

ACADEMIE DE MONTPELLIER

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

THESE

présentée à l'université des Sciences et Techniques
du Languedoc pour obtenir le grade de :

Docteur d'Etat mention Sciences

LA CULTURE *IN VITRO* DES PROTOPLASTES DE MANIOC
(*MANIHOT ESCULENTA CRANTZ*)
ETUDE DES POSSIBILITES D'INDUCTION D'UNE RESISTANCE
A LA BACTERIOSE PROVOQUEE PAR LE *XANTHOMONAS MANIHOTIS*

par

Joseph **MABANZA**

Docteur - Ingénieur

soutenue le 26 Juin 1984 devant la Commission d'Examen

JURY :

R. JONARD

Président

Y. DEMARLY

Y. MEYER

N. PARIS-PIREYRE

F. HALLE

J. HUGARD

R E M E R C I E M E N T S

Ce travail de recherche a été réalisé au Laboratoire d'Histophysiologie et de Radiobiologie Végétale de l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc (USTL) sous la direction du Professeur JONARD.

Qu'il me soit permis de lui exprimer toute ma gratitude pour avoir accepté de me recevoir dans son Laboratoire, pour les facilités mises à ma disposition tout au long de mon séjour en France, ainsi que les conseils qu'il m'a prodigués.

Je remercie très sincèrement le Professeur DEMARLY pour l'intérêt particulier qu'il a porté à mon travail. Dans son Laboratoire, j'ai appris à me familiariser avec la technique délicate de la culture des protoplastes végétaux. Qu'il soit assuré de toute ma gratitude.

Que Monsieur MEYER, Chercheur CNRS au Laboratoire de Physiologie Végétale de l'Université de Perpignan trouve ici ma profonde gratitude. Il a constamment soutenu mes efforts en me faisant bénéficier de ses conseils dans le domaine de la culture des protoplastes.

Je remercie également Monsieur CHUPEAU, Chercheur au CNRA de Versailles, qui a bien voulu me faire profiter de son expérience sur la culture des protoplastes végétaux. Nous avons eu des discussions qui ont beaucoup apporté à mon travail.

L'examen des chloroplastes des différents cals

issus du développement des protoplastes a été effectué au Laboratoire de Physiologie Végétale du Professeur PARIS-PIREYRE. Des photos ont également été mises à ma disposition. Qu'elle trouve ici ma profonde gratitude.

J'ai apprécié très vivement l'honneur que m'a fait Monsieur HALLE, Professeur à l'Institut de Botanique de Montpellier, de faire partie de mon jury.

Je tiens à témoigner aussi ma reconnaissance à Messieurs SCHWENDIMAN (GERDAT) et VILLEMUR (ENSA de Montpellier) qui m'ont accueilli dans leur Laboratoire, pour des différents examens cytologiques.

Mes remerciements s'adressent également à Madame BAYONOVE pour ses conseils et à mes amis du Laboratoire.

PLAN

	Pages
I - <u>INTRODUCTION</u>	1
II - <u>HISTORIQUE</u>	11
2.1. <u>LES PROTOPLASTES VEGETAUX</u>	12
2.2. <u>LE MILIEU SELECTIF</u>	14
2.3. <u>L'HYBRIDATION SOMATIQUE</u>	18
III - <u>MATERIELS ET METHODES</u>	24
3.1. <u>MATERIEL VEGETAL</u>	25
3.2. <u>METHODES</u>	26
3.2.1. Le choix du dispositif expérimental.....	26
3.2.2. Le bouturage in vitro du M.glaziovii Muell	28
3.2.3. Culture de l'apex caulinaire.....	29
3.2.4. Culture du cotylédon.....	29
3.2.5. Préparation de la manihocine.....	30
3.2.6. Le milieu de culture des protoplastes...	33
3.2.7. Isolement et culture des protoplastes...	34
3.2.8. Culture de protoplastes dans le milieu avec manihocine.....	36
3.2.9. La fusion des protoplastes.....	37
3.2.10 Les conditions d'environnement.....	38
IV - <u>RESULTATS ET DISCUSSIONS</u>	39
4.1. <u>OBTENTION SUR LES DEUX ESPECES PAR MICRO- BOUTURAGE INTENSIF DU MATERIEL VEGETAL PROPRE A L'ISOLEMENT DES PROTOPLASTES</u>	40
4.2. <u>ETUDE DES POSSIBILITES DE REGENERATION DES CALC DE MANIOC</u>	48
4.2.1. Culture de l'entre-noeud du pétiole et du limbe.....	48
4.2.2. Culture du cotylédon.....	48
4.2.3. Le développement in vitro des apex caulinaires.....	51
4.2.4. Discussion.....	54
4.3. <u>ISOLEMENT ET CULTURE DES PROTOPLASTES CHEZ LES DEUX ESPECES</u>	55
4.3.1. Isolement des protoplastes.....	55
4.3.2. La mise en culture des protoplastes.....	57
4.3.2.1. Culture des protoplastes de Manihot esculenta Crantz.....	57
4.3.2.1.1. Le bourgeonnement des proto- plastes.....	59
4.3.2.1.2. La prolifération par clivage....	63

4.3.2.2. Action de différents facteurs sur le développement des protoplastes de manioc.....	65
4.3.2.2.1. Le milieu de culture.....	65
4.3.2.2.2. L'apport en Ca Cl ₂ 2H ₂ O.....	67
4.3.2.2.3. L'apport en NH ₄ NO ₃	67
4.3.2.2.4. L'apport en mannitol.....	71
4.3.2.2.5. Les apports en phytohormones....	73
4.3.2.2.6. Le rôle de la densité de culture	75
4.3.2.2.7. Le rôle de la température.....	78
4.3.2.2.8. Les différentes voies d'évolution du protoplaste.....	79
4.3.2.3. Conclusion et discussion sur la culture de protoplastes de Manihot esculenta Crantz.....	82
4.3.2.4. Le développement in vitro des protoplastes de Manihot glaziovii Muell	84
4.3.2.4.1. Le développement des protoplastes en milieu liquide.....	84
4.3.2.4.2. Le développement sur milieu gélosé.....	85
4.3.2.4.3. Les facteurs qui influencent le développement des protoplastes de M. glaziovii dans le milieu M : les densités de culture.....	85
4.3.2.4.4. Discussion.....	88
4.3.3. Conclusion sur l'isolement et la culture des protoplastes des espèces M. esculenta Crantz et M. glaziovii Muell.....	88
4.4. <u>ETUDE DES SYSTEMES D'OBTENTION D'UNE VARIATION ORIENTEE DANS LE SENS DE LA RESISTANCE DU MANIOC A LA BACTERIOSE.....</u>	90
4.4.1. L'utilisation d'un milieu sélectif à manihocine.....	90
4.4.1.1. Mise en évidence de l'effet toxique de la manihocine.....	90
4.4.1.2. Culture des protoplastes dans le milieu à manihocine.....	93
4.4.1.2.1. La survie des protoplastes dans le milieu à manihocine.....	93
4.4.1.2.2. La mortalité dans le milieu de manihocine.....	97
4.4.1.2.3. L'évolution des protoplastes de M. esculenta Crantz dans le milieu à manihocine.....	106

4.4.1.2.3.1. Division par clivage.....	106
4.4.1.2.3.2. Le bourgeonnement.....	110
4.4.1.2.3.3. Efficience de la culture dans le milieu à manihocine.	112
4.4.1.2.3.4. Discussion et conclusions sur la culture des proto- plastés dans le milieu sélec- tif à manihocine.....	113
4.4.2. Les hybridations somatiques.....	114
4.4.2.1. Obtention de fusion de protoplastes chez le manioc.....	114
4.4.2.2. Vérification de l'allofusion.....	116
4.4.2.3. Evolution des cultures après les expériences de fusion.....	120
4.4.2.4. Observation de différents types de cals en milieu liquide.....	123
4.4.2.5. Evolution des trois catégories de cals en milieu liquide.....	125
4.4.2.6. Le développement des cals hybrides sur milieu gélosé.....	127
4.4.2.7. Discussion sur l'évolution des proto- plastés après l'opération de fusion..	132
4.4.3. Conclusion sur le système d'obtention d'une variation orientée dans le sens de la résistance du manioc à la bacté- riose.....	133
4.5. <u>LES ESSAIS DE REGENERATION DE PLANTES A PARTIR DES PROTOPLASTES</u>	136
4.5.1. La voie organogène	137
4.5.2. Essai d'obtention des embryoïdes.....	138
4.5.3. Discussion sur les essais de régénéra- tion de plantes à partir de protoplastes	140
V - <u>CONCLUSIONS GENERALES</u>	141
VI - <u>BIBLIOGRAPHIE</u>	156
VII - <u>ANNEXES</u>	189

A B R E V I A T I O N S

AG = acide gibberellique.

ANA = acide naphtalène acétique.

BAP = benzylaminopurine.

HEC = hydroxyéthylcellulose.

MS = milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962).

MT = milieu de culture témoin préparé avec le substrat carboné, hydroxyéthylcellulose. Ce témoin a subi le même procédé de purification que la manihocine.

MX = milieu sélectif confectionné avec la manihocine, extrait toxique purifié, obtenu à partir du filtrat de culture de *Xanthomonas manihotis*.

PEG = polyéthylèneglycol

I - INTRODUCTION

Le manioc ne présentait aucun parasite économiquement important jusqu'en 1973 où les cultures du Congo ont été envahies par la cochenille, *Phenacoccus manihoti* Mathilde Ferero. Ces cochenilles envahissent les plantations en saison sèche et attaquent les zones apicales des plantes dont les pousses s'atrophient et restent sans feuilles. Les plantations situées dans les vallées riches ou sur des sols argileux peuvent supporter ces attaques et repartent en végétation dès la chute des premières pluies. Sur des sols sableux et pauvres par contre, ces attaques peuvent conduire à une catastrophe, en produisant un dessèchement complet des plantes avant l'arrivée des pluies. Des problèmes d'approvisionnement en manioc, denrée alimentaire de premier plan pour le pays se posent alors d'autant qu'en 1976, un autre type de dégâts apparaissait cette fois-ci en saison des pluies. Ce deuxième fléau était une bactériose due au *Xanthomonas campestris pathovar manihotis*. Plus limitée dans les régions forestières que dans les régions des savanes, cette bactériose se manifeste surtout dans les régions à forte pluviométrie. Les symptômes associés sont les taches angulaires sur feuilles, le flétrissement du lobe foliaire et de la feuille, l'exsudation de gomme et le dessèchement des rameaux. Dans le cas des variétés particulièrement sensibles, les plantes dépérissent (BANTSIMBA et MABANZA 1976, DANIEL et al. 1978).

Les deux fléaux, plus ou moins confondus par l'exploitant agricole qui leur donne la dénomination commune d'Appolo", font l'objet d'un programme de lutte. En ce qui concerne la cochenille, la lutte biologique par élevage et lâcher d'auxiliaires a été choisie. La lutte contre la bactériose impose en revanche l'utilisation de variétés

résistantes. Ce qui a nécessité la mise sur pied en 1976 des collections de cultivars de manioc en vue de l'amélioration et du criblage des cultivars vis-à-vis de leur résistance à la bactériose due au *Xanthomonas manihotis* (MABANZA 1980) (fig. 1).

Les travaux commencés dès 1976 ont montré que les cultivars congolais possèdent une certaine variabilité en ce qui concerne leur sensibilité à la bactériose (fig. 2, annexes 1, 2, 3). Parmi les 100 cultivars caractérisés au cours des années 1976, 77, 78, 79, certains se montrent moins sensibles que d'autres à la maladie. Au cours de nos travaux récents (MABANZA, 1982), nous avons pu mettre en évidence une différence appréciable des effets de l'extrait toxique de culture de *X. manihotis* (manihocine) entre les cultivars sensibles de *Manihot esculenta* Crantz et le cultivar de l'espèce *Manihot glaziovii* Muell. résistante à la maladie. Des différences de sensibilité à la manihocine entre les cultivars plus sensibles de *M. esculenta* Crantz (MM 78 et CB) et les cultivars moins sensibles (Malela 1 et MA 255) (MABANZA 1982) ont également été décelées.

