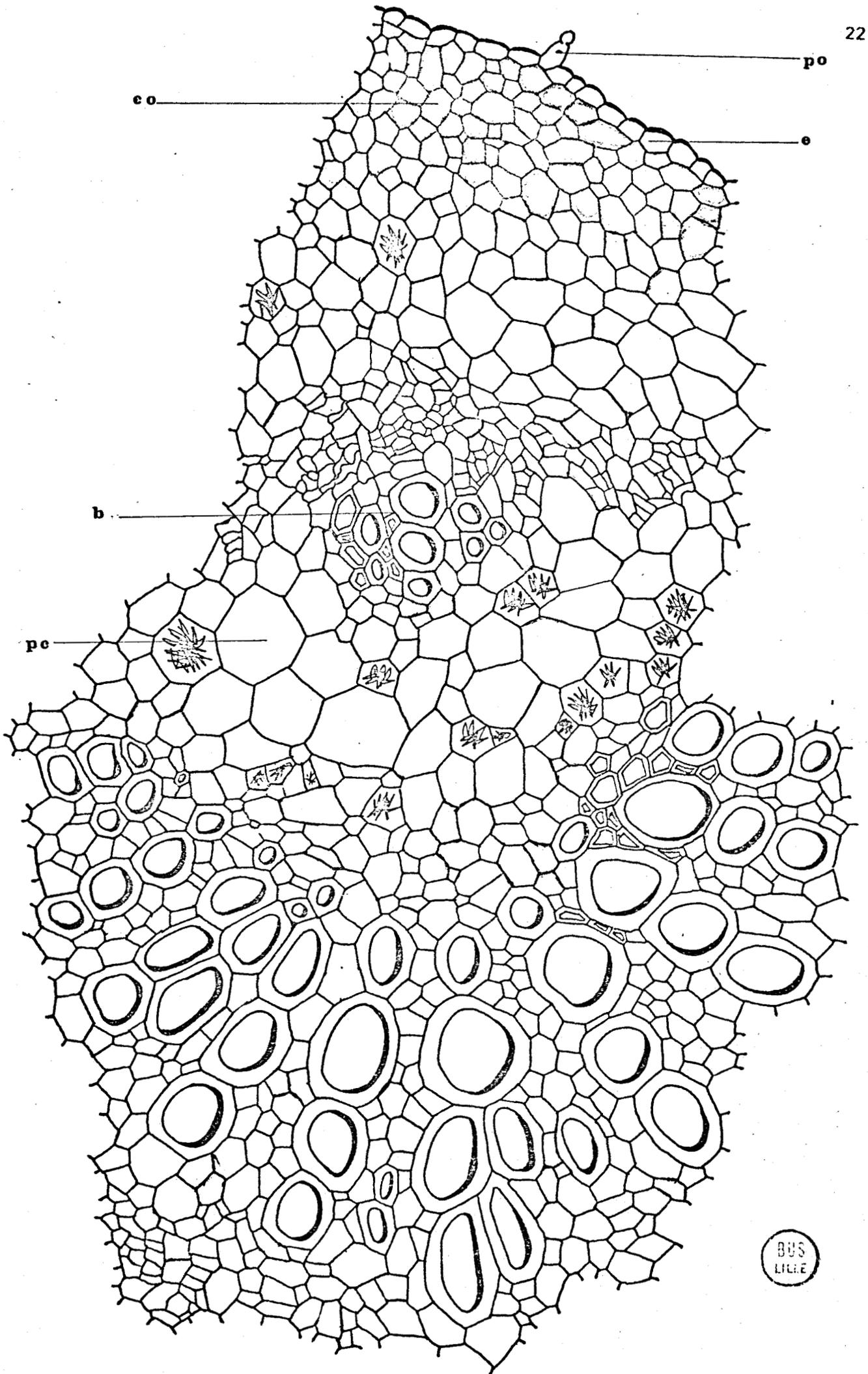


PLANCHE X : Coupe transversale de feuille au niveau de la nervure principale.

6°) Utilisation des différentes parties de la plante :

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

a) 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 % de Manioc. La classification par unité fourragère des aliments du bétail situe le manioc sec, en farine ou en cossettes presque au même rang que le blé, le maïs ou le riz.

b) alimentation humaine :

α/ feuille et tige :

Les feuilles de Manioc sont dans certaines régions fréquemment consommées comme "épinard" bouillies à l'eau ou sautées à l'huile. Certains hybrides tels que Manihot glaziovii Muell. x Manihot esculenta Crantz sont parfois même exclusivement cultivés pour leurs feuilles, qui constituent un excellent aliment riche en protides, calcium, sels minéraux et vitamine C.

Les tiges peuvent servir à préparer un sel alimentaire.

β/ transformations technologiques de la racine :

C'est de loin, la racine qui joue le rôle le plus important et qui est la plus utilisée 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. Les tubercules peuvent être consommés frais, comme légumes ou bien servir à la fabrication de la farine, du "gari", de la fécule, du tapioca, des "bâtons de manioc" etc... Les Tableaux II et III indiquent les transformations technologiques les plus importantes, subies par les tubercules tant en Afrique qu'en Amérique du Sud (Brésil).

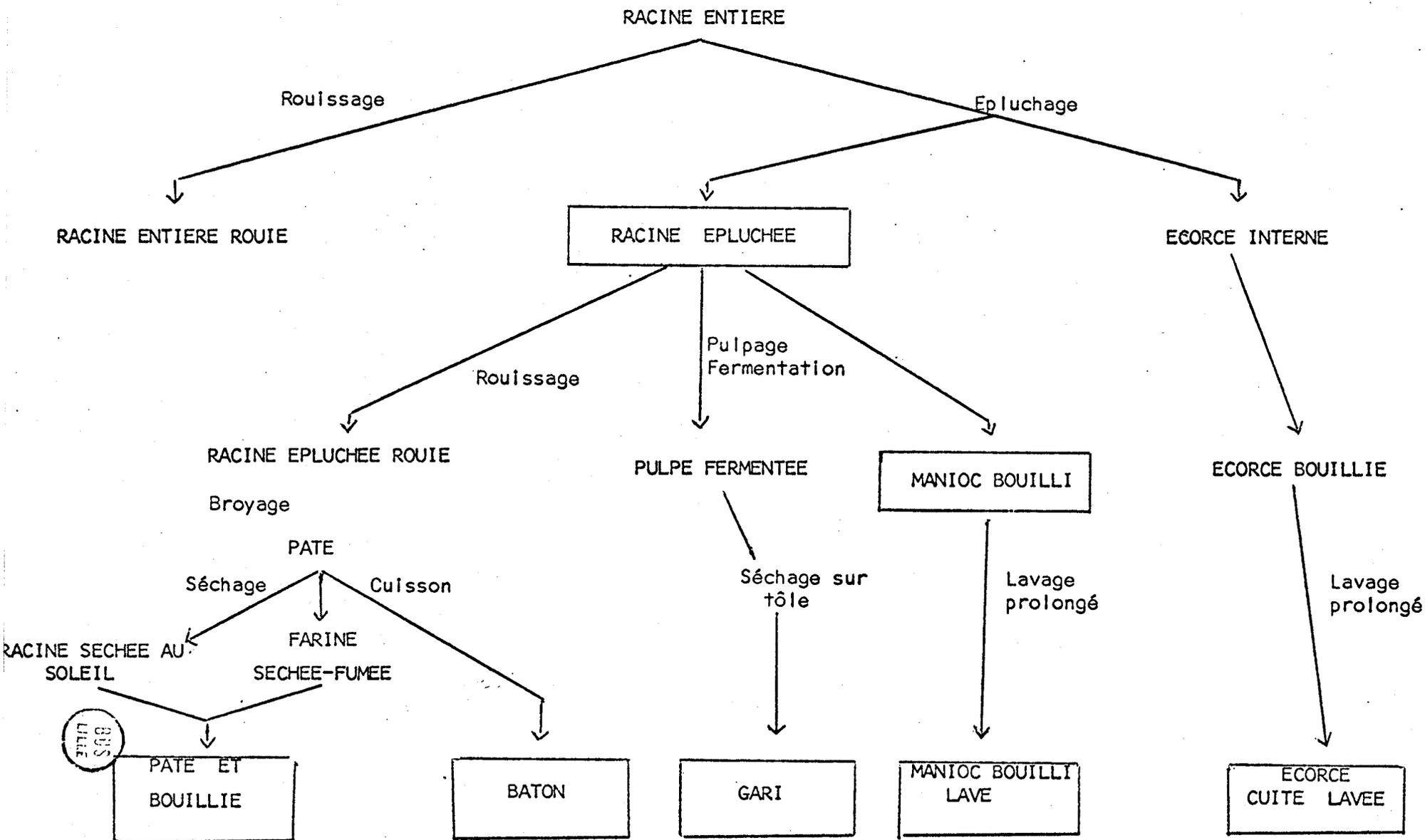
On comprend ainsi que le Manioc est, par excellence, la plante qui procure une alimentation diverse et substantielle toute l'année et

TABEAU II :

TECHNOLOGIE TRADITIONNELLE
DE LA RACINE DE MANIOC

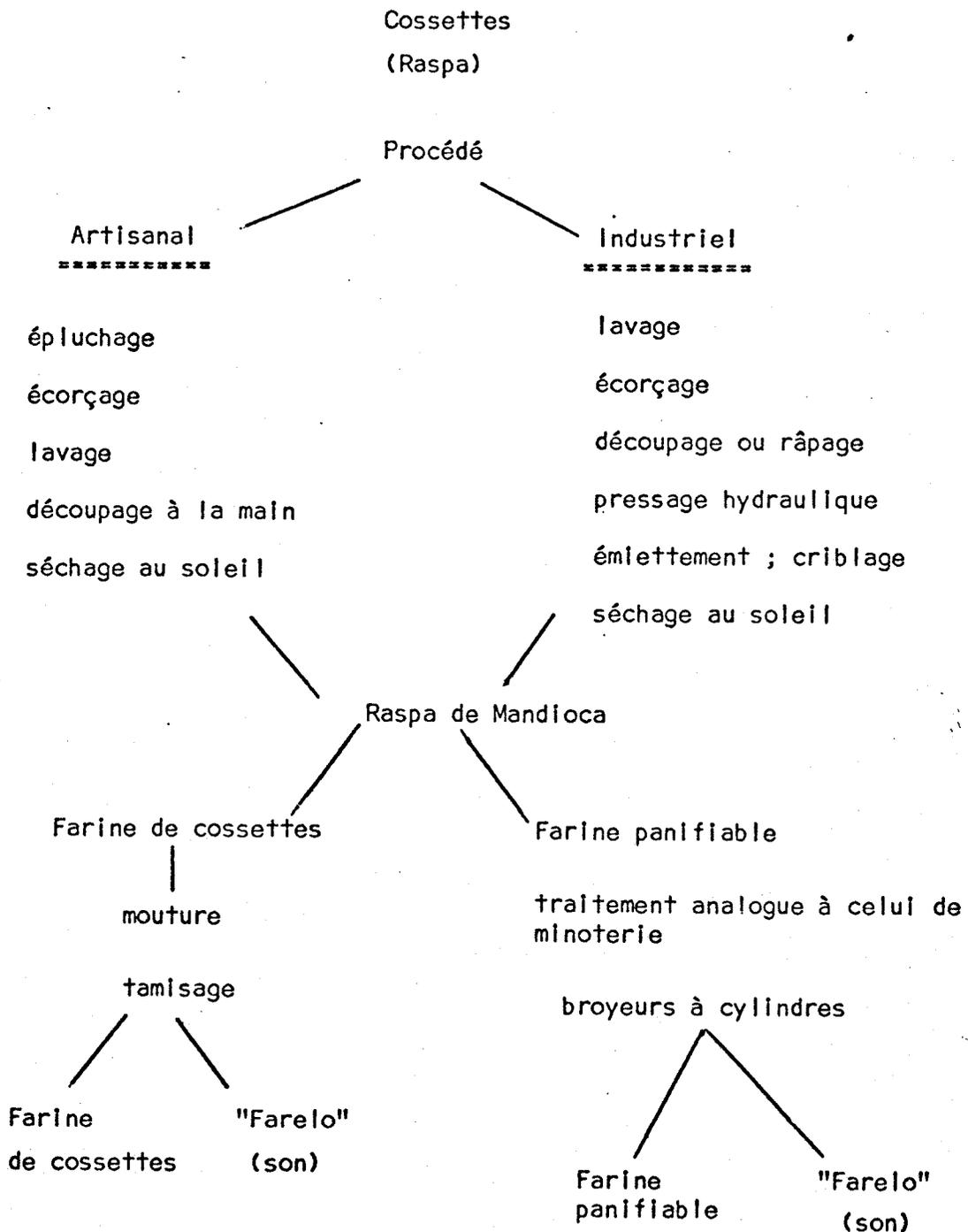
Extrait de : *Les Amylacées du Cameroun*
 par Favier (J.C.), Chevassus-Agnès (S.) et Gallon (G.) 196

(les formes directement consommables sont encadrées)



TABEAU III : Produits du Manioc spécifiquement brésiliens.

d'après : "*Rapport de la mission d'études aux Etats-Unis, au Togo et en France sur la technologie et la culture du Manioc*"
 par Tkatchenko (B.), 1959.



permet aux populations de faire face à des périodes de sécheresse en leur assurant un complément nutritionnel entre deux récoltes. Par sa composition chimique, il est riche en hydrates de carbone donc essentiellement énergétique ; il fournit dans certains cas, 40 à 60 % des calories de la ration indigène mais il ne saurait à lui tout seul servir d'aliment de base et doit être complété par des apports protéiques, minéraux et vitaminiques.

c) utilité 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, en Afrique, sa culture triomphe de plus en plus. En outre, ses débouchés sont multiples : le Manioc peut être transformé en glucose, servir dans la panification, les pâtes alimentaires, la féculerie, les biscuiteries, les usines de filatures et de tissages. 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. Un appoint de lumière est fourni 12 h par jour par des tubes luminescents. Après une bonne reprise, les plantes sont dépotées et mises en terre. 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 va-

riétés (Tabouca, Kataoli, Kalaba etc..). Aussi, pour pallier cet inconvénient et assurer un maximum d'homogénéité, avons-nous choisi de travailler sur une seule variété, la variété 1151, sélectionnée et cultivée à Niaouli. Notre choix a été dicté principalement par des considérations d'ordre pratique : nous avons en effet constaté sur le terrain que la variété 1151 présentait manifestement des facilités de reprise ; de plus, l'approvisionnement régulier de ce matériel nous avait été garanti.