Cette variabilité des cultivars congolais peut donc être utilisée dans la lutte contre les attaques de la bactériose. Les cultivateurs ont mis à profit cet avantage en remplaçant peu à peu les cultivars traditionnellement multipliés par ceux qui manifestaient un comportement satisfaisant vis-à-vis de cette bactériose.

L'adoption des cultivars "tolérants" si elle a évité une pénurie en manioc ne permet cependant pas de déboucher sur une amélioration générale de la production. La plupart de ces cultivars qui n'étaient pas toujours très productifs pouvaient perdre parfois l'extrémité de leurs tiges par un flétrissement occasionné par la bactériose. Ce dernier point a conduit les populations à



Fig. 1: LA COLLECTION DES CULTIVARS LOCAUX DE MANIOC
AU CONGO

Remarques: 1976 a marqué le début du programme de sélection et amélioration du manioc par la mise en place à Loudima au CRAL (Centre de Recherches Agronomiques de Loudima) d'une collection vivante de 65 cultivars collectés dans les régions avoisinantes cette même année. Chaque parcelle représentant un cultivar est composé de 3 lignes de 15 mètres espacées de 1 mètre, l'une de l'autre. La distance qui sépare une parcelle de l'autre est de 2 mètres. Les principaux objectifs sont: La conservation des ressources végétales, la caractérisation des cultivars locaux, le criblage des cultivars vis-à-vis des grands fléaux (Cochenilles, Bactérioses, Anthracoses et mosaïque) avec une priorité pour la lutte contre la bactériose provoquée par le Xanthomonas campestris "pathovar manihotis.



- A: Symptômes de flétrissement foliaire causé par les attaques de X. manihotis
- B: Sur les cultivars sensibles s'observent défoliation et dessèchement des rameaux.
- C: Les cultivars tolérants à la bactériose ne montrent que quelques flétrissements foliaires.



Fig. 2: Symptômes de bactériose causés par Xanthomonas manihotis observés sur la collection de manioc d'ODZIBA en 1981.

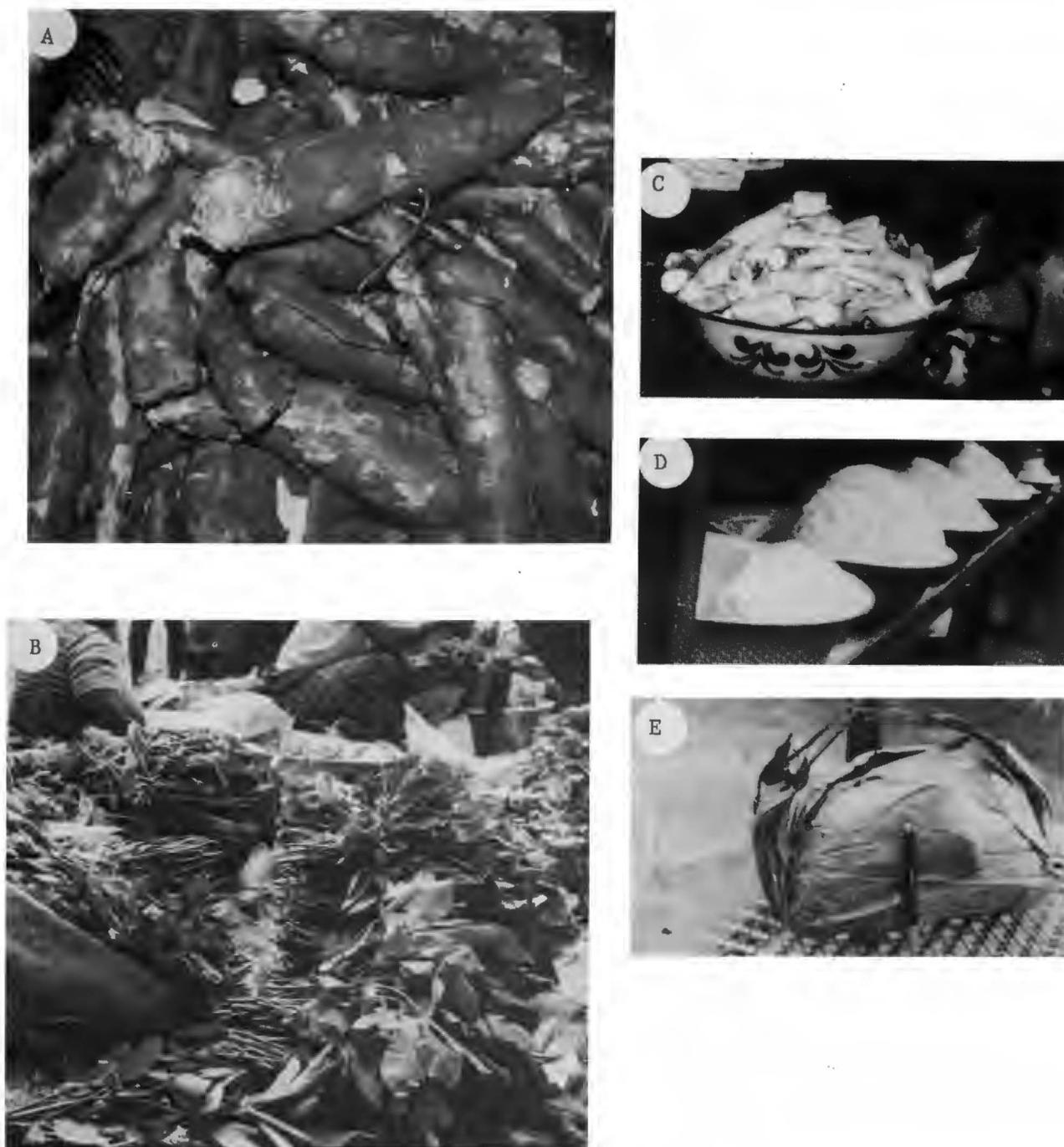
consommer pour une grande part les feuilles de l'espèce *M. glaziovii* Muell, résistante à la maladie. L'amélioration du niveau de résistance du manioc vis à vis de la bactériose mérite donc d'être poursuivie.

L'enrichissement du potentiel génétique congolais par l'introduction de clônes améliorés de l'I.I.T.A. (Institut International d'Agriculture Tropicale, basé à Ibadan au Nigéria), a été entrepris sous forme de semence (MABANZA, 1979 b, 1980 a). Les sélections faites à ce niveau ont permis l'obtention d'un certain nombre de clônes résistants à la bactériose. Mais le problème de la productivité restait toujours posé dans la mesure où leur niveau de production demeurait égal à celui des cultivars locaux multipliés dans les mêmes conditions (figure 4 annexe 4).

Dans ce travail, nous essaierons de mettre au point un dispositif expérimental permettant d'obtenir une variabilité orientée dans le sens d'une résistance accrue des cultivars congolais aux attaques de *Xanthomonas campestris pathovar manihotis*.

Le matériel choisi pour cette étude étant le protoplaste mésophyllien des cultivars sensibles à la bactériose, une approche cellulaire des problèmes d'induction de la résistance à une maladie est ainsi envisagée.

Le protoplaste des cellules végétales semble actuellement être l'outil approprié pour une recherche de l'augmentation des variabilités chez les espèces agricoles (CARLSON 1973, SHEPARD et al. 1980, EVANS 1982), soit par hybridation somatique avec d'autres espèces, soit par culture dans un milieu sélectif (EARLE 1978), si l'on admet que le cytoplasme d'une cellule est en interaction constante avec son environnement (PERSON et al. 1976, DEMARLY 1977, DALY 1977, EARLE 1978). A l'aide du système toxine-protoplaste, on peut envisager une mo-



Produits de récolte de manioc: A) Tubercules
B) Feuilles

Produits de transformation :-Tubercules épluchés (C)
-Farine (foufou) obtenue à partir des tubercules.(D)
-Chikouangue, pâte obtenue après rouissage des tubercules, enveloppée dans des feuilles et cuite.(E)

Fig. 3: UTILISATION COMMERCIALE DU MANIOC.



Fig. 4: L'AUGMENTATION DE LA VARIABILITE GENETIQUE ET L'INTRODUCTION DES MANIOCS AMELIORES DE L'IITA

Le rassemblement du potentiel génétique pour la lutte contre la bactériose (*X.manihotis*) a été effectué dans 2 directions privilégiées: la première est la mise en collection des cultivars locaux, la seconde, l'introduction des variétés améliorées résistantes à la bactériose de l'IITA. Cette introduction est faite sous forme de graines semées sur 2 points de sélection (Loudima = A et Mbé = B, actuellement Odziba) avec environ 5.000 graines, Mbé étant le point où la bactériose a sévi en 1976-77. (l'inexistence des flétrissements indique que ces plantes sont résistantes à la maladie).

dification du matériel génétique cytoplasmique de façon à induire une résistance à la toxine qui permettra ainsi une survie de la cellule dans un milieu de culture renfermant la toxine. En 1981, HEITEFUS remarquait qu'indépendamment d'une résistance génétiquement déterminée, les plantes ont une possibilité d'acquérir une résistance induite vis à vis des effets néfastes d'un micro-organisme, résistance déclenchée par une activation biologique, biochimique ou même chimique (DALY 1977, GOODMAN et al. 1977).

C'est avec cet espoir que nous avons entrepris cette expérimentation ambitieuse. Compte-tenu de la complexité des problèmes à étudier, nous avons été amenés à mettre au point tout d'abord des techniques de multiplication rapide *in vitro* de notre matériel végétal, puis à étudier les potentialités organogènes de nos cultivars. Or, ces potentialités se sont manifestées au niveau des colonies tissulaires issues des organes juvéniles comme les apex caulinaires et les cotylédons isolés *in vitro*. Nous avons alors obtenu la formation de plantes entières nombreuses en un temps court (MABANZA, 1982, MABANZA et JONARD 1981, 1983**b**). Dans un deuxième temps, les effets toxiques de la manihocine, notables sur les cultivars sensibles à la bactériose et non décelables sur l'espèce résistante à la maladie (*Manihot glaziovii* Muell) ont été également analysés. C'est seulement dans un troisième temps que l'isolement des protoplastes a été réalisé sur les deux espèces (*Manihot esculenta* Crantz et *Manihot glaziovii* Muell), compte tenu des résultats encourageants fournis par les premières expérimentations *in vitro*.

La multiplication rapide *in vitro* de *Manihot glaziovii* Muell a permis en particulier de disposer dans nos expériences d'une espèce résistante à la bactériose. Des essais d'induction d'une variabilité apportant une

résistance du manioc à la bactériose ont été alors réalisés par la culture des protoplastes dans un milieu sélectif composé de manihocine, mais également par des hybridations somatiques entre le *Manihot esculenta* Crantz sensible et le *Manihot glaziovii* Muell résistant; toutes ces expérimentations étant suivies d'essais de régénération de plantes à partir de clones issus de protoplastes.

II - HISTORIQUE

2 - 1. LES PROTOPLASTES VEGETAUX

Récemment, BINDING et al. (1982) ont dressé une liste de 19 familles chez lesquelles une régénération de plantes entières, à partir de protoplastes, a pu être obtenue. Malgré ce succès remarquable, la majorité des travaux signale les nombreuses difficultés rencontrées. Pour la plupart des auteurs, la réussite du travail sur les protoplastes végétaux nécessite une obtention de protoplastes viables en quantité suffisante, une forte aptitude à former leurs parois et à proliférer par clivage cellulaire, un bon développement des cals, mais également des capacités élevées de régénération chez les espèces végétales étudiées.

Ces différentes conditions paraissent plus facilement réalisables sur les protoplastes de certains genres et espèces appartenant notamment à la famille des solanacées : *Nicotiana* (NAGATA et TAKEBE 1970, DURAND 1979, BELLIARD et PELLETIER 1978), *Solanum* (GRUN et SHU 1978, O'HARA et HENSHAW 1982, THOMAS 1981, GUNN et SHEPARD 1981 ; JIA et POTRYKUS 1981 ; SHEPARD 1980, SHEPARD et TOTTEN 1977), *Lycopersicum* (IMANISHI et HIURA 1982 ; SINK et NIEDZ 1982 ; MORGAN et COCKING 1982), *Pétunia* (SINK et POWER 1977, BERGOUNIOUX et al. 1980).

Des résultats remarquables ont été également obtenus avec quelques légumineuses telles que *Crotalaria juncea* (RAMANUJA RAO et al. 1982), *Medicago sativa* (LU et al. 1982) ; *Trigonella corniculata* (LU et al. 1982), *Trigonella foenum graecum* (SHEK HAWAT et GALSTON 1983) et quelques graminées comme *Panicum maximum* (LU et al. 1981), *Pennisetum americanum* (VASIL et VASIL 1981), *Pennisetum purpureum* (VASIL et al. 1983) et *Bromus inermis* (KAO et al. 1973).

Il faut cependant noter que cette technique reste d'une utilisation aléatoire pour beaucoup de monocotylédones. En ce qui concerne les espèces ligneuses, seules quelques rutacées (*Citrus sinensis* : VARDI et al. 1982) et euphorbiacées (*Manihot esculenta* Crantz : SHAHIN et SHEPARD 1980), ont donné des résultats exploitables. Et, pour une même espèce, l'influence du cultivar est marquée comme d'ailleurs pour tous les essais de régénération *in vitro* à partir de cellules ou divers organes mis en culture. Ainsi, TABAEIZADEH (1983) a noté la difficulté d'obtenir des plantes entières à partir des plantes de *Lycopersicum esculentum* alors que sur la même espèce, MORGAN et COCKING (1982) obtenaient une régénération.

Différents facteurs vont influencer l'évolution en culture des protoplastes isolés, à savoir :

- le génotype de la plante mère (BINDING et al. 1981, MORGAN et COCKING 1982, SHAHIN et SHEPARD 1980, TABAEIZADEH 1983) et son âge (SHEPARD et TOTTEN 1977).

- Les conditions de culture de la plante-mère.: SHAHIN et SHEPARD (1980) conseillent de fournir à la plante une nutrition azotée abondante et pensent que pour obtenir des résultats satisfaisants, les plantes-mères doivent être ainsi "préconditionnées".

- La technique d'isolement des protoplastes : SHAHIN et SHEPARD conseillent pour le manioc de conserver les feuilles dans une solution contenant 1 mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 mM de NH_4NO_3 , 1 ppm d'ANA et 5 ppm de BAP pendant 48 heures à l'obscurité à 4°C avant l'isolement des protoplastes.

- la solution enzymatique employée : pour MEYER (1981), les enzymes de macération sont souvent à l'origine de la mortalité des protoplastes observée en culture.

- La composition du milieu de culture : les milieux essayés dans nos travaux antérieurs (MABANZA 1982)

ne nous ont pas fourni de bons résultats (milieu WO 6 de MEYER 1981 ; milieu T 0 et T 1 de CABOCHE 1980 et milieu CL de SHAHIN et SHEPARD 1980), alors que le milieu M que nous avons personnellement mis au point a initié la division par clivage chez la presque totalité des cellules dans les mêmes conditions de culture. De même, les auteurs pensent que l'agarose purifiée fournit de meilleurs résultats que la gélose habituellement employée en culture des tissus (LORZ et al., 1983).

- Les conditions de culture, température et éclairage jouent également un rôle important dans le développement des protoplastes.

En dernière analyse, nous constaterons que des résultats remarquables ont été obtenus depuis les années 1970 en ce qui concerne la régénération d'une plante à partir de protoplastes sur beaucoup d'espèces, la famille des solanacées renfermant les espèces aux réactions les plus favorables.

Pour de nombreux auteurs spécialisés, CARLSON (1973), SHEPARD et al. (1980), EVANS (1982) et COCKING (1973), lorsque les conditions sont réunies pour une bonne régénération de plantes entières, la culture des protoplastes végétaux apparaît alors comme une voie nouvelle d'augmentation de la variabilité en vue d'une amélioration des espèces cultivées.

2 - 2. LE MILIEU SELECTIF

D'une manière générale, l'ampleur des modifications caryologiques, taux de ploïdie, nombre de chromosomes, semble être liée en culture *in vitro*, aux conditions de culture des implants (durée prolongée dans le milieu de culture, formation d'un cal important). Mais aussi, beaucoup d'auteurs reconnaissent aujourd'hui une grande variabilité au sein d'une population formée

de plantes issues de culture *in vitro*, soit au niveau biochimique (composantes, biosynthèses des pigments), soit au niveau phénotypique chez les plantes obtenues. LUTZ (1969) a été le premier à signaler ces modifications à partir des clones unicellulaires. Il semble de nos jours qu'en dehors de tous ces changements couramment observés en culture des tissus (SKIRVIN 1977, SCHAEFFER 1981), l'implant étant séparé de la plante-mère, il s'établit un nouveau réseau de corrélations résultant de l'action du milieu qui occasionne en particulier des modifications par inter-action entre les gènes nucléaires et les informations cytoplasmiques (DEMARLY 1973). Ceci permettrait alors la formation d'individus nouveaux à l'origine de nombreux variants phénotypiques, régénérés en culture *in vitro*. Ces variants pouvant donc provenir d'une inter-action entre le génome nucléaire et le cytoplasme, avec à l'origine une modification héréditaire de l'environnement épigénétique : ADN des chloroplastes, mitochondries, plasmides ou épisomes. SIBI et BRANCHARD (1983) montrent que beaucoup de nouveaux phénotypes de plantes régénérées peuvent être transmissibles par voie femelle, chaque descendance se caractérisant par sa fixité pour le nouveau phénotype. Ainsi donc, lorsqu'on peut mettre au point un dispositif de travail permettant l'induction d'inter-actions spécifiques (système toxine-protoplastes par exemple), la régénération de plantes entières à partir de ces implants permettrait de sélectionner des individus capables de résister aux toxines.

Les résultats positifs obtenus à la suite de culture de protoplastes dans un milieu sélectif contenant une phytotoxine sont encore peu nombreux. La raison principale semble en être l'absence, pour beaucoup d'agents pathogènes, d'isolement ou de caractérisation des toxines associées. EARLE (1978) dresse la liste de 9 phytotoxines déjà caractérisées : la victorine sur l'avoine (SCHEFFER et al. 1964), l'helminthosporoside sur la canne à sucre

(STROBEL 1974, WHEELER 1976), la HC-toxine (SCHEFFER et al. 1964, STROBEL 1974), la HMT-toxine (COMSTOCK et al. 1973 et YODER 1973), toutes les trois sur le maïs, l'amylovorine sur la pomme (STROBEL 1977, SHU et GOODMAN 1978), l'alternariolide (KHOMOTO et al. 1976) et la phytoalternarine (TEMPLETON 1972, KASAI et al. 1975, cités par EARLE 1978) toutes les deux sur la pomme.

D'après EARLE (1978), trois critères sont à sélectionner pour la caractérisation d'une phytotoxine : (1) la toxine doit reproduire les symptômes caractéristiques de la maladie ; (2) les effets toxiques de la toxine devront être en rapport avec la virulence de l'agent pathogène ; (3) les effets toxiques seront plus marqués chez les cultivars sensibles que chez les cultivars résistants.

La majorité des bio-essais ont été effectués en appréciant les effets sur la croissance des racines des plantes de semis (maïs). Pour GENGENBACH et GREEN (1975), la HMT-Toxine inhibe seulement la croissance des maïs à cytoplasme T et non ceux à cytoplasme N. Certaines toxines réduisent la croissance des plantes comme chez BAJAJ et SAETLER (1970) avec *Pseudomonas phaseolicola*, ou même la croissance des cals (BEHNKE 1979 sur la pomme de terre). D'autres bio-essais ont été réalisés en appréciant la chlorose ou le flétrissement des feuilles, mais certains auteurs ont utilisé des expériences plus complexes avec dosages biochimiques tels que la fixation nocturne du CO₂ ou l'activité d'organites cellulaires isolés (EARLE 1978).

Dans la majorité des travaux, les cellules ou les protoplastes isolés se sont montrés beaucoup plus sensibles à l'action des toxines que les plantes-mères ou les colonies tissulaires. Cependant, bien que la mortalité due à la toxine soit grande, l'ensemble des travaux montre qu'on peut obtenir un effet sélectif sur la survie des protoplastes dans le système protoplastes-toxine (BEHNKE 1979, EARLE 1978).

L'avantage des protoplastes en amélioration végétale déjà souligné plus haut a conduit beaucoup de laboratoires à essayer la sélection par la culture *in vitro* de cellules résistantes aux herbicides ou à des inhibiteurs métaboliques etc... et la régénération de plantes entières à partir de ces cellules. Ainsi, pour CARLSON (1973), les plantes régénérées à partir des cellules résistantes à la méthionine sulfoximine ont montré une résistance accrue au *Pseudomonas tabaci*. GENGENBACH et GREEN (1975) ont sélectionné des cals résistants de maïs à cytoplasme T, cultivés sur milieu contenant la toxine HMT-toxine (bien que le cal résistant obtenu ait conservé son niveau de résistance jusqu'à plus de 30 mois, aucune plante n'a été cependant régénérée à partir de ce cal). BEHNKE (1979) par contre, a obtenu des plantes de pomme de terre résistantes au *Phytophthora infestans*. Des résultats semblables ont été enregistrés par MATTERN et al. (1978), sur 500 plantes de *Solanum tuberosum* régénérées à partir de protoplastes : la culture dans un milieu contenant des toxines d'*Alternaria solani* a permis l'obtention de plantes ne montrant que des lésions de faible dimension après l'attaque de la maladie. Pour GRACEN et al. (1971), l'utilisation de la toxine *in vitro* est un moyen de sélectionner rapidement des plantes de maïs résistant aux attaques de *H. maydis* race T.

Il convient donc de remarquer que les études sur l'acquisition de résistance dans un milieu sélectif ne permettent de donner entière satisfaction que lorsque les chances de régénération des plantes à partir des lignées cellulaires sélectionnées sont grandes.

Nous avons pu montrer (MABANZA, 1982), que le filtrat de culture de *Xanthomonas campestris pathovar manihotis* provoquait un flétrissement notable sur des organes des cultivars de manioc sensibles aux attaques de l'agent pathogène (sur lobes foliaires ou sur pousses de 15-20 mm des plantes cultivées *in vitro*), tandis que ceux du cultivar résistant (cultivar de *Manihot glaziovii*

muell) demeurent en vie et sans symptômes de flétrissement. Nous avons appelé Manihocine, le filtrat de culture de *Xanthomonas manihotis* concentré 10 fois et purifié. La manihocine sert dans nos expériences comme agent de criblage des cultivars et nous permet d'élaborer un milieu sélectif pour la culture des protoplastes.

2 - 3. L'HYBRIDATION SOMATIQUE

L'hybridation sexuée est utilisée depuis très longtemps pour accroître les rendements, introduire les gènes de résistance à certaines maladies et parfois pour améliorer les qualités nutritionnelles. L'hybridation sexuée entre le *Manihot esculenta* Crantz et le *Manihot glaziovii* Muell date des années 40. En 1947, NICHOLS l'a effectuée en Afrique de l'Est pour introduire chez le manioc une résistance aux virus de la mosaïque. Ce type de travail sera repris pour les mêmes raisons par STOREY et DOUGHTY (1951), JENNINGS (1972) en Afrique de l'Est et MAGOON (197) en Inde. Récemment, HAHN et al. (1973) au Nigeria à l'I.I.T.A. ont utilisé l'hybridation sexuée avec le *Manihot glaziovii* Muell pour l'obtention de variétés nouvelles résistantes à la bactériose provoquée par *Xanthomonas manihotis*.

Bien que quelques anomalies aient pu être constatées : mauvais appariement des bivalents, formation de beaucoup de chiasma pendant la meiose en F_1 (MAGOON et al. 1966, 1971), l'hybridation sexuée est réalisable entre ces deux espèces et les résultats satisfaisants obtenus par HAHN et al. (1973) montrent que le *Manihot glaziovii* Muell est un excellent géniteur pour l'introduction des gènes de résistance à la bactériose due au *Xanthomonas manihotis* chez le manioc.