2°) Culture "in vitro":

La méthode utilisée est celle mise au point par Gautheret (1959). Nous nous bornerons à en décrire uniquement les points qui intéressent directement ce travail.

a) préparation du matériel :

Seules les jeunes pousses aériennes obtenues à partir des boutures ont servi de matériel pour la culture in vitro. En effet, lorsqu'on utilise de gros morceaux de tige ayant séjourné 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, jusqu'à présent, nous ont donné des résultats acceptables (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. Après stérilisation, on prélève les explantats en les calibrant de façon aussi rigoureuse que possible.

c) Les milieux de culture ; leur composition ; 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 naphthyl acétique (A.N.A)
- l'acide 2,4 dichlorophénoxyacétique (2,4 D)
- la 6 furfurylaminopurine ou kinétine (K)
- l'acide gibbérellique (AG₃)

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 sont répartis en tubes de 16 x 3 cm puis 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.

- Composition des milieux :

Solution minérale de Heller

éléments/litre

K Cl	: 0,750 g
Na NO ₃	: 0,60 g
Mg SO ₄ , 7 H ₂ O	: 0,25 g
Na H PO ₄ , H ₂ O	: 0,125 g
Ca Cl ₂ , 2 H ₂ O	: 0,075 g
Fe Cl ₃ , 6 H ₂ O	: 1 mg
Zn SO ₄	: 1 mg
H ₃ BO ₃	: 1 mg
Mn SO ₄ , 4 H ₂ O	: 0,1 mg
Co SO ₄ , 5 H ₂ O	: 0,03 mg
Al Cl ₃	: 0,03 mg
Ni Cl ₂ , 5 H ₂ O	: 0,03 mg
KI	: 0,01 mg

Solution de Murashige et Skoog

éléments minérauxéléments / litre

NH_4NO_3	:	1650 mg
KNO_3	:	1900 mg
$CaCl_2, 2H_2O$:	440 mg
$MgSO_4, 7H_2O$:	370 mg
KH_2PO_4	:	170 mg
Na_2EDTA	:	37,3 mg
$FeSO_4, 7H_2O$:	27,8 mg
H_3BO_3	:	62 mg
$MnSO_4, 4H_2O$:	22,3 mg
$ZnSO_4, 4H_2O$:	8,6 mg
KI	:	0,83 mg
$Na_2MoO_4, 2H_2O$:	0,25 mg
$CuSO_4, 5H_2O$:	0,025 mg
$CaCl_2, 6H_2O$:	0,025 mg

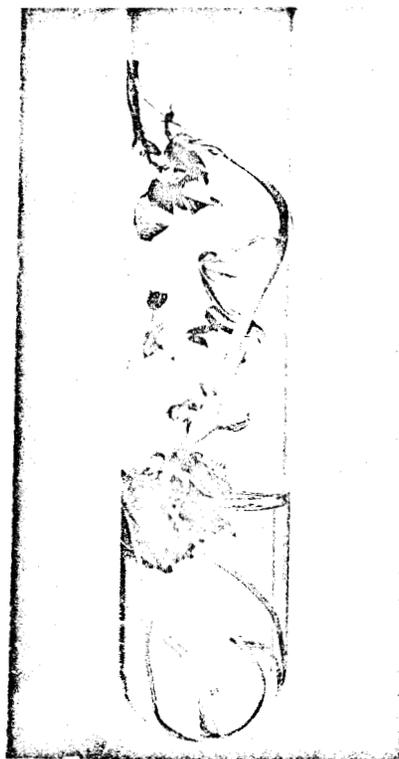
éléments organiqueséléments / litre

Saccharose	:	30 g
Myo inositol	:	10 mg
Edamine	:	1 g
Glycoccolle	:	2 mg
AIA	:	0,1 mg
Kinétine	:	1 mg
Acide nicotinique	:	0,5 mg
pyridoxine HCl	:	0,5 mg
Thiamine	:	0,1 mg

- Conditions de culture :

Après ensemencement, les cultures sont placées dans des conditions (température et photopériode) différentes. La lumière est fournie par des tubes luminescents O S R A M L 400 W/18 dit "lumière du jour de luxe". Les résultats sont notés après quelques semaines de culture.

Parfois, il a été nécessaire de modifier les conditions expérimentales au cours de la culture. Lorsqu'il s'agit de la température ou de la photopériode, c'est relativement facile, mais la modification de la composition du milieu était plus délicate et nécessitait des transferts. Toutefois, pour ne pas léser les tissus ou briser les racines qui commençaient à apparaître, nous avons utilisé des milieux moins gélosés (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.



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

Figure. 4



3°) Techniques histologiques :

Pour préciser les phénomènes observés, nous avons été amené à faire quelques observations histologiques. Pour cela, nous avons eu recours aux méthodes classiques (celle de Langeron, 1949, modifiée par Jensen, 1962).

Après fixation au microformol de Bouin, les échantillons sont déshydratés à l'alcool, traités par le xylène et inclus dans la paraffine. Les coupes (10 μ m) sont colorées par la double coloration safranine-fast green selon le protocole suivant : 12 h de passage dans la safranine, 6 mn dans le fast green et 2 mn dans le mélange eugénoal-alcool absolu.

RESULTATS

Notre travail est essentiellement consacré à l'étude de la rhizogenèse du Manioc cultivé in vitro. Ceci nous a néanmoins amené à amorcer quelques recherches préliminaires sur la tubérisation des racines ainsi obtenues.

I ETUDE DE LA RHIZOGENESE DE FRAGMENTS DE TIGE DE MANIOC

Nous considérerons successivement les cultures d'entrenoeuds et celle des noeuds.

A - CULTURE DES ENTRENOEUDS :

Dès nos premiers essais, nous avons constaté l'importance de 3 types de facteurs dans la néoformation des racines par les fragments d'entrenoeuds : les sucres, les substances de croissance et les facteurs climatiques (température, lumière).

1°) Action des sucres

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

Le rôle des sucres dans la production des racines est connu depuis longtemps. 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.

Nous avons cultivé les entrenoeuds 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 étaient 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'organogenèse ont lieu très vite (fig. 5 et 6).

Ces résultats démontrent nettement que le sucré est indispensable à la prolifération et à la néoformation des racines par les entrenoeuds 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 et saccharose) nécessaire à l'organogenèse, d'autre part, l'influence de différentes concen-

trations. La rhizogénèse a été évaluée en fonction de la date d'apparition des racines et du nombre moyen de racines néoformées après 45 jours de culture.

Une faible concentration de glucose (1 %) (Tableaux IV et VI) 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 %.

De même, 1 % de saccharose (Tableaux V et VII) 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'organogénèse.

Il apparaît donc que, lorsqu'on utilise le saccharose et le glucose à des doses sensiblement équimolaires, le premier est plus efficace, plus rhizogène. Toutefois, en sa présence, les tissus se nécrosent précocement (4, 5 jours avant ceux cultivés avec du glucose). Nous avons, pour cela, préféré utiliser le glucose à 3 % dans l'étude de la rhizogénèse des fragments d'entrenoeuds de Manioc.

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'organogénèse : l'auxine exogène est donc indispensable à la rhizogénèse.

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

Les résultats obtenus au bout de 45 jours (Tableaux IV, V, VI, VII) indiquent que la concentration 10^{-8} g/ml d'A I A est sans effet et que la 10^{-5} g/m favorise particulièrement la callogénèse ; la rhizogénèse 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 5) ; elles se développent, atteignent éventuellement le milieu et s'y ramifient. Cette polarité de la rhizogenèse est confirmée lorsque les explantats sont disposés horizontalement à la surface du milieu, un repère indiquant sur le tube, la face racinaire : les racines sont produites uniquement par cette face (figure 6) : la polarité est donc très nette.

L'action de l'A N A, comme le montrent les Tableaux VI et VII, 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 un cal important qui donne naissance à des racines (7 en moyenne) courtes (3 mm) et trapues (1 mm de diamètre moyen).

Utilisés 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 cals 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 :

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 sans les supprimer ; il faut cependant souligner que 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 de 10 jours environ.

La kinétine, comme cela est classique, contrarie l'effet rhizogène de l'A I A et de l'A N A mais stimule fortement la prolifération cellulaire (Tableau VIII).

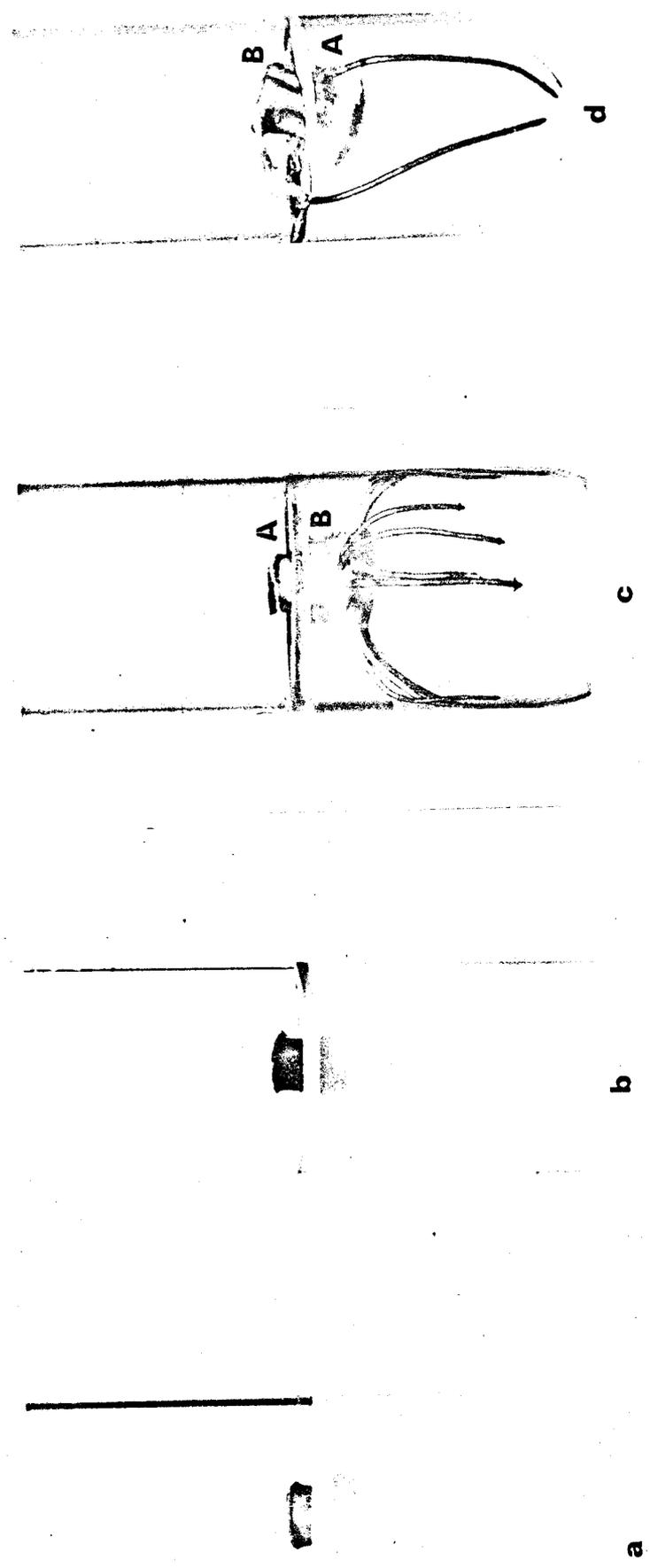


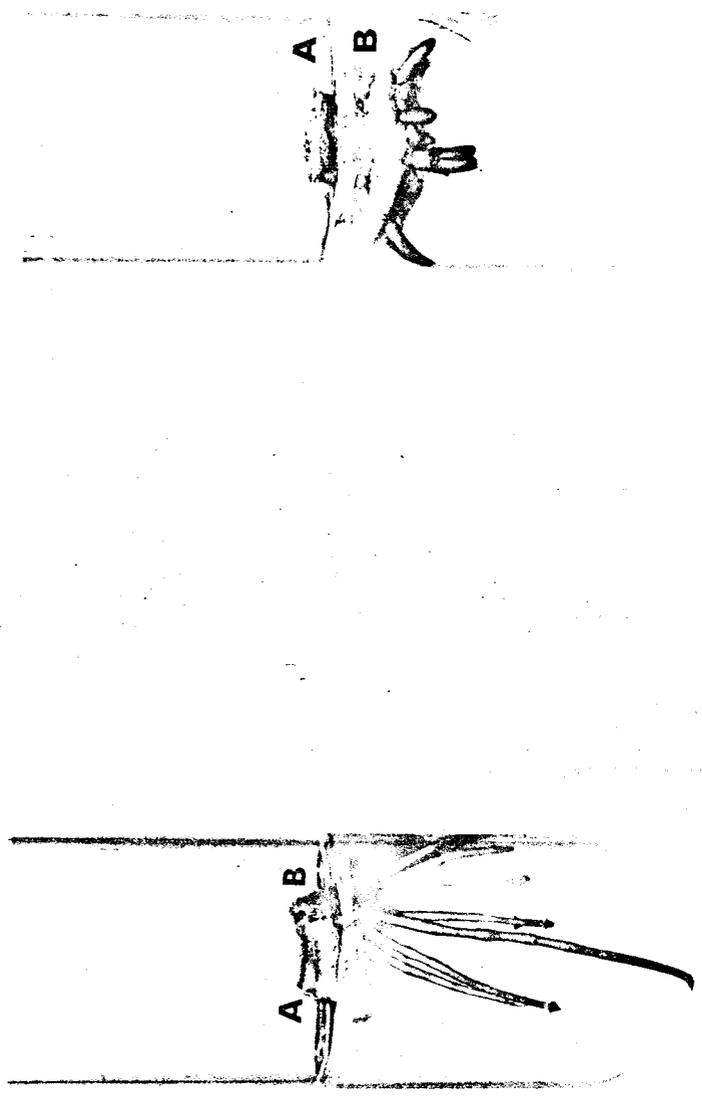
Figure 5 : Fragments d'entre-noeuds de Manioc cultivés pendant 3 semaines sur des milieux différents :

- a : milieu renfermant les sels minéraux de Heller et 3 % de glucose
- b : " " " " 10⁻⁶ g/ml d'I A (mais pas de sucre)
- c et d : " " " " 3 % de glucose et 10⁻⁶ g/ml d'I A

A : région apicale des explantats

B : région basale " "





a

b

Figure 6 : Fragments d'entre-noeuds 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



Concentration d'AIA en g/ml Glucose en %	10^{-8}			10^{-6}			10^{-5}		
	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)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	1,1	6	0,5	1,9	7	0,5	0	0,580
2	0	1,5	6	0,5	2,3	7	0,5	0	0,692
3	0	2,0	5	0,5	9,5	28	0,5	0	1,100
4	0	2,0	5	0,5	5,1	24	0,5	0	1,050
5	0	2,0	5	0,5	3	14	0,5	0	0,500
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0

TABLEAU IV : 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^{-8}			10^{-6}			10^{-5}		
	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	0	1	5	0,5	2	19	0,5	0	0,500
2	0	1	5	0,5	4,8	30	0,5	0	0,550
3	0	2,2	8	0,5	10	30	0,5	0	1,500
4	0	3	8	0,5	12	35	0,5	0	1,550
5	0	3	8	0,5	8,2	29	0,5	0	1,450
6	0	2,8	7	0,5	5	20	0,5	0	1,430
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0

TABEAU V : Action du saccharose et de l'AIA sur le développement des fragments d'entre-noeuds de Manioc.



Concentration d'ANA en g/ml Glucose en %	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	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	2,2	10	0,6	2,4	4	1	0	0,600
2	0	3,1	15	0,7	3,5	3	1	0	0,800
3	0	7,4	20	0,7	7,0	3	1	0	1,560
4	0	6,9	20	0,7	7,0	3	1	0	1,500
5	0	6,9	15	0,7	3,5	3	0,8	0	0,900
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0

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



Concentration d'ANA en Saccharose en %	10 ⁻⁸ Racines		10 ⁻⁷ Racines Longueur moyenne en mm		10 ⁻⁶ Racines Longueur moyenne en mm		10 ⁻⁵ Racines		Poids frais moyen de caï/explantat (en g)
	nombre moyen	diamètre moyen en mm	nombre moyen	diamètre moyen en mm	nombre moyen	diamètre moyen en mm	nombre moyen	diamètre moyen en mm	
1	0		2	0,6	2	1	4	1	0,700
2	0		2	0,6	2	1	3	1	1,200
3	0		7,5	0,7	7,8	1	3	1	1,600
4	0		7,2	0,7	7,5	1	3	1	1,590
5	0		7	0,7	5,1	1	3	1	1,000
6	0		4,2	0,6	3	1	3	1	0,900
8	0		0	0	0	0	0	0	0

TABLEAU VII 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 I A seul		10e jour	9,5	0
10^{-6} A I A +	10^{-7} AG_3	7e	5,1	0
	10^{-6} AG_3	20e	2,2	0
	10^{-5} AG_3	20e	2,0	0
10^{-6} A I A +	10^{-7} K	Pas de rhizogenèse	0	0,200
	10^{-6} K			0,600
	10^{-5} K			0,540
10^{-6} A N A seul		Callogenèse + rhizogenèse	0	1,560
10^{-6} A N A +	10^{-7} K	pas de rhizogenèse	0	1,600
	10^{-6} K			2,100
	10^{-5} K			1,900
10^{-6} 2,4 D +	10^{-7} K	pas de rhizogenèse	0	2,800
	10^{-6} K			3,000
	10^{-5} K			2,200

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



3°) Facteurs climatiques :

a) Mise en évidence de l'influence de la température :

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, quelle que soit la durée de l'expérience, et, il n'y a jamais néoformation de racines.

A 25°C, il est lent, et, en fin d'expérience, le nombre moyen de racines par explantat n'est que de 2.

30°C semble être la température optimale : en effet, à cette température, les phénomènes d'organogenèse sont accélérés (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 (figure 7).

Les températures supérieures à 30°C (35°C et 40°C) provoquent rapidement un gonflement basal des explantats mais après quelques jours, les tissus se nécrosent sans avoir donné de racines.

Si 30° C est 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. Par tâtonnements successifs, nous avons essayé d'améliorer ce pourcentage et nous avons constaté par exemple qu'en plaçant les tissus à 25°C pendant une semaine avant de les porter à 30°C, 96 % d'entre eux sont susceptibles de manifester des phénomènes de rhizogenèse.

b) Action de températures alternées :

Les résultats précédents nous ont incité à étudier l'effet de modifications de la température au cours de la culture. Connaissant les interférences entre la lumière et la température, pour simplifier les données

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

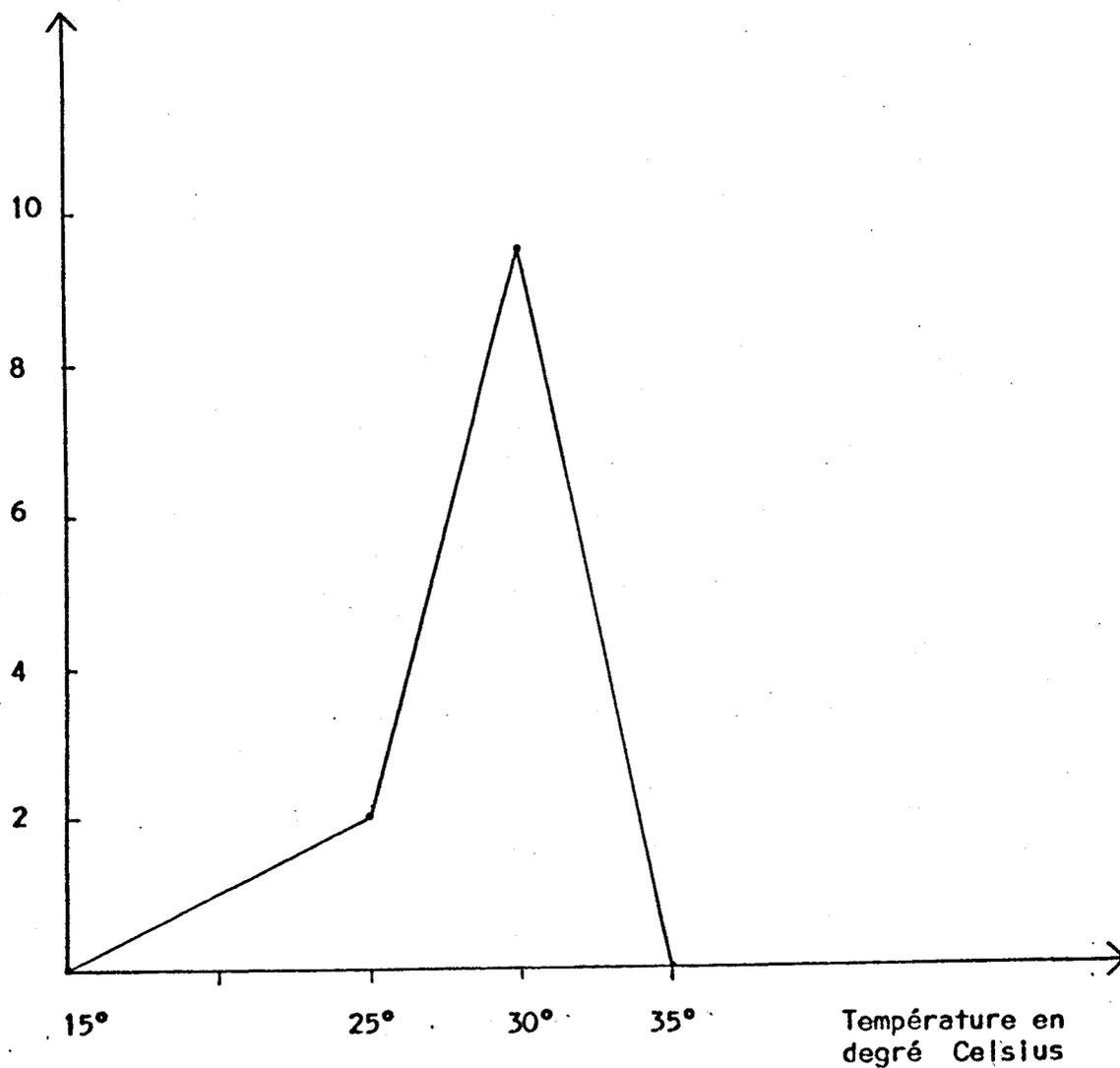


Figure 7 : Influence de la température sur la rhizogenèse
d'entrenoëuds de Manioc ensemencés sur le milieu de Heller
+ 3 % de glucose + 10^{-6} g/ml d'A I A .

expérimentales, nous avons réalisé ces essais à la 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 10^e jour de culture, les résultats diffèrent.