Mais dans l'hybridation entre deux espèces différentes, les géniteurs n'ont souvent pas les mêmes aptitudes agricoles que le cultivar à améliorer. Ceci conduit généralement à l'utilisation de nombreux back-crosses pour la restauration de certains caractères comme la production en racines amyloacées pour le manioc. Cette opération réclame une expérimentation de longue durée utilisant une grande quantité de matériel végétal. L'hybridation somatique entre les deux espèces est une voie nouvelle qui permettrait l'obtention rapide de l'hybride résistant.

De plus, la fusion de protoplastes offre la possibilité de transférer l'information génétique du noyau mais également du cytoplasme d'un cultivar à un autre. Or, le transfert de cette information cytoplasmique est dans certains cas désirable en favorisant la formation d'un cytoplasme nouveau aux caractères d'un cytoplasme hybride. Au cours d'une telle fusion, plusieurs types d'informations sont transmis indépendamment les uns des autres : celles portées par les génomes nucléaires, les ADN de certains organites cellulaires, mitochondries, chloroplastes, et le mélange des deux cytoplasmes. Et cette "situation", créant des inter-actions nouvelles, conduira alors à l'obtention d'une plus grande variabilité dans la descendance.

CARLSON et al. (1972) ont initié la première expérience de fusion somatique et l'obtention de plante hybride entre *Nicotiana glauca* et *Nicotiana langsdorffi* en utilisant le nitrate de sodium comme agent de fusion. Puis, en 1974, KAO et MICHAYLUK, KAO et al. réalisent des fusions de protoplastes en utilisant le polyéthylène glycol (P.E.G.) entre *Vicia hajastana* et *Pisum sativum*. Et, de nos jours, de nombreuses techniques permettent la réalisation de fusion chez les protoplastes. Nous pouvons citer celle de l'électrofusion réalisée par SENDA et al. en 1982 entre les protoplastes de *Rauwolfia serpentina* et les protoplastes d'orge (*Hordeum vulgare*) ou de tabac

(*Nicotiana tabacum* et par VERHOEK-KOHLER et al. en 1983, sur les protoplastes d'*Avena sativa*. KAMEYA a développé en 1982 une technique de fusion avec le Dextran 500 000 sur *Brassica pekinensis*, *Petunia hybrida*, *Nicotiana tabacum* et *Daucus carota*.

Depuis la découverte du P.E.G. comme agent de fusion, les recherches sur la fusion de protoplastes ont abouti à la création de plusieurs plantes hybrides :

- des hybrides intraspécifiques : *Nicotiana tabacum* (BELLIARD et PELLETIER 1978, WALLIN et al. 1979 ; WULLENS et al. 1980 ; GLIMELIUS et BONNETT 1981); *Petunia hybrida* (BERGOUNIOUX et Al. 1980), *Datura innoxia* (SCHIEDER 1977).

- Des hybrides interspécifiques : *Nicotiana* (EVANS et al. 1981 ; DOUGLAS et al. 1981 ; NAGY et al. 1981 ; MENZEL et al. 1981 ; GLEDDIE et al. 1983).
Pétunia : (IZHAR et POWER 1979 ; KUMER et al. 1982).
Daucus : (KAMEYA et al. 1982).
Solanum : (BINDING et al. 1982).
Lycopersicum : (TABAEIZADEH, 1983).

- Des hybrides intergénériques : *Solanum tuberosum* + *Lycopersicum esculentum* MELCHERS et al., 1978), *Datura innoxia* + *Atropa belladonna* (KRUMBIEL et SCHIEDER 1979).
Arabidopsis thaliana + *Brassica campestris* (GLEBA et HOFFMAN 1980).
Daucus carota + *Aegopodium podagraria* (DUDITS et al. 1979).
Petunia hybrida + *Lycopersicum esculentum* et *Lycopersicum peruvianum* (TABAEIZADEH, 1983).

L'ensemble de ces travaux réalisés généralement sur des espèces herbacées, a contribué à l'introduction de certains gènes de résistances aux maladies. EVANS et al. ont en 1981, obtenu des hybrides résistant aux virus

de la mosaïque sur *Nicotiana tabacum* et *Nicotiana meso-philu* ou *Nicotiana stocktonii*. La fusion cytoplasmique a également été utilisée pour des essais d'induction de la stérilité mâle cytoplasmique chez le tabac (ZELCER et al. 1978, BELLIARD et PELLETIER 1978) et chez *Pétunia* (IZHAR et POWER 1979 ; BERGOUNIOUX et al. 1980).

Il est possible d'aboutir à l'obtention d'amphidiploïde stable (COCKING et al. 1981 ; POWER et al. 1976). Souvent, cependant, une instabilité des hétérokaryons est créée. On observe parfois une élimination partielle ou totale des chromosomes de l'un ou l'autre des parents (KAO 1977 ; BINDING et NEHLS 1978 ; GLEBA et HOFFMAN, 1980). De toute manière, lorsqu'elle est possible, l'hybridation somatique permet au moins de mélanger deux cytoplasmes. BELLIARD et al. (1978) ont effectué la fusion de protoplastes entre deux variétés de *Nicotiana tabacum* dont une possédant le cytoplasme de *Nicotiana debneyi* (inducteur de stérilité mâle). Les plantes obtenues contenaient un seul génome alors que le cytoplasme était issu de la fusion de deux cytoplasmes parentaux.

L'identification des plantes régénérées après fusion somatique se fait par diverses méthodes : analyses morphologiques (SCHIEDER et VASIL 1980 ; BINDING et al. 1982 ; GLEBA et HOFFMAN 1980 ; HOFFMAN et ADACHI, 1981), analyses cytologiques en étudiant par comparaison les caractéristiques et dimensions des chromosomes de chaque parent (GLEBA et HOFFMAN 1980, EVANS et al. 1981, GLIMELIUS et BONNETT 1981, DOUGLAS et al. 1981) ou des analyses biochimiques telles que celles des ADN mitochondriaux chez les hybrides de *Nicotiana tabacum* (BELLIARD et al. 1979 ; NAGY et al. 1981), avec identification alors d'un nouveau type d'ADN mitochondrial. L'ADN chloroplastique a également été analysé chez les plantes hybrides de

Nicotiana tabacum (BELLIARD et al. 1978), *Nicotiana debneyi* (SCOWCROFT et LARKIN 1981) chez les hybrides interspécifiques entre *Nicotiana tabacum* et *Nicotiana glauca* (FLIC et EVANS 1982), GLIMELIUS et al. (1981) signalent la présence de deux types d'ADN chloroplastiques parentaux chez les plantes hybrides (*Nicotiana tabacum* + *Nicotiana suaveolens*).

De nombreuses autres analyses biochimiques ont été réalisées au niveau d'enzymes diverses servant de marqueurs : estérases (GLEBA et HOFFMAN 1980, DOUGLAS et al. 1981), glucose-6-phosphate deshydrogenase (DUDITS et al. 1980), ribulose 1,5 - biphosphate carboxylase/oxygenase beaucoup utilisée de nos jours (TABAEIZADEH, 1983).

Pour terminer, il convient de signaler qu'une difficulté majeure existe encore sur la caractérisation des plantes hybrides : lors de la régénération de plantes de pomme de terre à partir de protoplastes, SHEPARD et al. (1980) ont signalé un effet culture *in vitro* sur la descendance en sélectionnant 10 000 variants pour le port de la plante, l'homogénéité des tubercules et la couleur de la peau, et même sur la résistance des plantes aux maladies. De plus, la culture *in vitro* des protoplastes peut provoquer des changements importants de caryotype (KARL et al. 1982). Pour WIDHOLM (1982), il n'existe pas encore de méthode universelle pour la sélection de produits issus de fusion de protoplastes. TABAEIZADEH (1983) a noté cette difficulté de préciser le caractère hybride des plantes issues d'expériences de fusion entre *Lycopersicum* et *Pétunia*. L'analyse biochimique suppose la connaissance parfaite des marqueurs biochimiques capables de conserver leurs propriétés dans le produit de fusion et dans le cas contraire, l'absence de l'expression d'une information génétique ne peut être la preuve de l'absence réelle de cette information. TABAEIZADEH propose une analyse plus fine des structures chromosomiques comme le "banding" et l'étude des diagrammes de restriction des

ADN mitochondrial et chloroplastique.

Tous les travaux d'hybridation somatique que nous venons d'étudier se sont déroulés exclusivement sur des espèces herbacées chez lesquelles, pour la plupart, des cas de régénération ont été signalés, ce qui n'est pas encore le cas pour beaucoup d'espèces agricoles, ou des espèces ligneuses comme le *Manihot glaziovii* Muell. Cependant, la facilité de l'obtention de l'hybride sexué entre les deux espèces de *Manihot* d'une part et d'autre part les potentialités organogènes observées chez le manioc (MABANZA 1982, SHAHIM et SHEPARD 1980) permettent de penser qu'il sera possible d'obtenir chez le manioc des résultats satisfaisants par l'hybridation somatique.

III - M A T E R I E L S E T M E T H O D E S

3 - 1. MATERIEL VEGETAL

Compte tenu des besoins de nos expérimentations, nous avons sélectionné trois cultivars de l'espèce *Manihot esculenta* Crantz (MM 78, Malela 1 et CB), un hybride issu des croisements sexués entre l'espèce *Manihot esculenta* Crantz et l'espèce *Manihot glaziovii* Muell (MA 255) et un cultivar de *Manihot glaziovii* Muell.

Contrairement au *Manihot esculenta* Crantz qui est un arbrisseau, *Manihot glaziovii* Muell est un arbre qui atteint 10 à 20 m. S'il ne fournit pas de racines amyloacées, *Manihot glaziovii* Muell a été multiplié pour la production du caoutchouc en Afrique de l'Est puis a été abandonné ensuite au profit de l'hévea (*Hevea brasiliensis*) (PURSEGLOVE 1977).

Depuis les années 40, le manioc, *Manihot esculenta* Crantz a fait l'objet de multiples programmes d'hybridation. Les résultats obtenus dans le but d'augmenter les teneurs en protéines (KOCH 1954, BOLHUIS 1969) de diminuer la teneur en acide cyanhydrique (HCN) ou dans le but d'obtenir des variétés résistantes aux maladies comme la mosaïque (NICHOLS 1947, STOREY et DOUGHTY 1951, MAGOON 1970) sont divers. De toutes les espèces de *Manihot* utilisées au cours des hybridations sexuées avec *Manihot esculenta* Crantz : *Manihot oligantha subpneusteli*, *Manihot tripartita*, *Manihot anomala*, *Manihot zethneri*, *Manihot tomentosa*, *Manihot tristis subsp. saxicola*, *Manihot procumbens*, *Manihot gracilis*, *Manihot dichotoma*, *Manihot catingae*, *Manihot melanobasis*, *Manihot glaziovii*, le *Manihot glaziovii* Muell a été l'espèce la plus souvent choisie dans les programmes, souvent à cause de sa résistance à la mosaïque (JENNINGS 1972 en Afrique de l'Est) et récemment pour sa résistance à la bactériose provoquée par *Xanthomonas manihotis* (HAHN et al. 1973 à l'I.I.T.A.).

Les résultats obtenus au cours de ces diverses hybridations avec ces nombreuses espèces sont multiples, mais très souvent, comme le constatent SILVESTRE et ARRAUDEAU, 1983, les coefficients de variation associés, assez élevés, ne permettent pas de tirer des conclusions valables de l'ensemble du travail. Les résultats peuvent être satisfaisants pour un caractère donné tel que la résistance aux maladies et par contre peu encourageants pour un autre, comme la productivité. Un croisement de *Manihot esculenta* avec *Manihot saxicola* ou *Manihot melano-basis* par exemple fournira une descendance à forte teneur en protéines, mais avec une teneur en HCN importante et une résistance à la mosaïque faible.