Lorsque les tissus sont soumis pendant 48 h aux températures basses au début de la culture (fig. 8), 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 9).

c) Influence de la lumière :

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

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

optimum
à 12 h

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

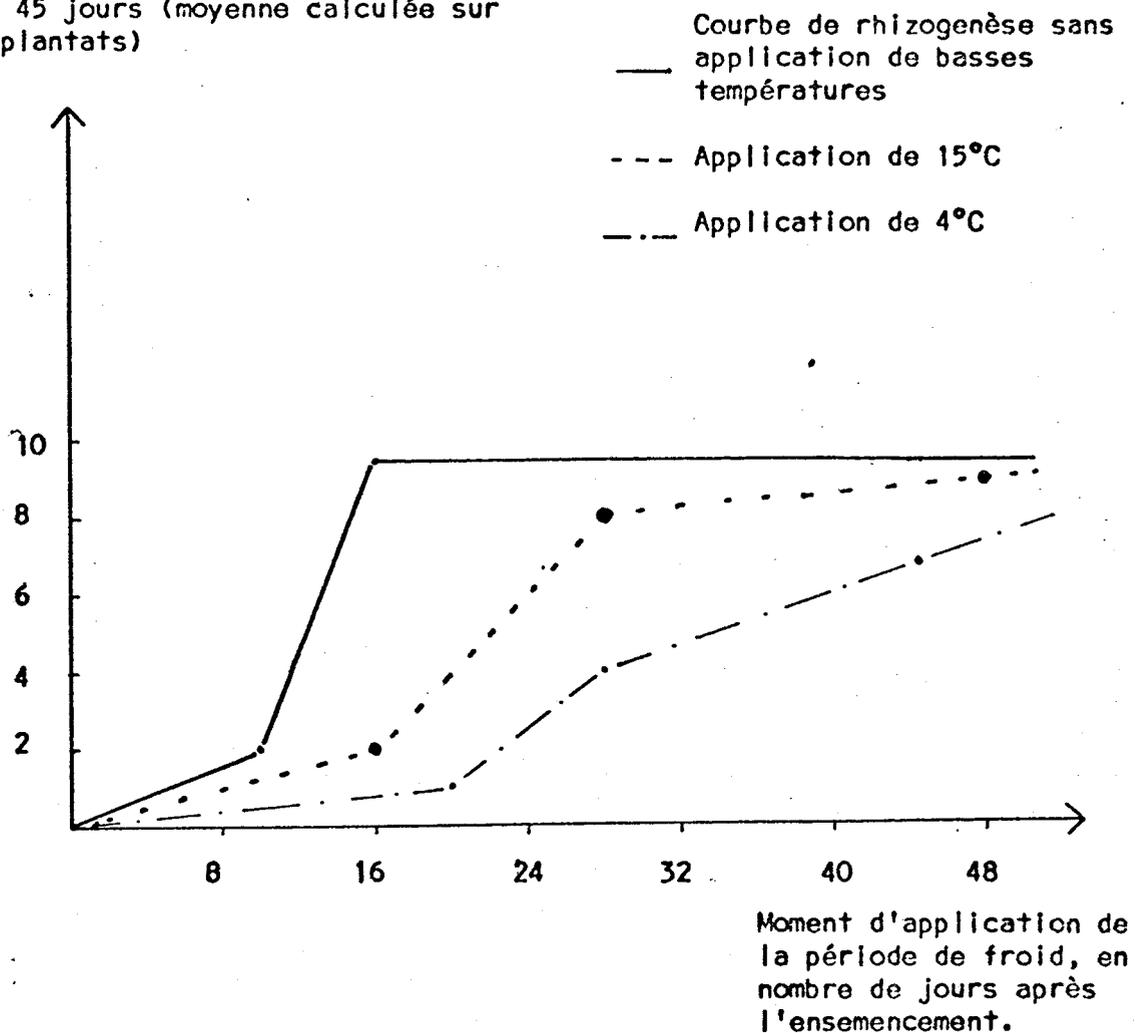


Figure 8 : Influence, sur la rhizogenèse des entrenoeuds de Manioc, d'un traitement à 4°C ou à 15°C pendant les premières 48 h de culture.

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

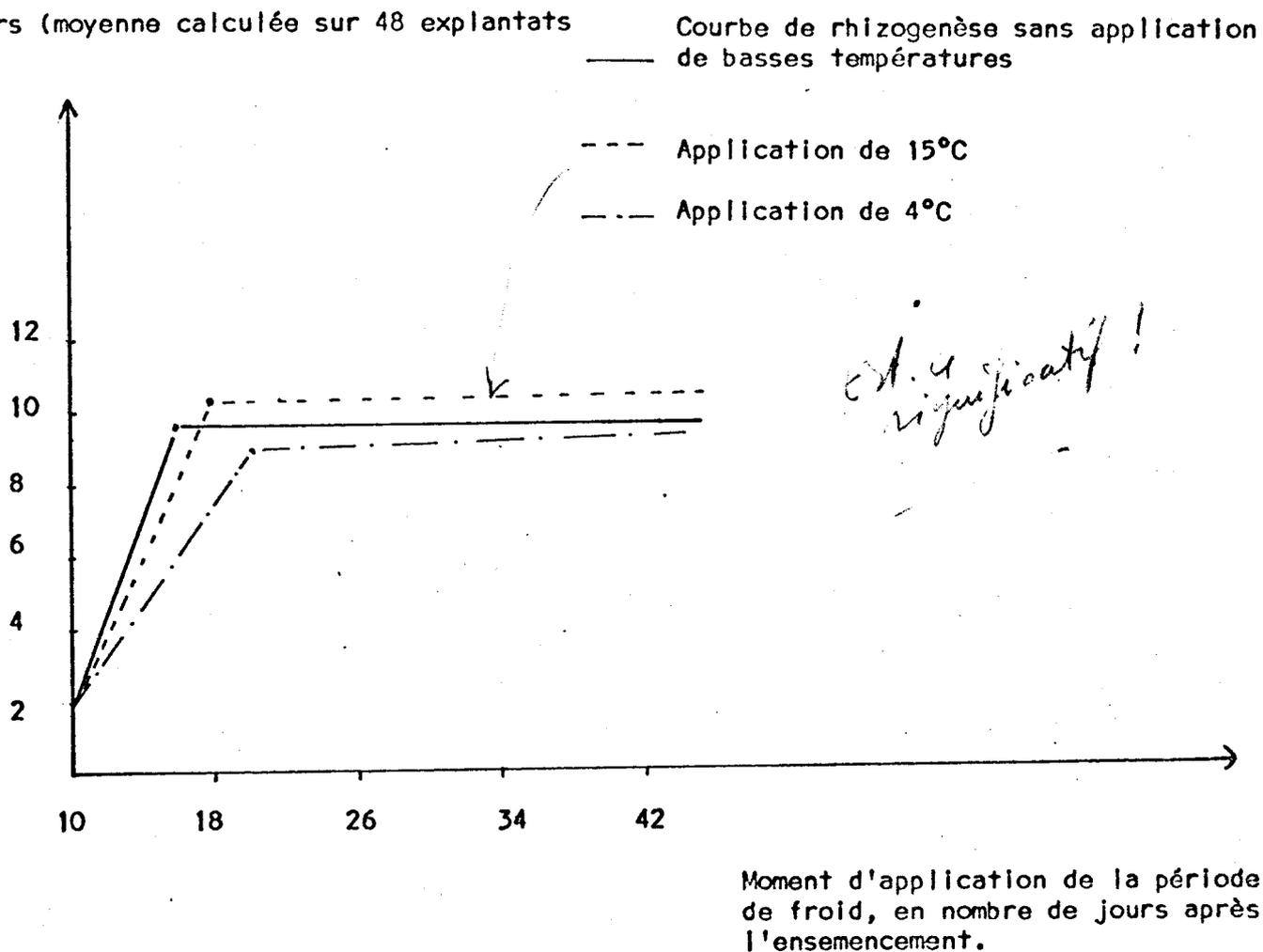


Figure 9 : Influence de la rhizogenèse des entrenoeuds de Manioc d'un traitement à 4°C ou à 15°C pendant 48 h, entre le 10ème et le 11ème jour de culture.

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	<u>9,5</u>	30e j.	<u>1,560</u>
16 h de lumière	14e	7,1	28e j.	1,320
lumière continue	15e	6,8	32e j.	<u>1,612</u>

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

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.

B - CULTURE DES NOEUDS :

Les fragments d'entrenoeuds 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 facteurs trophiques sur la croissance des noeuds :

a) Les sucres

α/ mise en évidence du rôle du sucre :

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

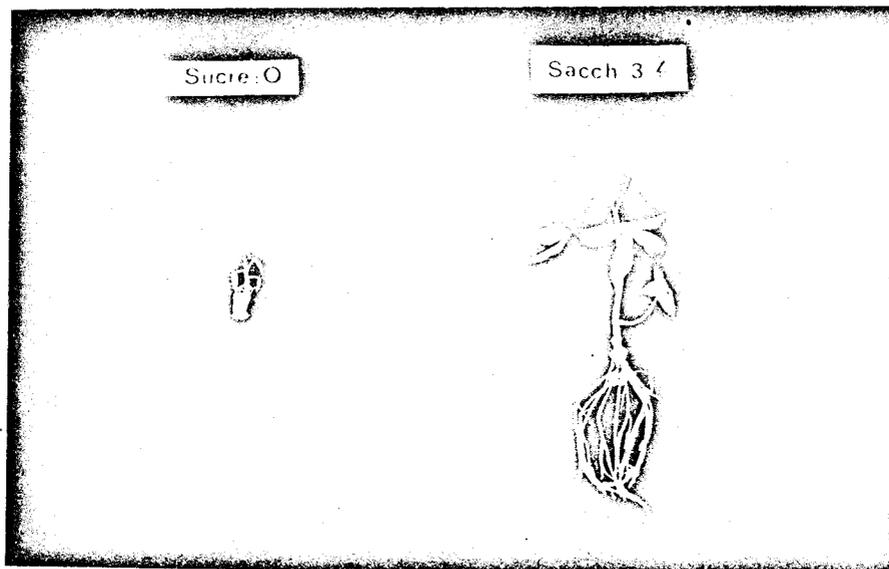
Si ce milieu est privé de sucre, le bourgeon axillaire se développe lentement et les premières racines n'apparaissent que le 30ème jour.

La croissance des bourgeons et l'organogenèse sont plus importantes en présence de sucre (fig. 10).

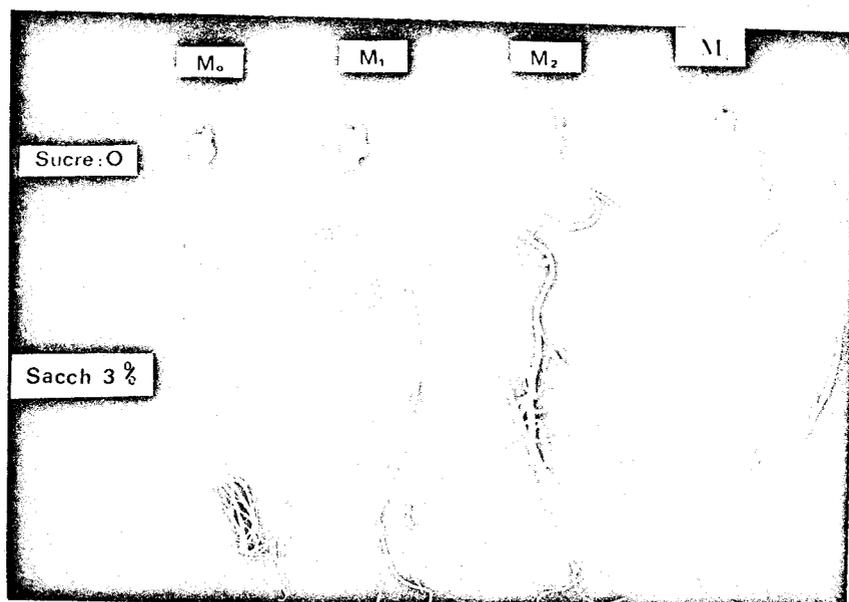
Le sucre n'est donc pas indispensable à la formation des racines par les noeuds de Manioc, mais il exalte le phénomène. C'est le bourgeon axillaire qui induit la rhizogenèse. On peut expliquer ce fait comme une conséquence du développement des bourgeons : les produits élaborés et les phytohormones présentes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

Dans tous les cas, les racines naissent à la base de l'explantat, en dessous du bourgeon axillaire ; elles s'allongent très rapidement et se ramifient ; elles sont minces, leur diamètre moyen est compris entre 0,4 et 0,6 mm.





a



b

figure 10

a : explantat cultivé 21 jours sur un milieu contenant les éléments minéraux de la solution de Heller.

b : explantats cultivés 21 jours sur un milieu contenant les éléments de la solution de Murashige et Skoog.

M 0 :	éléments minéraux seuls		
M 1 :	" "	+ 10^{-7} g/ml d'A I A et 10^{-6} g/ml de K	
M 2 :	" "	+ éléments organiques	
M 3 :	" "	+ " "	+ 10^{-7} g/ml d'A I A et 10^{-6} g/ml K



Il convient de préciser tout de suite que la position du noeud sur la tige initiale dont sont issus les explantats, ne semble pas influencer sur le développement in vitro des tiges : en effet, les résultats trouvés avec les noeuds situés à la base, à la partie médiane ou supérieure de la tige, ne présentent pas de différence significative. Seul l'apex a un comportement particulier : il régénère des racines 3 jours après l'ensemencement. En raison de sa position privilégiée, il n'est pas inhibé par la dominance apicale et il manifeste son activité après un temps de latence plus court.

β/ 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) tandis qu'à 5 ou 6 %, il est inhibiteur (Tableau X).