Le genre *Manihot* appartient à la famille des Euphorbiacées. L'ensemble des espèces de ce genre (environ 200 espèces) ont $2n = 36$ chromosomes. La ploïdie de *Manihot esculenta* Crantz reste cependant discutée. Pour GONZALES et LOPEZ, 1973 ; UMANAH et MARTMANN, 1973, le manioc est probablement une espèce triploïde avec un nombre de chromosomes de base $x = 9$. D'autre part, il semble que chez les hybrides entre *Manihot esculenta* et *Manihot glaziovii*, on constate certaines anomalies au niveau des bivalents. On peut observer en effet que l'appariement des chromosomes est parfois défectueuse chez certains bivalents ou que quelques uns présentent une séparation très précoce (MAGOON et al., 1966). Les chromosomes des deux espèces ont des dimensions très voisines : 21 à 32 μm pour *Manihot glaziovii* et 19 à 40 μm pour *Manihot esculenta*.

3 - 2. METHODES

3 - 2.1. Le choix du dispositif expérimental

Le choix du dispositif d'expériences est important pour établir une démarche expérimentale rigoureuse. On peut dresser un dispositif permettant une analyse statistique



Fig. 5: Bien qu'ayant un port semi rampant la MM 78 possède une grande souplesse d'adaptation à diverses zones écologiques (zones forestières, zones de savanes, sols argileux et argilo-sableux) son potentiel de production varie entre 30 et 50 T/ha.

Fig. 6: Fleurs femelles de *M. glaziovii* Muell . Fig. 7: Fleurs mâles de *M. esculenta* Crantz; Fig. 8: Rameau fructifère (*M. esculenta*).

La fertilité des cultivars congolais est très hétérogène. La plupart des cultivars fleurissent après 12 mois, ce qui rend parfois difficile l'observation des floraisons chez certains cultivars des collections dont les récoltes sont effectuées à 12 mois. Il est cependant facile de rencontrer des fructifications dans les plantations paysannes où le manioc reste en place pendant 3 ans. L'association de plusieurs cultivars opérée dans ces plantations a, sans doute, contribué à la création d'une grande variabilité au niveau du potentiel génétique en Afrique Centrale.

(dispositif blocs de Fisher ou dispositifs similaires) et faire l'analyse de la variance de principaux facteurs de variation, mais on peut également procéder par l'établissement des histogrammes lorsqu'on choisit d'indiquer la situation d'une expérience à un moment précis. Ce dernier dispositif plus souple peut se construire avec peu de répétitions mais manque souvent de précisions. Dans notre cas, les résultats antérieurs (MABANZA, 1982), nous indiquent que beaucoup de facteurs peuvent influencer le développement des protoplastes entre le 1er et le 30e jour de culture. Cela nous a imposé un rythme soutenu d'observations et de comptages, nous conduisant à tracer des courbes en fonction du temps. Dans ces expériences, souvent répétées 3 fois, les courbes tracées sont les moyennes des comptages effectués sur trois expériences successives. Le choix de courbes d'évolution des protoplastes dans le milieu de culture nous a donné entière satisfaction, dans la mesure où elles définissent à chaque moment de l'expérience les situations présentes dans le milieu de culture en suivant l'évolution des trois principaux phénomènes étudiés, à savoir la division par bourgeonnement, la division par clivage et la présence des cellules uniques. Les dispositifs d'analyse de la variance, dispositif blocs ou à répétitions ont été réservés à l'étude des effets du milieu sélectif sur les protoplastes, en étudiant l'importance de la mortalité et celle des divisions cellulaires. Nous avons choisi de présenter des histogrammes dans le but d'étudier les effets de l'apport de certains éléments nutritifs dans le milieu de culture et l'action de la manihocine sur les protoplastes.

3 - 2.2. Le bouturage in vitro du Manihot glaziovii Muell

Le microbouturage *in vitro* effectué dans nos travaux antérieurs a été opéré avec succès sur les culti-

vars de *Manihot esculenta* Crantz et sur l'hybride MA 255. La même technique a permis le bouturage *in vitro* de *Manihot glaziovii* Muell en deux temps : avec le démarrage des pousses sur le milieu de MURASHIGE et SKOOG gélosé et additionné de 0,5 mg/l de BAP et 0,1 mg/l d'ANA suivi du développement de la plante entière sur le même milieu ne renfermant qu'une faible concentration en auxine d'environ 0,05 mg/l d'ANA.

3 - 2.3. Culture de l'apex caulinaire

En ce qui concerne l'extrémité des tiges, des explants de 0,2 à 0,4 mm seront mis en culture. Ils sont extraits sous la loupe binoculaire (grossissement 25-50), dans des conditions aseptiques, à l'aide d'un fragment de lame de rasoir monté sur mandrin. Le méristème une fois isolé, est transféré immédiatement sur le milieu gélosé de MURASHIGE et SKOOG (MS). Après un séjour dans un premier milieu, le milieu 1 (MS + 0,5 mg/l de BAP, 1 mg/l d'ANA et 0,1 mg/l d'AG3), deux transferts successifs sont nécessaires dans le milieu 6 (MS + 0,5 mg/l de BAP et 0,1 mg/l) puis le milieu 15 (MS + 0,05 mg/l d'ANA).

3 - 2.4. Culture du cotylédon

Les graines mûres fournies par l'I.I.T.A. sont des semences hybrides reconnues résistantes à la bactériose. Les fruits ont été fournis de la Côte d'Ivoire par le GERDAT. Selon le stade de maturation des fruits, nous avons distingué trois catégories d'explants : fruits cueillis au stade laiteux, au stade pâteux ou juste avant maturité.

Les graines sont sectionnées à leurs deux extrémités de façon à enlever la gemmule et l'hypocotyle et à casser facilement la coque dure qui recouvre l'ensemble albumen - cotylédon. Les cotylédons se présentant sous

l'aspect de deux feuilles minces emprisonnées entre deux masses d'albumen, sont prélevés avec des pinces brucelles de 20 cm de long et mis en culture dans des tubes à essais contenant le milieu 3 de composition suivante : MS + 1 mg/l de BAP, 1 mg/l d'ANA et 0,1 mg/l d'AG 3.

3 - 2.5. Préparation de la manihocine

La caractérisation de *Xanthomonas campestris pathovar manihotis* a été faite au Congo par DANIEL et al. (1978).

L'isolement des souches de *Xanthomonas campestris pathovar manihotis* utilisées s'est fait à partir des taches foliaires sur des feuilles fraîchement attaquées en champs au Congo. La méthode d'isolement utilisée est celle décrite par BRADBURY (1978). Une fois isolée, la souche de *Xanthomonas campestris pathovar manihotis* est conservée dans de l'eau stérile en flacon de 20 ml à l'obscurité et à 4° C et peut être conservée pendant 9 mois environ.

Après deux jours de culture sur le milieu L P G A (voir composition ci-après), le parasite a proliféré et formé des bandes de 2 à 3 mm de largeur. Avec une lame de scalpel, nous prélevons en surface une partie de cette colonie bactérienne que nous ensemençons dans le milieu de culture liquide (voir composition ci-après), en erlen meyer contenant 100 ml de milieu. Après un passage de 48 heures à l'agitateur rotatif, à l'obscurité et à 25° C, la culture est récupérée puis centrifugée à 2500 tours par minute. Le surnageant est passé au travers d'un filtre de 0,45 μ m et constitue le filtrat de culture. La purification de la toxine est alors effectuée selon la figure n° 9. La toxine purifiée constitue la manihocine utilisée dans nos expériences sur les protoplastes.

Milieux d'ensemencement de Xanthomonas Campestris
pathovar manihotis

- Milieu L P G A (levure - peptone - glucose - agar agar) :
en gramme par litre de milieu

Extrait de levure	5
Bactopeptone	5
Glucose	10
Agar agar	20.

Le pH est ajusté à 7 avec de l'HCl avant le passage à l'auto-clave à 115° C pendant 20 mn.

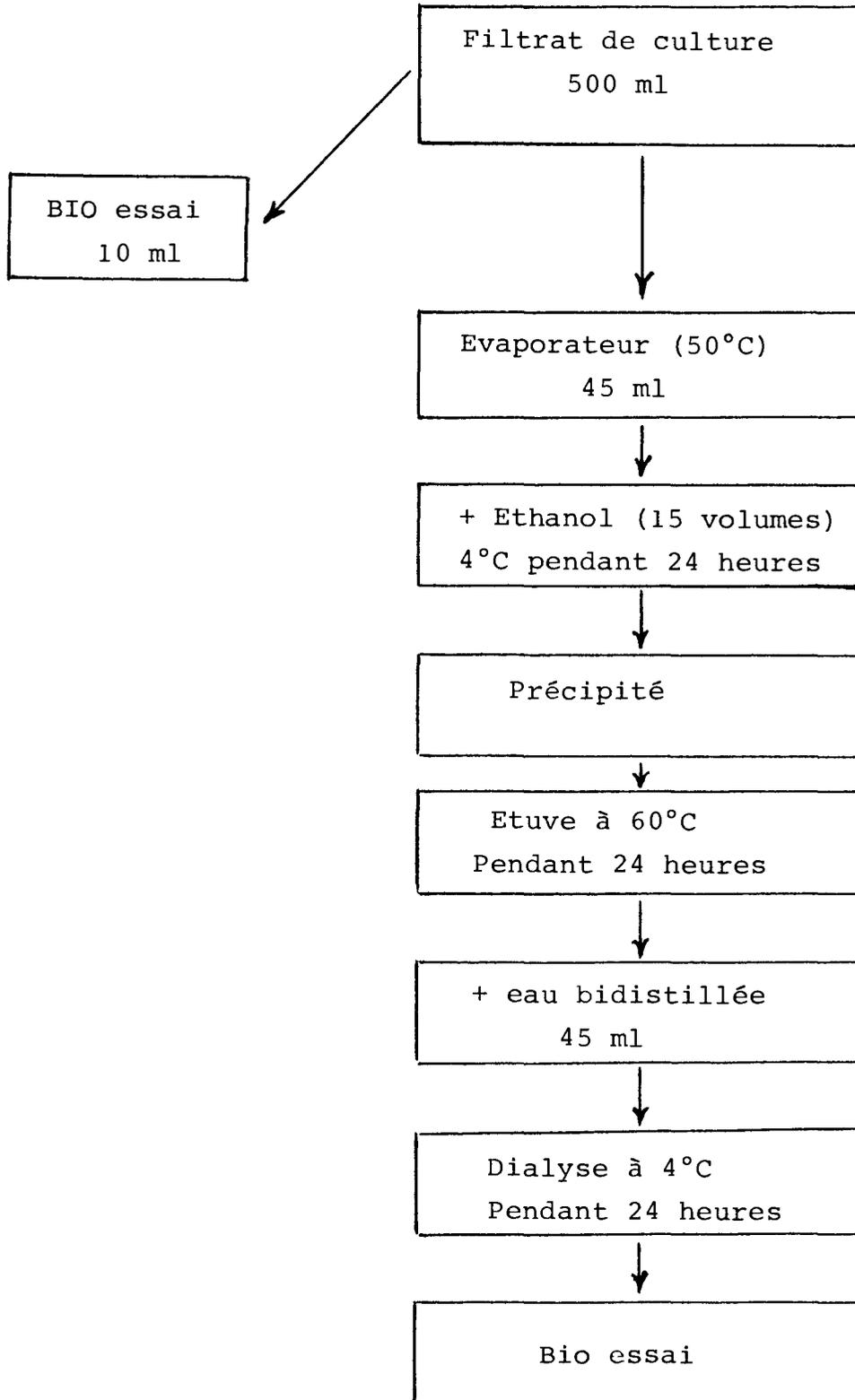
- Milieu liquide de culture de *Xanthomonas campestris pathovar manihotis*, milieu composé par MADJIDI (1980) : en gramme par litre de milieu

KH_2PO_4	5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5
MgSO_4	0,2
NaH_2PO_4	0,5
Hydroxyethylcellulose	5

pH ajusté à 7 par HCl et auto-clavage à 110° C pendant 20 mn.