Le saccharose est nettement plus efficace et sa dose optimale est de 3 % ; il accélère la croissance du bourgeon et la rhizogenèse. Pour cette raison, nous l'employons dans les expériences ultérieures à 3 %. Il devient inhibiteur à partir d'une dose de l'ordre de 8 % (Tableau XI).

b) Les éléments minéraux et organiques

α / éléments minéraux des solutions de Heller ou de Murashige et Skoog

Les figures 11 et 13 indiquent que la solution proposée par Murashige et Skoog est plus favorable au développement des bourgeons que la solution minérale de Heller. Nous avons donc comparé l'action des deux solutions plus ou moins concentrées sur le développement des bourgeons et sur la rhizogenèse des noeuds de Manioc.

- Solution de Heller (fig. 11 et 12) :

En présence de la solution de Heller diluée de moitié, les bourgeons se développent mais plus faiblement que sur la solution à concentra-

↳
pas visible sur
la fig. 11

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					


TABEAU X : 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 Rhizogénèse	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				



TABLEAU XI : 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.

Taille moyenne en cm des explantats
après 21 jours de culture à 30°C
(moyenne calculée sur 48 explantats)

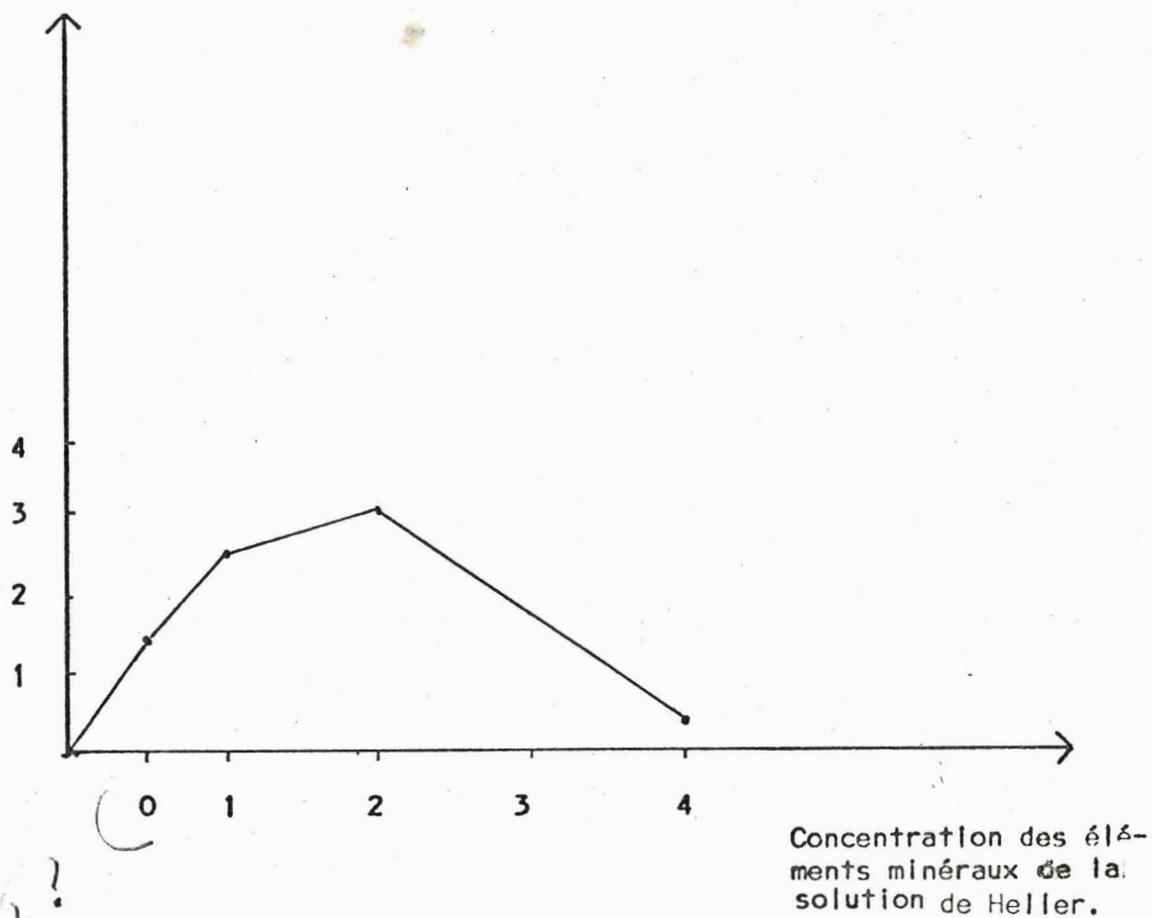


Figure 11 : Action de diverses concentrations de la solution minérale de Heller sur la croissance des noeuds de Manioc.

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

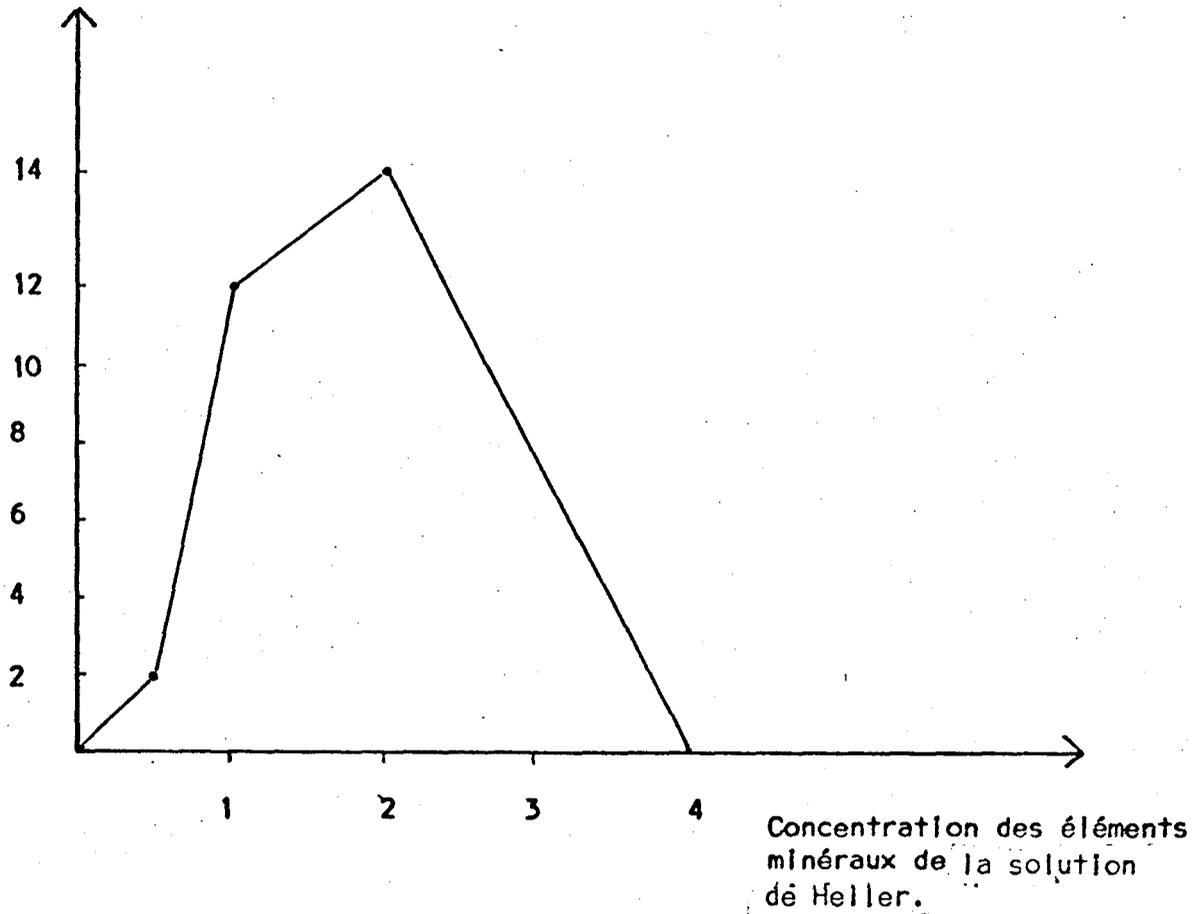


Figure 12 : Action de diverses concentrations de la solution minérale de Heller sur le nombre moyen de racines produites par les noeuds de Manioc.

Taille moyenne en cm des explantats après
21 jours de culture à 30°C (moyenne calculée
sur 48 explantats)

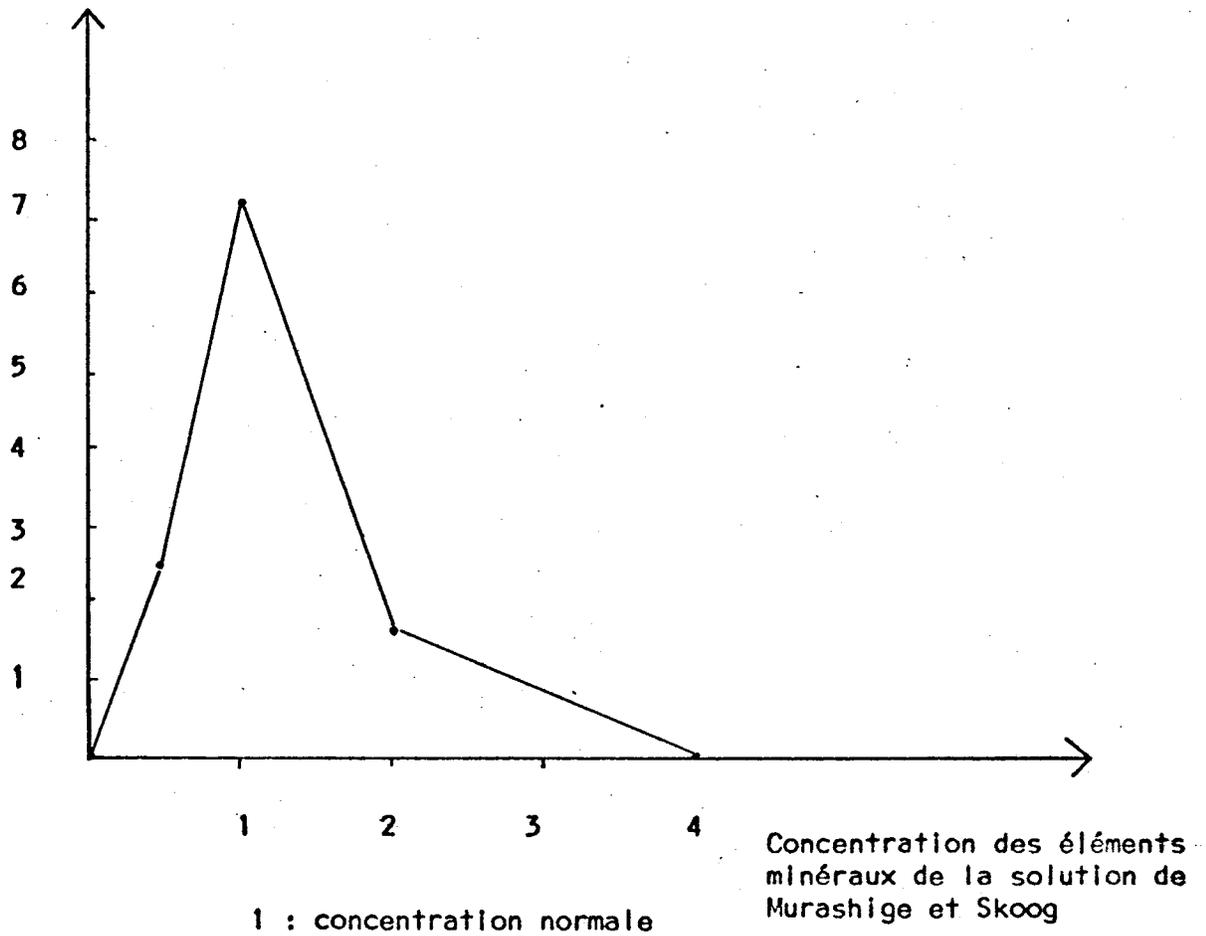


Figure 13 : Action de diverses concentrations des éléments minéraux de la solution de Murashige et Skoog sur la croissance des noeuds de Manioc.

tion normale.

Lorsqu'on double globalement les concentrations des éléments minéraux, on obtient une stimulation du développement axial et de la rhizogenèse ; quand on les quadruple, les bourgeons se gonflent, la croissance est ralentie : moins de 0,6 cm en moyenne de taille après 21 jours de culture.

- Solution de Murashige et Skoog (fig. 13 et 14) :

Les expériences ont également établi que lorsqu'on double ou quadruple la concentration en éléments minéraux de la solution de Murashige et Skoog, la croissance des noeuds et la rhizogenèse sont freinées ou complètement inhibées. C'est encore avec la concentration normale que la production de racines est la plus importante.

β/ éléments organiques du milieu de Murashige et Skoog

En présence des éléments organiques (sans les phytohormones) du milieu de Murashige et Skoog, les bourgeons ont dépéri sans avoir donné de racines.

γ/ éléments minéraux et organiques du milieu de Murashige et Skoog.

Nous avons ensuite associé les éléments minéraux et organiques (fig. 10b); le nombre de racines dénombrées par explantat dans ce cas est nettement inférieur à celui obtenu sans les éléments organiques. Il semble donc que ces derniers aient une action défavorable sur le développement des bourgeons.

En raison de la simplicité de la composition de la solution de Heller et afin de réduire les paramètres susceptibles d'entraîner des erreurs d'interprétation des résultats, nous avons, dans la plupart des expériences, préféré comme milieu de base la solution de Heller, avec des modifications chaque fois que cela était nécessaire.

2°) Action des substances de croissance :

Comme nous l'avons vu, le développement des bourgeons et des racines au niveau des noeuds n'exige pas la présence de facteurs de croissance dans le milieu. On pouvait néanmoins se demander si ces facteurs sont capables de le modifier. En conséquence, nous avons cultivé les noeuds de Manioc sur le milieu habituel additionné de différentes doses de vitamine B₁, d'acide gibbérellique, de kinétine ou d'A I A (figure 15).

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

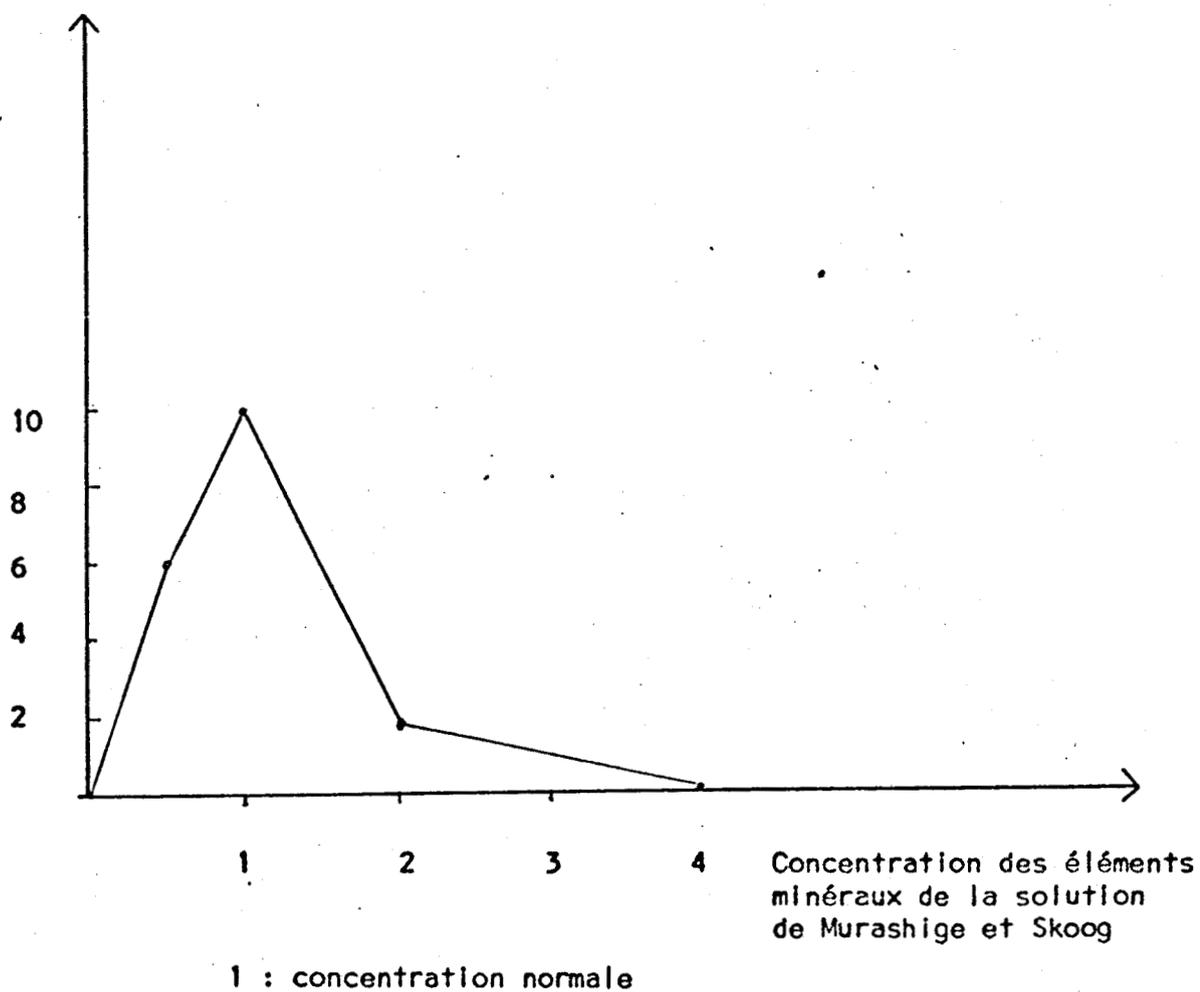


Figure 14 : Action de diverses concentrations des éléments minéraux de la solution de Murashige et Skoog sur le nombre moyen de racines produites par les noeuds de Manioc.

La vitamine B₁, à 10⁻⁸ ou 10⁻⁷ g/ml, n'a modifié ni la date d'apparition des racines, ni l'intensité de la rhizogenèse. A 10⁻⁶ g/ml, elle réduit légèrement le nombre moyen de racines par explantat par rapport au témoin.

L'acide gibbérellique aux faibles doses (10⁻⁸ et 10⁻⁷ g/ml) favorise la croissance du bourgeon, hâte l'apparition des racines mais réduit également le nombre moyen de racines par explantat ; à 10⁻⁶ 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 pour le témoin) et diminue le nombre total de racines, en particulier lorsqu'elle est employée à forte dose (10⁻⁶ g/ml).

Les doses 10⁻⁷ et 10⁻⁶ 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 10⁻⁶ g/ml de kinétine et de 10⁻⁷ 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. Ce phénomène curieux est peut-être le résultat de l'influence de la kinétine sur la partie aérienne de la plante.

Les 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 ; ces résultats peuvent être interprétés comme une conséquence de la rupture d'équilibre entre les concentrations des substances incorporées au milieu et des substances endogènes de l'explantat.

3°) Facteurs climatiques

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

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'étiolent.

Nous avons retenu pour nos expériences la photopériode 12/24.

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

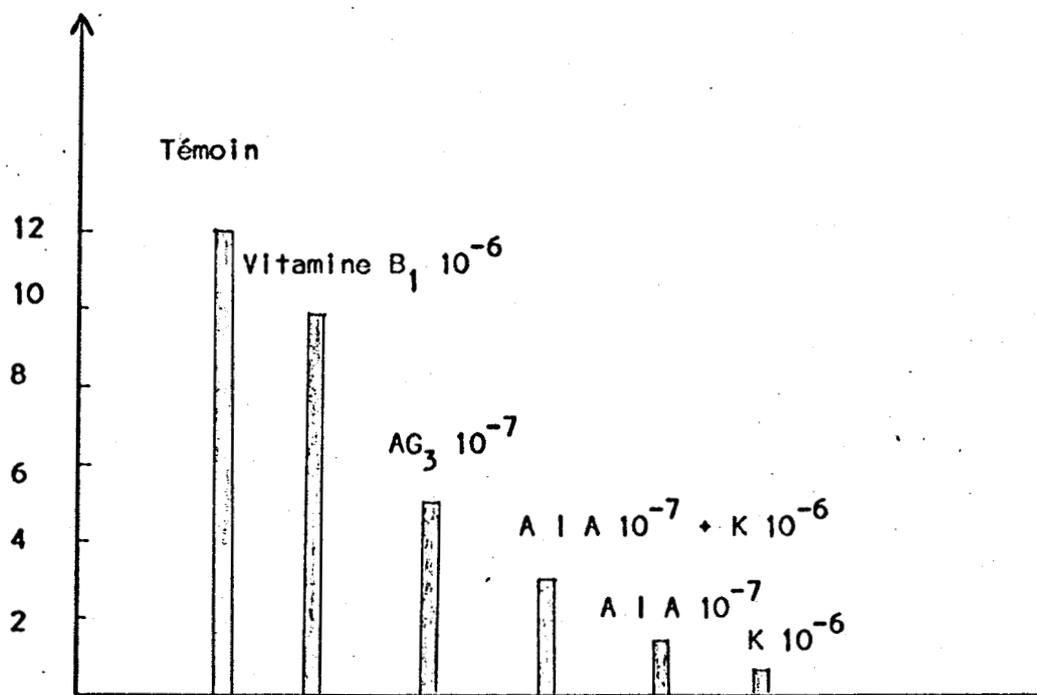


Figure 15 : Influence de différentes substances de croissance sur la rhizogénèse de noeuds de Manioc.

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

TABLEAU XII : 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 XIII : 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

En examinant les résultats précédents (Tabl. X, XI), on peut se demander s'il existe 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 la solution 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.

Les résultats groupés dans les Tableaux XII et XIII, montrent que quel que soit le milieu utilisé, 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 (30°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'AG₃ 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 XIV).

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

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 ₃	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 1 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 XIV : Action de l'AG₃ et de l'A 1 A sur le développement des bourgeons de Manioc
 cultivé sur un milieu contenant les éléments minéraux de la solution de Heller
 + 3 % de saccharose.



II ESSAIS DE TUBÉRISATION "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 TUBÉRISATION :

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 (Oignon, Echalotte, Ail...) 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), Perennec (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 - ESSAIS D'INDUCTION DE LA TUBERISATION :

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 des substances inhibitrices 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 16) : 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 vermiculite offre l'avantage de permettre régulièrement l'examen des racines et la remise en place de la plante sans endommager celles-ci.

1°) Inhibition due aux conditions climatiques :

a) Inhibition photopériodique

Les lots A et B sont placés à différentes températures et soumises aux éclairagements suivants : 24 h, 16 h, 12 h, 8 h, obscurité (Tableau XV).

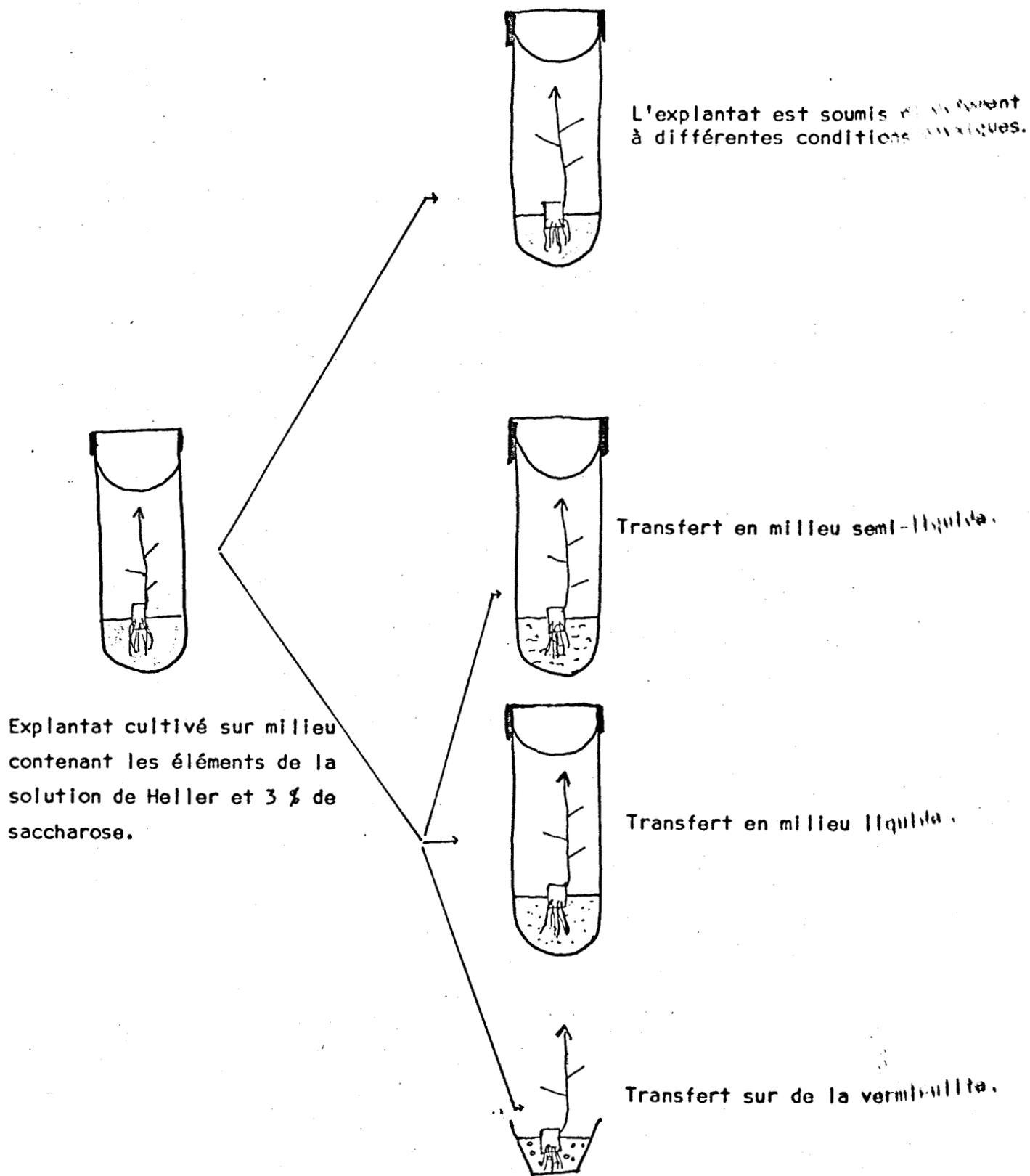


Figure 16 : Protocole expérimental.