Le procédé de purification de la manihocine employée, a utilisé la méthode de GOODMAN et al. (1974), consistant à précipiter les polysaccharides par l'éthanol. Après concentration du filtrat au 1/10 du volume initial, la précipitation par 15 volumes d'éthanol à 95° pendant une nuit est opérée à 4° C à l'obscurité, puis récupération du précipité par centrifugation à 2500 tours/mn pendant 10 mn et séchage du précipité à l'étude à 60° C pendant une nuit. Ce précipité est repris dans de l'eau bidistillée

Figure 9 : Schéma de purification de la toxine bactérienne (méthode avec l'éthanol)



et dialysée avec un boudin de cellophane pendant une nuit à 4° C et à l'obscurité. L'extrait non dialysable constitue la manihocine ou agent de criblage des cultivars de manioc.

La mise en évidence de l'effet toxique du composé purifié est obtenue en effectuant un bio-essai : l'organe test pour le bio essai est un lobe foliaire dont nous plongeons la base fraîchement coupée dans 1,5 ml de manihocine mis dans un tube à essai. Le tube est exposé à un éclairage en lumière de 2200 lux à 25° C pendant 72 heures.

Chaque essai comportera les traitements suivants :

- la manihocine dont l'effet toxique est analysé
- le traitement témoin-substrat ; le témoin-substrat est le milieu de culture n'ayant pas porté d'agent pathogène, mais qui a subi les mêmes étapes du procédé de purification.

Chaque lobe foliaire représente un traitement et chaque feuille une répétition. Dans ces essais, les traitements seront répétés 4 fois.

3 - 2. 6. Le milieu de culture des protoplastes

Des essais antérieurs (MABANZA 1982) nous ont montré que parmi les milieux de références que nous avons choisis, milieu WO 6 préparé par MEYER 1981, milieu T 0 et T 1 de CABOCHE 1980, tous utilisés pour le tabac et le milieu CL de SHAHIN et SHEPARD 1980, utilisé pour le manioc, aucun ne donnait satisfaction. Nous avons donc été amenés pour le manioc à composer un milieu dit milieu M, servant en même temps de solution de rinçage et de milieu de culture des protoplastes. Ce milieu est beaucoup plus dilué que l'ensemble des milieux utilisés pour l'isolement des protoplastes végétaux avec 10 fois moins de micro-éléments

que le milieu de MURASHIGE et SKOOG. La molarité totale de ce milieu est voisine de 0,53 M ; le principal stabilisateur osmotique est le mannitol à 0,4 M. Toutes nos expériences ont été réalisées à l'aide de ce milieu composé par nos soins.

Le milieu M pourra recevoir la manihocine, agent de criblage des protoplastes pour la confection d'un milieu sélectif de culture. Il est aussi utilisé pour le rinçage et la culture des protoplastes après une expérience de fusion. Dans toutes nos expériences, le pH est ajusté à 5,6 avec du KOH N/10 ou de l'HCl N/10. Il est généralement stérilisé par filtration avec des swinnex millipore à la porosité de 0,45 μm .

Les compositions du milieu M et des milieux de référence sont consignées dans le tableau 1.

3 - 2.7. Isolement et culture des protoplastes

En 1982, nous avons décrit une technique d'isolement des protoplastes (MABANZA et JONARD 1983). Cette technique nous ayant fourni des résultats satisfaisants a été conservée pour le reste de nos expérimentations. Contrairement aux feuilles des plantes cultivées en serre, les feuilles des plantes entretenues en culture in vitro sont utilisées sans prémacération. Elles sont âgées de 4 à 7 jours et pèsent environ 0,03g. Nous brossons la face inférieure du limbe avec une brosse souple en nylon, afin d'en ôter l'épiderme. La macération est réalisée en présence d'une solution enzymatique contenant la cellulase R 10 (2 %), macerozyme R 10 (0,5 %) et mannitol (0,7 M) à pH 5,6 dans un agitateur rotatif à l'obscurité à 25°C pendant 5 heures.

Tableau I : Le milieu M et les milieux de références utilisés dans nos expériences sur les protoplastes.

Composés		Teneurs en composés minéraux et organiques (exprimés en mg l ⁻¹) pour les milieux :					
		N°20 C1	N°21 C2	N°22 W06	N°23 CL	N°24 F	N°25 M
<u>Solutions minérales</u>							
	K Cl	-	-	4 000	-	-	-
	Na Cl	-	-	2 000	-	-	-
	NH ₄ NO ₃	825	800	-	-	-	800
	KN O ₃	950	1 010	5 000	7 600	3 800	760
	Ca Cl ₂ 2H ₂ O	220	440	10 800	1 760	880	176
	Mg SO ₄ 7H ₂ O	185	738	1 500	1 480	740	148
	KH ₂ PO ₄	85	136	250	680	340	68
	NH ₄ Cl	-	-	250	-	-	-
	Na ₂ EDTA	37	37	2,78	18,5	9,75	3,7
	Fe SO ₄ 7H ₂ O	27	27	3,72	13,9	6,45	2,8
	H ₃ BO ₃	1	3	-	3,1	1,55	0,6
	Mn Cl ₂ 4H ₂ O	-	-	-	9,9	4,95	2,0
	Mn SO ₄ H ₂ O	0,1	0,3	18,5	-	-	-
	Zn SO ₄ 7H ₂ O	1	3	8,6	4,6	2,3	0,9
	KI	0,01	0,03	0,83	0,42	0,21	0,08
	Na ₂ Mo O ₄ 2H ₂ O	-	0,1	-	0,13	0,065	0,03
	Cu SO ₄ 5H ₂ O	0,03	0,09	0,025	0,013	0,0065	0,003
	Co SO ₄ 7H ₂ O	-	0,01	0,025	0,015	0,0075	0,003
	Al Cl ₃	0,03	0,09	-	-	-	-
	Ni SO ₄	0,03	0,09	-	-	-	-
<u>Composés organiques</u>							
	Méso inositol	100	100	1 000	4 504	3 096	100
	Thiamine HCL (B ₁)	1	1	1	0,5	0,5	0,5
	Acide nicotinique	1	1	-	5	5	5
	Pyridine HCl (B ₆)	1	1	-	0,5	0,5	0,5
	Acide folique	-	-	1	0,5	0,5	0,5
	Biotine	0,01	0,01	-	0,05	0,05	0,05
	Pantothénate de Ca	1	1	-	-	-	-
	Glycine	-	-	-	2	2	2
	Caséine hydrolysée	-	-	-	50	50	50
	<u>sucre</u>						
	Mannitol	80 000	80 000	-	4,555	45 885	72 868
	Saccharose	20 000	20 000	30 000	68,46	45 000	20 000
	Sorbitol	-	-	-	4,554	36,440	-
	xylitol	-	-	-	3,803	-	-
	Agar agar	-	-	-	0,2 %	-	-
	<u>Phytohor-</u>						
	ANAs	3	2	2	2	2	4
	BAP	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Après la digestion des tissus par les enzymes, nous récupérons les protoplastes en tamisant la solution au travers d'un tamis métallique. A l'aide d'une tulipe en verre, nous recueillons les protoplastes dans un tube à essai. Deux à trois fois les protoplastes sont rincés par centrifugation à 1000 *g* avec la solution M.

La mise en culture des protoplastes isolés est effectuée dans des boîtes de Pétri en plastique Greiner contenant 4 ml de milieu et fermées avec du scel-o-frais. Les boîtes ainsi préparées sont introduites dans une grande boîte de rangement plastique. La culture est laissée 48 heures à l'obscurité à 28° C puis exposée à la lumière continue de 2200 lux, pendant 3 semaines. Les cals obtenus sont ensuite transférés dans de nouvelles boîtes de Pétri sur milieu gélosé et exposés à 3500 lux avec une photopériode de 16 heures d'éclairement et 8 heures d'obscurité.

3 - 2.8. Culture des protoplastes dans le milieu avec manihocine

La manihocine est l'extrait de culture de *Xanthomonas campestris pathovar manihotis* purifié, suivant la technique décrite à la figure 9. Les protoplastes fraîchement isolés sont mis en culture avec une densité de 3.10^5 protoplastes par millilitre dans des boîtes de Pétri de 15 mm de diamètre, contenant 2 ml de milieu M, renfermant 1/15 (V/V) de manihocine. Dans toutes ces expériences, nous appelons milieu MX le milieu M renfermant de la manihocine.

Nous avons toujours utilisé deux milieux témoins :

- le milieu M ne renfermant pas de manihocine,
- le milieu témoin MT ; c'est le milieu M renfermant le témoin-substrat qui a subi les mêmes étapes du procédé de purification que la manihocine ; les dilutions

du témoin substrat dans le MT sont les mêmes que celles de la manihocine dans le milieu MX

3 - 2.9. La fusion des protoplastes

Les protoplastes des deux espèces sont mélangés dans 2 ml de solution M à raison de $2 \cdot 10^6$ protoplastes pour chacune des deux espèces. Une solution favorisant la fusion est préparée. Elle renferme en mg/l :

Ca Cl ₂ 2 H ₂ O	1700
KH ₂ PO ₄	50
Glucose	36 000
Polyéthylène glycol (PEG 1540)	500 000.

Après l'ajustement du pH à 5,6 par HCl N/10, cette solution est autoclavée à 110° C pendant 20 mn, 5 gouttes prélevées dans la solution stérile sont alors déposées séparément dans une boîte de Pétri de 5 cm de diamètre ; puis une goutte de la solution M contenant les protoplastes correctement mélangés des deux espèces est délicatement déposée sur chaque goutte de la solution de fusion. Après 40 mn, un rinçage est opéré avec la solution M par 3 fois toutes les 5 mn. 3 ml de solution M sont ensuite versés dans chaque boîte que nous fermons avec du scel-o-frais. Comme pour la culture simple des protoplastes, les boîtes de Pétri ainsi apprêtées sont gardées dans de grandes boîtes de rangement plastiques.

Pour l'allofusion, nous avons utilisé la technique de la coloration vitale avec le rouge neutre et le bleu de méthylène pour chacune des deux espèces. Ces colo-

rants vitaux n'ont été employés que dans le but de vérifier l'allofusion entre *Manihot esculenta* Crantz et *Manihot glaziovii* Muell. Ce genre d'expériences n'a pas permis la culture, la mortalité des protoplastes observées après 24 heures étant trop élevée. La vérification des capacités d'allofusion chez les protoplastes de manioc a été également réalisée au cours des fusions initiées avec les protoplastes d'une espèce très éloignée, appartenant au groupe des monocotylédones : *Dioscorea alata* dont les protoplastes sont isolés de la même manière que ceux de *Manihot esculenta* Crantz avec une production variant de 2 à $4 \cdot 10^6$ protoplastes par gramme de limbe. Cette quantité non négligeable a permis des expériences réussies d'allofusion avec les protoplastes de *Manihot esculenta* Crantz.

3 - 2.10 Les conditions d'environnement

Les expériences dans leur ensemble se pratiquent dans une pièce affectée à cet effet et dont les caractéristiques sont les suivantes : pièce à culture climatisée à la température de 25° C, éclairements de 2 200 lux ou de 3 500 - 4 000 lux fournis par une à six lampes Philipps de luxe de 40 W/55.

La photopériode est de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité.

IV - RESULTATS ET DISCUSSIONS

4 - 1. OBTENTION SUR LES DEUX ESPECES PAR MICROBOUTURAGES INTENSIFS DU MATERIEL VEGETAL PROPRE A L'ISOLEMENT DES PROTOPLASTES

Au cours de nos expériences de microbouturage nous avons noté l'influence de quatre facteurs sur le développement des boutures de serre : la position de la bouture sur la tige, la qualité du cultivar, la composition du milieu de culture et en particulier sa richesse en diverses phytohormones exogènes.

Les boutures situées en-dessous de la 5e feuille se sont développées après 4 jours avec une très forte vigueur, contrairement aux boutures plus jeunes situées au-dessus de la 5e feuille.