A 4°C, quelles que soient les conditions d'éclairage, les feuilles des explantats jaunissent rapidement et les plantes meurent au cours de la première semaine.

A 10°C, à l'obscurité et en photopériode 8/16, l'allongement de la partie aérienne est imperceptible jusqu'à la nécrose des tissus qui survient en moyenne 4 semaines après l'ensemencement. Il n'y a pas de formations de nouvelles racines ; le diamètre moyen des racines, évalué dans leur région médiane, ne varie pas ; mais, l'extrémité de toutes les racines se renfle. A cette température, les explantats cultivés en jours longs, survivent en moyenne une semaine de plus que les autres, mais ne s'allongent pas .

A 15°C, les résultats sont pratiquement semblables aux précédents mais ici, les plantes s'étiolent légèrement lorsqu'elles sont placées à l'obscurité ou en jours courts.

Les températures plus élevées (25°C et 30°C) sont, comme nous l'avons vu par ailleurs, favorables au développement de la plante : la partie aérienne croît ; les racines préexistantes s'allongent alors que d'autres apparaissent, soit dans le milieu de culture, soit hors du milieu, mais leur diamètre moyen varie peu.

Il ressort de ces expériences que, d'une façon générale, les basses températures ralentissent la croissance des explantats mais ces derniers survivent peu de temps. La durée journalière ne permet pas, dans le cadre de nos expériences, d'induire la tubérisation.

b) Inhibition thermopériodique :

Les explantats ont été cultivés à différentes photopériodes et 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. Tout au plus, l'extrémité des racines augmente légèrement de taille lorsque les lots sont placés à 25°C le jour, 10°C la nuit et en photopériode 8/16 (Tableau XVI).

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.

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	0	0	0	0,5	}	4 sem.			
	8 ^h /24							0,6		
	12 ^h /24							}		
	16 ^h /24								0,8	
24 ^h	5 sem.									
15° C	Obscurité	}	0	0	0,5	}	6 sem.			
	8 ^h /24							0,6		
	12 ^h /24							}		
	16 ^h /24								0,8	
24 ^h										
25° C	Obscurité	}	}	}	0,4	}	La croissance se poursuit jusqu'à ce que l'apex de la tige touche le coton			
	8 ^h /24							30	1,5	3
	12 ^h /24							}		
	16 ^h /24								10	3
24 ^h										
30° C	Obscurité	}	}	}	0,4	}				
	8 ^h /24							35	1	5
	12 ^h /24							}		
	16 ^h /24								1,8	40
24 ^h	20	4	50							

TABLEAU XV : 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.

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)	
Photopériode	Température					Partie médiane	Extrémité
	diurne	nocturne					
Obscurité	25°C	10°C	10	1	-	0,4	0,4
8 ^h /24	25°C	10°C	5	2	3	0,4	0,7
12 ^h /24	25°C	10°C	5	1,8	5	0,4	0,6
16 ^h /24	25°C	10°C	7	1,5	9	0,4	0,4
lumière continue	25°C	10°C	5	1	6	0,4	0,4

TABLEAU XVI : Influence de la thermopériode sur le développement de la tige et des racines formées sur les noeuds de Manioc cultivés à 30° 12/12 pendant 3 semaines.

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 bourgeons apicaux.

b) Inhibition par des retardateurs de croissance :

L'hydrazide maléique, l'A MO 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.

Utilisé seul, l'A I A provoque 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 (Tableau XVII), les explantats, placés à température constante (25°C) et à la photopériode de 12/12 ont survécu aussi longtemps que les témoins, soit 4 mois 1/2, résultat qui n'est jamais observé dans les cas envisagés précédemment; aux autres conditions photopériodiques ou thermopériodiques, ils s'étiolent (jours courts, obscurité) ou meurent vite (températures froides).

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 40mm chez les témoins non transférés dans un autre milieu, mais placés dans les mêmes conditions. 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 3 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 17a et b), les racines "renflées" sont trapues ; dans l'autre (figure 18) elles sont allongées et peuvent être ramifiées.

La croissance des plantes cultivées à 25°C et en photopériode 12/12 sur de la vermiculite et arrosées régulièrement par une solution de Heller 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 3 mois de culture (figure 19).

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 (Planche XI) 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

	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 XVII : 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.



avec les bandes de Casparis, un péricycle, 5 faisceaux libéro-ligneux alternés.

La structure des racines "renflées" obtenues en tube sur milieu semi-liquide ou liquide, (planche XII) ne présente pas de formations secondaires malgré l'âge de l'explantat (4 mois). Cependant, le parenchyme cortical est 5 fois 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, puisque nous avons vu que la tubérisation des racines de Manioc est due au développement de 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 | A sur les tissus superficiels des racines.

La structure des racines "renflées" obtenues sur de la vermiculite est totalement différente ; elle est identique à celle d'un jeune tubercule et comprend un épiderme, un parenchyme cortical amyli-fère, des formations secondaires libéro-ligneuses concentriques. Le renflement des racines obtenu sur les plantes cultivées sur de la vermiculite correspond donc bien à un début de tubérisation.

On peut se demander si cette différence de structure ne résulte pas de l'action néfaste que peut avoir le milieu de culture sur l'évolution histologique des racines.

à l'él
de
l'axe central

substrat
mélange
de
vermiculite
et
d'eau

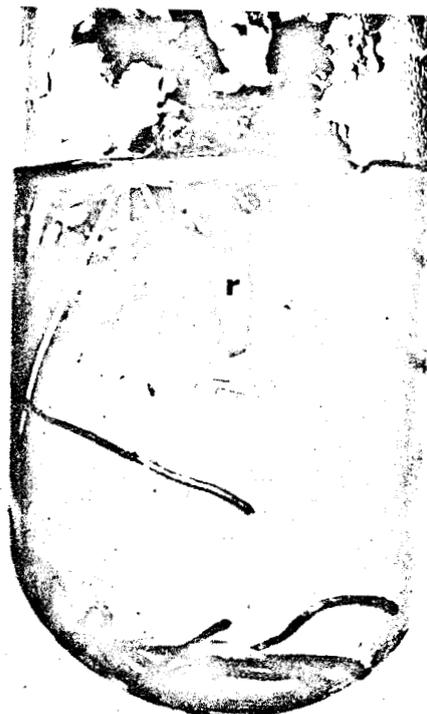
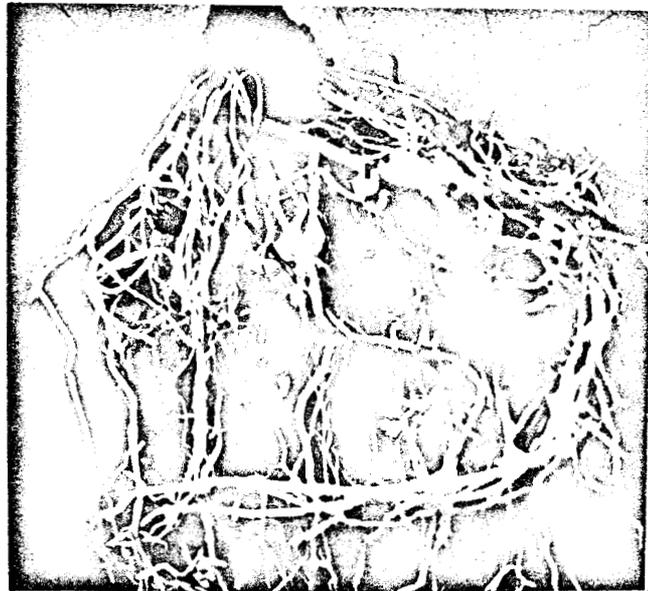


Figure 17 : explantats transférés en milieu semi-liquide contenant les éléments minéraux de la solution de Heller + 10^{-6} g/ml de kinétine et 10^{-7} g/ml d'A I A. et présentant, après 3 mois de culture, des racines "renflées" (r).



Figure 18 : 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"(r).



BUS
LILIE

Figure 19 : Explantat transplanté sur de la vermiculite et arrosé quotiennement 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"(r).

Handwritten notes:
 (u)
 racines renflées
 + sur papier
 vermiculite
 avec l'eau
 de la solution
 de culture

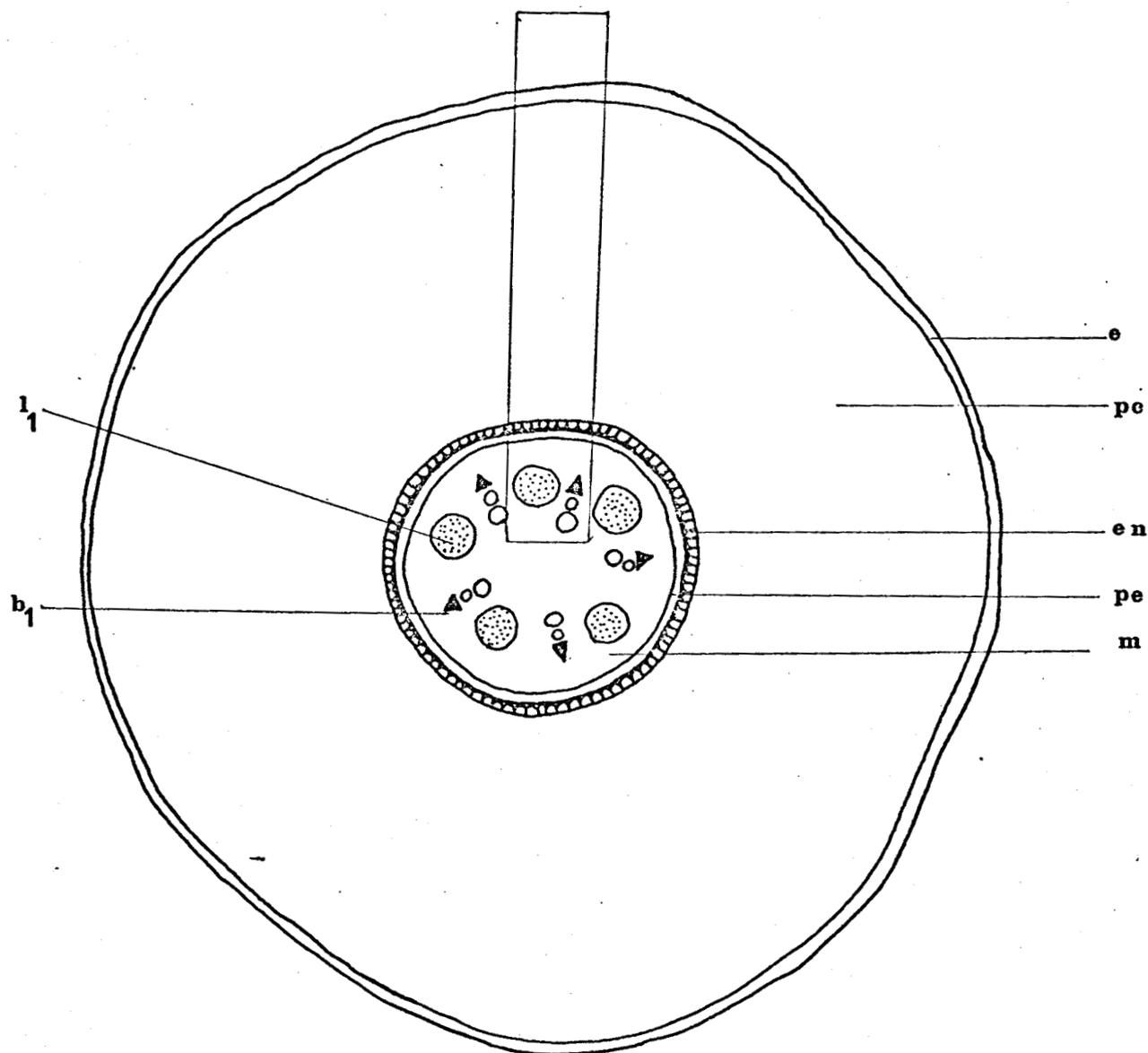


PLANCHE XI : Coupe transversale d'une racine témoin non "renflée", néoformée in vitro.

en : endoderme

pe : péricycle

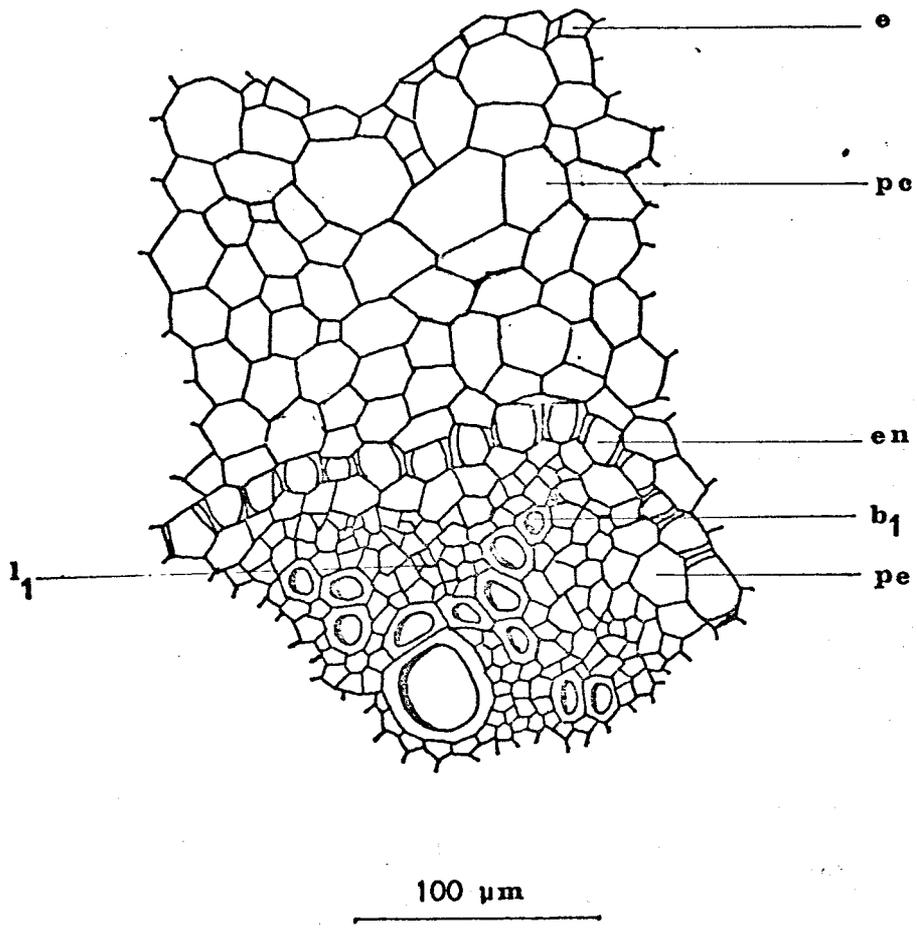


PLANCHE XII : Coupe transversale d'une racine témoin non "renflée", néoformée in vitro.



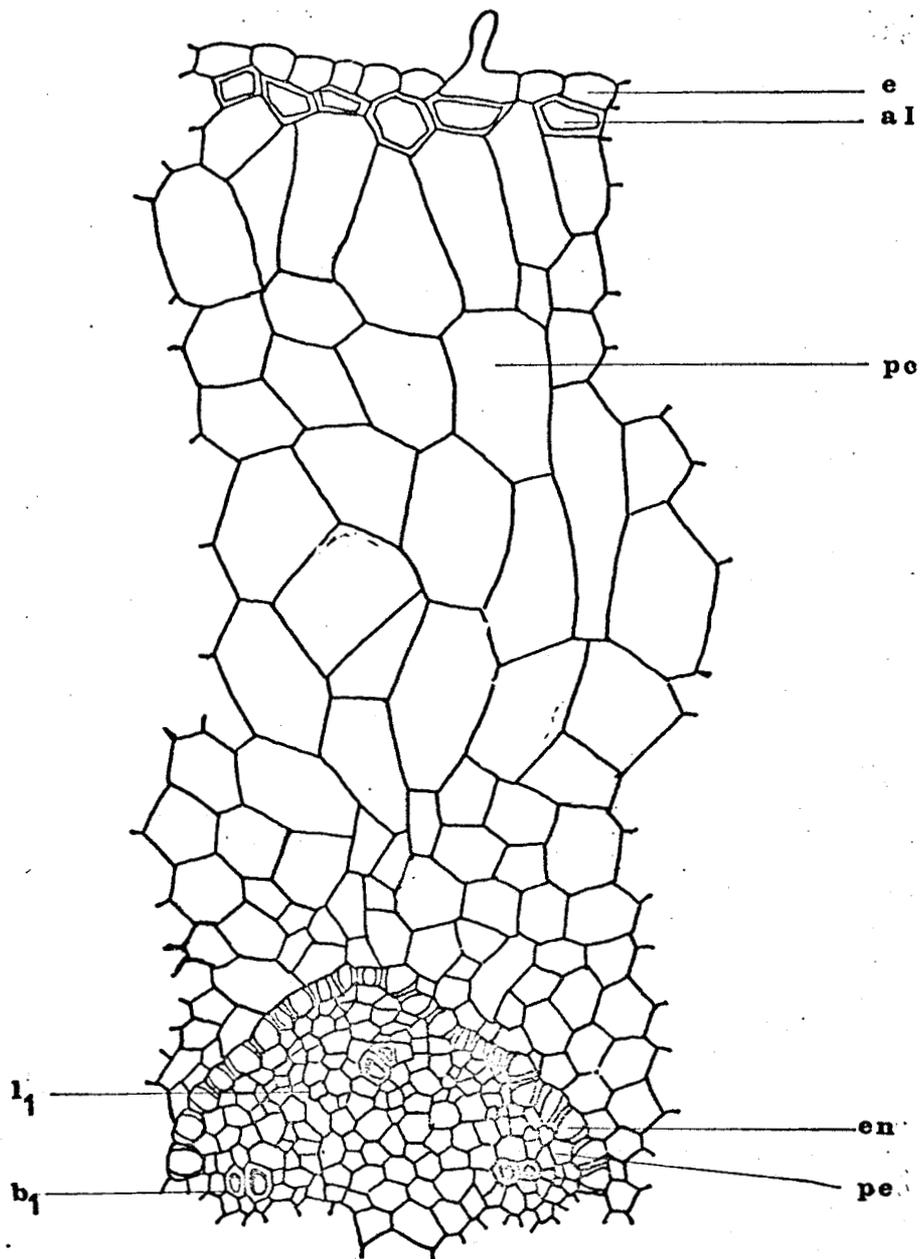


PLANCHE XIII : Coupe transversale d'une racine "renflée" en milieu liquide, semi-liquide.

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

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'entrenoeuds 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. 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'entrenoeuds 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'entrenoeuds. 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 de 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 les placer dans des conditions peu favorables.

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. L'action néfaste des températures basses s'explique si l'on tient compte du fait que le Manioc est essentiellement une plante tropicale.

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.
- BOIS (D.) - 1927.- Les plantes alimentaires chez tous les peuples et à travers les âges.
Encyclopédie biologique : 435-445.
- 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.
- BOURIQUET (R.) - 1960.- Recherches sur l'activité de quelques facteurs de croissance à l'égard des tissus végétaux cultivés in vitro.
Thèse, Paris 234 p. et Rev. Cytol. et Biol. vég., 21, 93-326.

- BUSSON (F.) - 1965.- Plantes alimentaires de l'Ouest africain
Thèse, Marseille.
- CAMUS (G.) - 1949.- Recherches sur le rôle des bourgeons dans les phénomènes de morphogenèse.
Thèse, Paris, 199 p. et Rev. Cytol. et Biol. vég., 11 : 1-195.
- CERIGHELLI (R.) - 1955.- Plantes vivrières - Cultures tropicales et
Nouvelle encyclopédie agricole.
Librairie J.B. Baillière et Fils, Paris.
- CHADEFAUD (M.) & EMBERGER (L.) - 1960.- Traité de Botanique systématique
Tome 2 : les végétaux vasculaires, fasc. II, Masson édit.
- CHANT (S.R.), MARDEN (J.A.) - 1958.- A method for the rapid propagation
of Cassava Cuttings.
Trop. agri. London, 35, n° 5 : 195-199.
- CIFFERI (R.) - 1942.- Fondamenti per una classificazione subspecifica della
Manihot esculenta Crantz.
Archivio botanico Forlì, 28 : 27-33.
- 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. Clermont-Ferrand.
- COURDUROUX (J.C.) - 1966.- Tubérisation et biologie de la Ficaire.
(Ficaria ranunculoides Moench)
Physiol. vég., 4 : 341-364.
- von CRANTZ (H.J.N.) - 1766.- Institutiones rei herbariae juxta nutum maturae
digestae exhibitu. Viennae (cité par Rogers, 1965).
- DEHAY (F.) - 1936.- L'appareil libéro-ligneux foliaire des Euphorbiacées.
Thèse Fac. Sci. Lille. Masson édit.

- ESASHI (Y.) - 1961.- Photoperiodic conditions for tuberization and sprouting in cutting plants.
Sci. Rep. Tohoku Univers. IV
Biol., 27 : 101-112.
- FAVIER (J.C.), CHEVASSUS-AGNES (J.), GALLON (G.) - 1969.- Les amyliacées du Cameroun.
Centre O.R.S.T.O.M. de Yaoundé Section nutrition.
- GARNER (W.W.), ALLARD (H.A.) - 1923.- Further studies in photoperiodism : the response of the plant to relative length of day and night.
J. Agric. Res., 23 : 871-920.
- GAUCHER (L.) - 1902.- Recherches anatomiques sur les Euphorbiacées.
Thèse Fac. Sci. Paris. Masson édit.
- 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'organogénèse" : 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.
- GAUTHERET (R.J.) - 1968.- Température et rhizogenèse 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 República Argentina n° 12.
- HERMANN (L.S.E.) - 1968.- Bibliografía da Mandioca,
Campinas, Instituto Agronômico, Boletim n° 182.
- HUTCHINSON (J.), DALZIEL (J.M.) - 1954.- Flora of West tropical Africa.
2e édition - Millbank, London SW1

- JACOBY (T.) - 1965.- Nutrition et fumure des plantes tropicales à tubercules (Manioc, patate douce, igname, arrow, cocoyam),
Bulletin vert Hannover 19
- 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.
- JULLIARD (B.) - 1964.- Interaction de l'auxine et de la gibberelline sur la rhizogenèse des boutures de Vigne (Vitis vinifera L.),
C. R. Acad. Sci. Paris, 258 : 5716-5719.
- 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.
- 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.
- LONGMAN (K.A.) - 1968.- Effects of orientation and root position on apical dominance in a tropical woody plant.
Ann. Bot. (Oxford), 32, n° 127 : 553-566.
- 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
- METCALFE (C.R.) and CHALK (L.) - 1950.- Anatomy of the Dicotyledons.
vol. 11 : 1206-1235
Oxford - At the Charendon Press.
- MONTALDO (A.) - 1967.- Bibliografía de raíces y tubérculos tropicales.
Revista de la facultad de agronomica de la Universidad central de Venezuela Alcana n° 13
- MIEGE (J.), OBATON (M.) - 1954.- Comportement anormal de la tubérisation chez un clône de Manioc.
J. Agr. Trop. Bot. Appl., 1, n° 11-12 : 407-413.
- 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.
- NITSCH (J.P.) - 1966.- Photopériodisme et tubérisation.
Bull. Soc. Fr. Physio. Vég., 12 : 233-246.
- NYSTERAKIS (F.) - 1954.- Contribution à l'étude du rôle de l'auxine sur la rhizogenèse.
8e Congr. Intern. Bot. Paris, sect. 11 (vol. 1) : 134-135.
- PHAM HUU DUNG - 1962.- Contribution à l'étude de la valeur alimentaire et de la toxicité du Manioc.
Thèse, doct. vét. Lyon.

PILET (P.E.) - 1961.- Les phytohormones de croissance.
Masson édit.

PORTUGUEZ ARIAS (J.D.), MOGILNER (I.) - 1967.- Crecimiento in vitro de raíces de Manihot esculenta Crantz en distintas condiciones de iluminación y temperatura.
Bonplandia (Corrientes) t. 11, n° 7 : 113-120.

PURSEGLOWE (J.W) - 1968.- Tropical crops, Dicotyledons,
1 and 2. Longmans London.

ROGERS (D.J.) - 1965.- Some botanical and ethnological considerations of Manihot esculenta Crantz.
Economic Botany, 19, n° 4 : 369-377.

SEIGNETTE (A.) - 1889.- Recherches anatomiques et physiologiques sur les tubercules.
Thèse Fac. Sci. Paris, 106 p.

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.

TKATCHENKO (B.) - 1959.- Rapport de la mission d'études aux U.S.A., Brésil,
Togo et en France sur la technologie et la culture du Manioc.
Tananarive, I.R.A.M.

TRIPATHI (B.K.) - 1972.- Nutrition minérale et rhizogenèse des tissus
de Topinambour cultivés in vitro.

Thèse Fac. Sci. Paris.

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.