L'influence du cultivar a été étudiée avec des microboutures cultivées sur le milieu de KNOP sans phytohormones. Nous remarquons que les cultivars Malela 1 et MM 78 donnent facilement des plantes après 15 jours avec une réussite de 95 %. Avec le cultivar MA 255 par contre, la levée est tardive et la réussite de 50 % seulement. En utilisant le milieu de MURASHIGE et SKOOG avec phytohormones, nous avons amélioré le pourcentage de réussite chez tous nos cultivars. Avec le milieu n° 6 (MABANZA 1982) de composition suivante : MS+ 0,5 mg/l de BAP et 0,1 mg/l d'ANA, par exemple, nous remarquons que la reprise des boutures se fait d'une façon homogène après 2 jours chez tous les cultivars. Les pousses sont vigoureuses. Cependant, les boutures développent un cal et un rabougrissement des pousses s'installe après 15 jours. Ce milieu ne développe aucune induction rhizogène. Un transfert effectué sur le milieu 15 ne renfermant que 0,05 mg/l d'ANA montre que lorsqu'il est opéré à un

bon moment, les racines déjà initiées dans le milieu d'ensemencement se développeront rapidement après 4 à 5 jours, avec parallèlement une élongation de la tige.

Dès le 15e jour, nous constatons souvent que la pousse feuillée s'épaissit. Si au 20e jour, nous transférons les explants sur le milieu 15, il se produit en 5 jours une élongation rapide de la tige et le départ des bourgeons axillaires en pousses feuillées. Dans les meilleures conditions, sur le cultivar Malela 1, en 5 jours, l'explant va former sur ce milieu 15 de nombreuses pousses axillaires de 5 à 10 mm de longueur. Lorsque nous isolons les pousses axillaires et que nous les transférons à nouveau sur le milieu 15, elles vont s'enraciner en 5 jours.

Le tableau II indique la quantité de pousses enracinées obtenues après 30 jours, à partir d'une unique bouture du cultivar Malela 1, prélevée en serre et d'une autre, issue, elle, d'une plante cultivée *in vitro*.

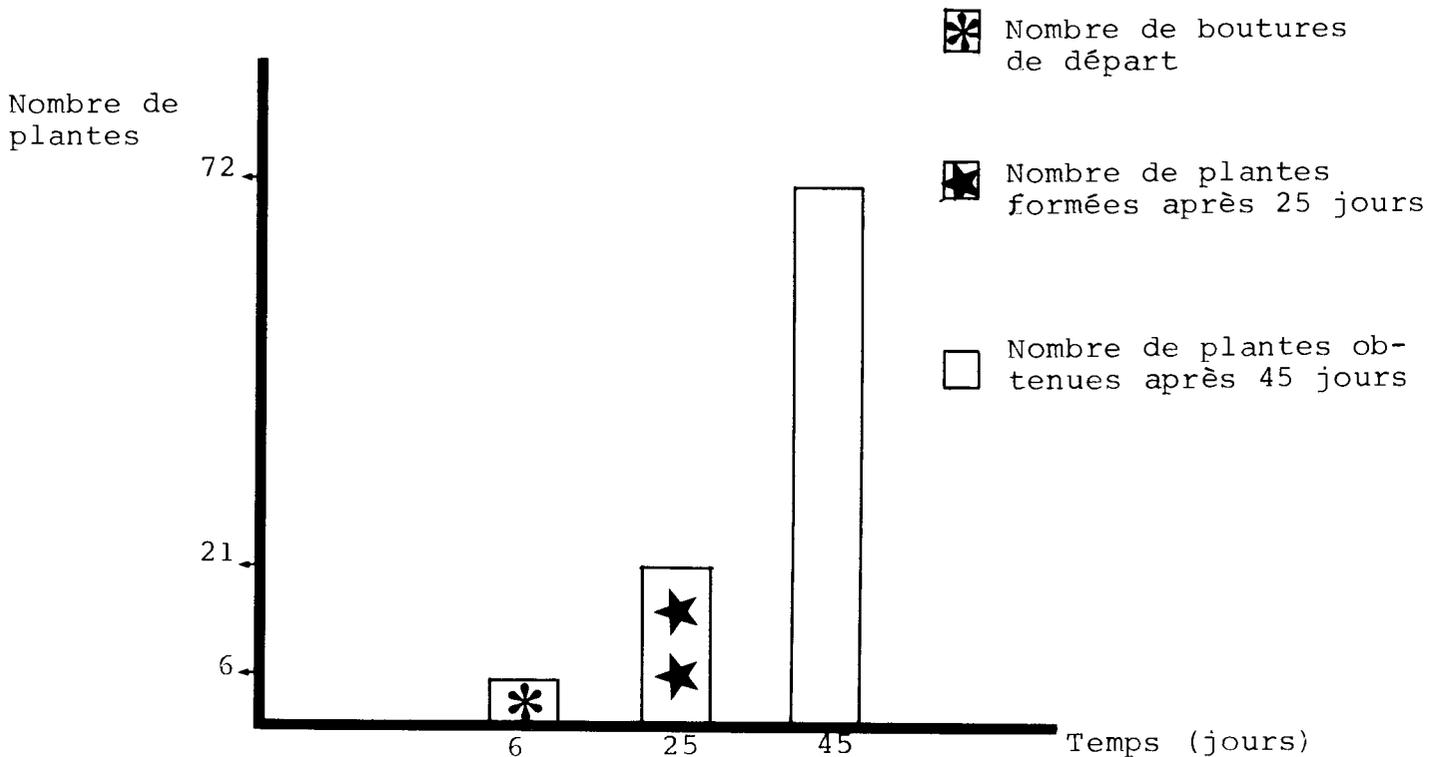
Tableau 2 : Levée de nombreux bourgeons axillaires et obtention de plantes entières à partir d'une seule bouture.

Origine de la bouture initiale	Nombre de plantes obtenues	
	En période favorable (juin-août)	Pour les mois de décembre et janvier
Plantes de serre	10	5
Cultivée <i>in vitro</i>	5	3

A partir des plantes ainsi obtenues, lorsqu'elles ont plus de deux feuilles, nous pouvons répéter la même opération et régénérer 5 plantes entières à partir de chaque nouvelle bouture. En deux mois, à partir d'une seule bouture issue de serre, nous disposons donc de 50 plantes enracinées que nous pouvons transférer facilement en pot en serre (MABANZA 1982).

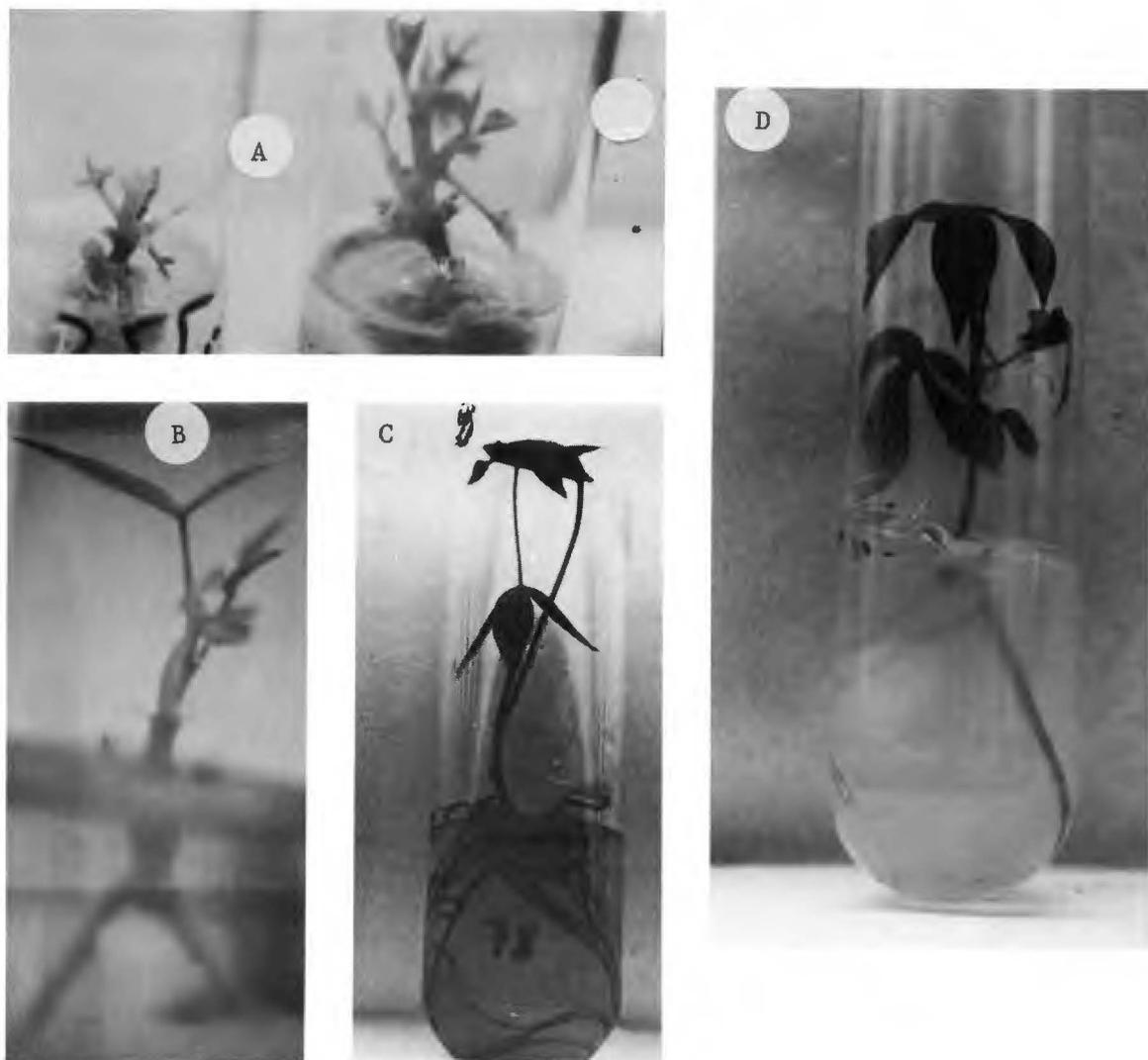
La figure 10 résume les résultats obtenus en 45 jours à partir de boutures prélevées en culture in vitro sur le cultivar CB du 24 mai au 7 juin 1982.

Figure 10 : nombre de plantes obtenues après 25 et 45 jours à partir de 6 boutures prélevées des plantes cultivées in vitro.



Dans cet essai, le taux de multiplication entre les deux générations a été identique et égal à $\frac{21}{6} + \frac{72}{21} = 3,5$

taux moyen que nous avons observé au niveau des boutures cultivées in vitro. Ce taux est égal à 5 pour les plantes de serre.



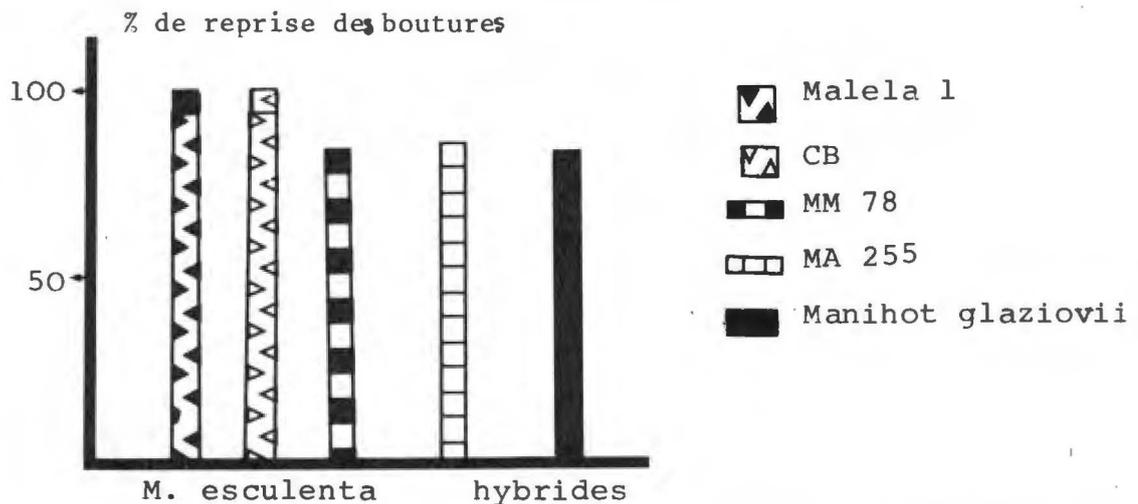
- A: A gauche: après 15 jours de culture sur le milieu 6, on observe un rabougrissement de la pousse et une levée d'inhibition des bourgeons axillaires.
 A droite: 5 jours après transfert de la pousse sur le milieu 15, il se produit un élongation de la tige et un développement de pousses axillaires. (Cultivar MA 255).
- B: Rhizogénèse rapide sur une pousse de 15 mm du Cultivar Maléla 1 sur le milieu 15
- C: Développement de plante entière du cultivar MM 78 sur le milieu 15.
- D: développement vigoureux du cultivar MA 255.

Fig. 11: MICROBOUTURAGE IN VITRO RAPIDE DU MANIOC.

Le succès observé avec l'utilisation judicieuse des phytohormones au niveau des différents cultivars de *Manihot esculenta* Crantz et de l'hybride MA 255, nous a permis d'entrevoir une possibilité de réussite sur l'espèce ligneuse *Manihot glaziovii* Muell. Nous avons alors utilisé la même technique avec un premier milieu, le milieu 6 plus riche en cytokinine et servant à la levée des bourgeons et un deuxième milieu, pauvre en phytohormones pour le développement de la plante entière.

Les figures 12 et 13 nous indiquent les résultats obtenus au niveau du microbouturage des cultivars des deux espèces et de l'hybride MA 255.

Figure 12 : histogrammes indiquant le pourcentage de reprise des boutures entretenues sur milieu 6. Les observations sont faites après 5 jours pour les 5 cultivars analysés.



Pour cet essai, le bouturage a été effectué pour chaque cultivar avec 24 boutures. La reprise des boutures est observée chez l'ensemble des cultivars après 2 jours. On peut observer que les cultivars Malela 1 et CB ne présentent aucun problème de reprise. MM 78 (84 %) par contre a un comportement semblable à celui observé avec MA 255 (l'hybride) (85 %) et *Manihot glaziovii* Muell (83 %).



- A: Effets de rabougrissement observés 15 jours après sur la microbouture de M. glaziovii Muell ensemencée sur le milieu 6. On observe une levée d'inhibition des bourgeons axillaires (flèches).
- B: Formation de plante entière de M. glaziovii Muell.
- C: Pousse de 20 mm enracinée obtenue in vitro.
- D: Cette figure montre le développement comparé de l'ensemble de nos cultivars. De gauche à droite: Maléla 1, MM 78, CB, MA 255 et l'espèce M. glaziovii Muell. Nous pouvons noter une vigueur identique pour tous les cultivars.

Fig. 13: MICROBOUTURAGE CHEZ L'ESPECE M. GLAZIOVII MUELL

DISCUSSION

Quelques chercheurs ont réalisé le bouturage *in vitro* du manioc (TILQUIN 1978, FEREOL 1978). Les résultats qu'ils obtiennent permettent de conclure que le manioc peut facilement être multiplié par les techniques de la culture *in vitro*. Cependant, lorsque nous avons utilisé leur technique, nous avons pu constater que tous les cultivars de *Manihot esculenta* Crantz ne fournissent pas de bons résultats (MABANZA 1982). Ainsi, le cultivar MM 78 bouturé sur milieu de KNOP sans phytohormone par exemple, ne formait aucune plante entière même après 30 jours de culture ; de même, le clone MA 255 fournissait des résultats médiocres. Et, en général, c'était après un mois ou plus que nous obtenions des plantes utilisables. Par contre, la technique de multiplication rapide *in vitro* que nous avons mise au point fournit en 10 jours des pousses feuillées utilisables pour l'isolement des protoplastes. Et, ces pousses peuvent après 5 jours être enracinées et former des plantes entières. Une multiplication plus active pouvait être réalisée en initiant la levée d'inhibition des bourgeons axillaires, qui évoluaient alors en pousses feuillées utilisables après 3 semaines de culture. On peut donc ainsi disposer à partir d'une seule bouture de 5 plantes enracinées après un mois seulement de culture. Cette multiplication très rapide nous a semblé plus adaptée à notre dispositif expérimental. En effet, pour réaliser l'isolement de nos protoplastes, il nous suffira de programmer l'expérience 15 jours après ce bouturage.

Cette technique est applicable aussi bien au *Manihot glaziovii* Muell, espèce ligneuse, qu'à l'hybride entre les deux espèces (MA 255) et sa mise au point nous a permis de disposer à point nommé d'un matériel végétal homogène en un temps relativement court (10 à 15 jours).

4 - 2. ETUDE DES POSSIBILITES DE REGENERATION DES CALS DE MANIOC

Beaucoup d'auteurs insistent sur le rôle du génotype de la plante-mère en culture *in vitro* des protoplastes, aussi nous a t'il semblé utile d'étudier les potentialités de régénération des cals de manioc avant d'aborder la culture des protoplastes.

4 - 2.1. Culture de l'entre-noeud du pétiole et du limbe

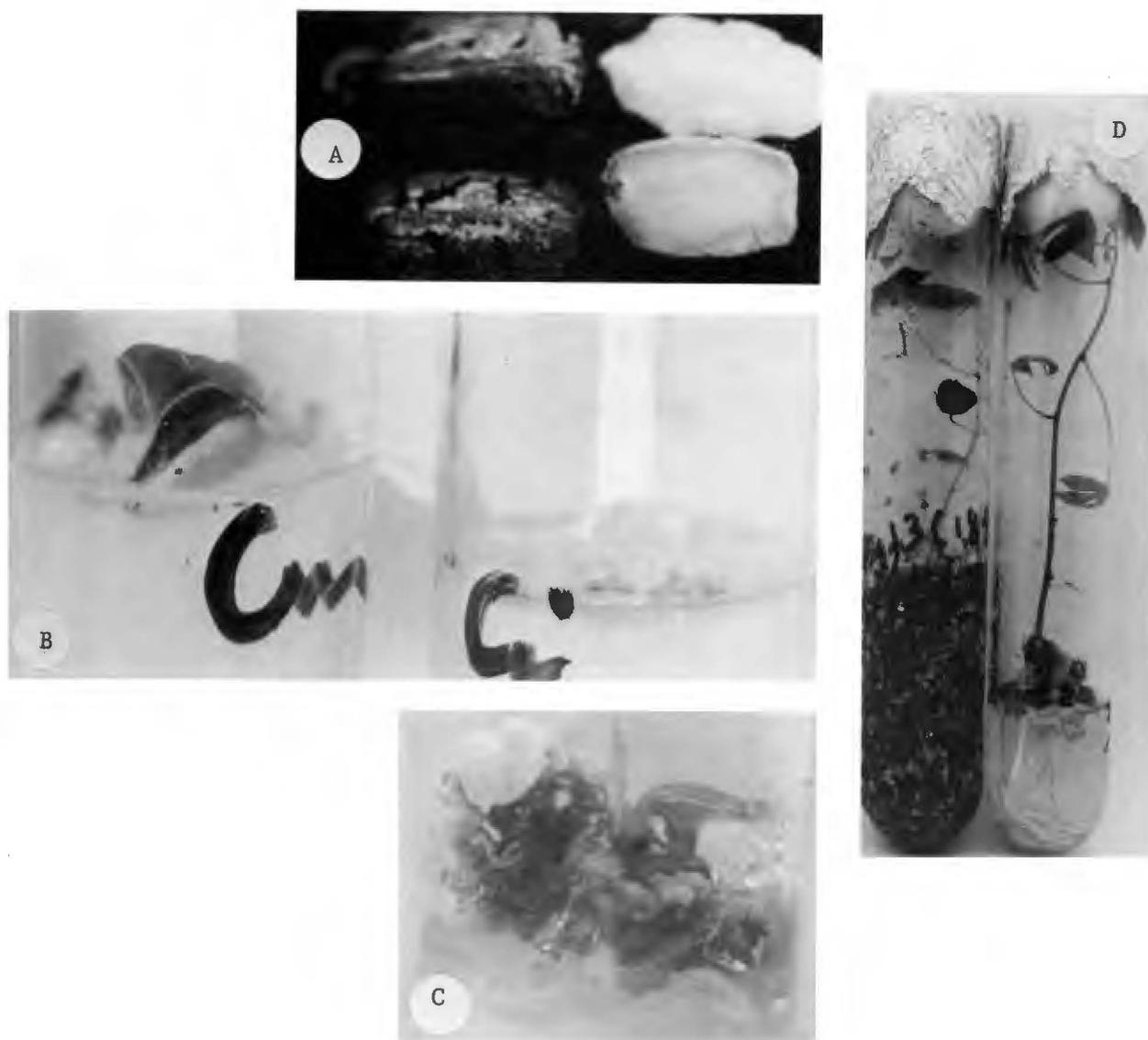
Les explants constitués d'entre-noeuds, de pétiole ou de limbe ont fourni des cals de morphologie très diverse. Malgré la gamme de milieux de culture utilisés et le nombre de transferts effectués, nous n'avons pas obtenu de pousses feuillées. La rhizogénèse est la seule forme d'organogénèse décelable.

4 2.2. Culture du cotylédon

L'ensemble de nos essais réalisés sur le cotylédon montre que l'organogénèse apparaît différemment suivant le type de cals obtenu. Lorsque le fruit est récolté au stade laiteux, les cotylédons n'ont pas fourni de cals organogènes (figure 15 a)

Au niveau des explants issus des cotylédons des fruits au stade pâteux, nous observons à partir du 15^e jour, la formation de nodules verdâtres. Sur la masse blanchâtre une partie de ces nodules va à partir de 20 jours de culture, évoluer en pousses feuillées sur le même milieu de culture.

La néoformation de bourgeons a été plus abondante chez les cals issus des cotylédons des semences cueillies immédiatement avant maturité, ou ceux obtenus à partir des



A: Graines de manioc entières et disséquées.

B: A gauche: cotylédon prélevé à partir d'une graine mûre, 3 jours après la mise en culture.

A droite: cotylédon prélevé à partir d'un fruit récolté au stade laiteux

C: Néoformation de nombreux bourgeons à partir d'un seul explant et développement en pousses feuillées.

D: développement de plantes entières sur milieu gélosé et sur vermiculite.

Fig. 15: POTENTIALITES ORGANOGENES DU MANIOC: REGENERATION DE PLUSIEURS PLANTES A PARTIR DU COTYLEDON

graines mûres. L'explant vert, au développement presque stoppé dès le 10^e jour, initie dès le 15^e jour une multitude de bourgeons dans la région superficielle du cal. Les bourgeons les plus vigoureux vont se développer rapidement (figure 15 c). A partir du 20^e jour, nous assistons à l'allongement des tiges et à la formation de pousses feuillées. L'enracinement a été facilement obtenu. La figure 15 et le tableau III indiquent les différents résultats enregistrés avec la culture in vitro du cotylédon de manioc.

Comme nous l'avons déjà noté (MABANZA et JONARD 1983b), l'obtention de plantes entières à partir de cotylédon est relativement aisée. La plante entière est régénérée après 25 jours. Cette régénération dépend de l'âge du cotylédon ; en effet, nous n'observons pas d'organogénèse avec les explants issus de fruits récoltés au stade laiteux ; les cotylédons prélevés dans les semences au stade pâteux fournissent des cals abondants qui peuvent initier des bourgeons ; les graines mûres donnent des cotylédons qui développent les bourgeons à partir des zones superficielles, avec une faible induction callogène.

Tableau III : Comportement en culture in vitro des cotylédons suivant l'âge des semences. La culture est faite sur le milieu de MURASHIGE ET SKOOG renfermant 1 mg/l de BAP, 1 mg/l ANA et 0,1 mg/l AG_3

Stade de maturation		Nombre d'explants	Callo-génèse	Caulo-génèse	Rhizo-génèse	Formation des plantes %	Temps en jours
Fruits Graines	laiteux	12	+	-	-	0 %	-
	pâteux	48	+++	+	+++	20 %	20-50
	immatures	96	++	++	++	50 %	30-45
	mûres	96	.	+++	++	20 %	25-30

Le signe + indique l'existence du phénomène, le signe - son absence.

4 - 2.3. Le développement in vitro des apex caulinaires

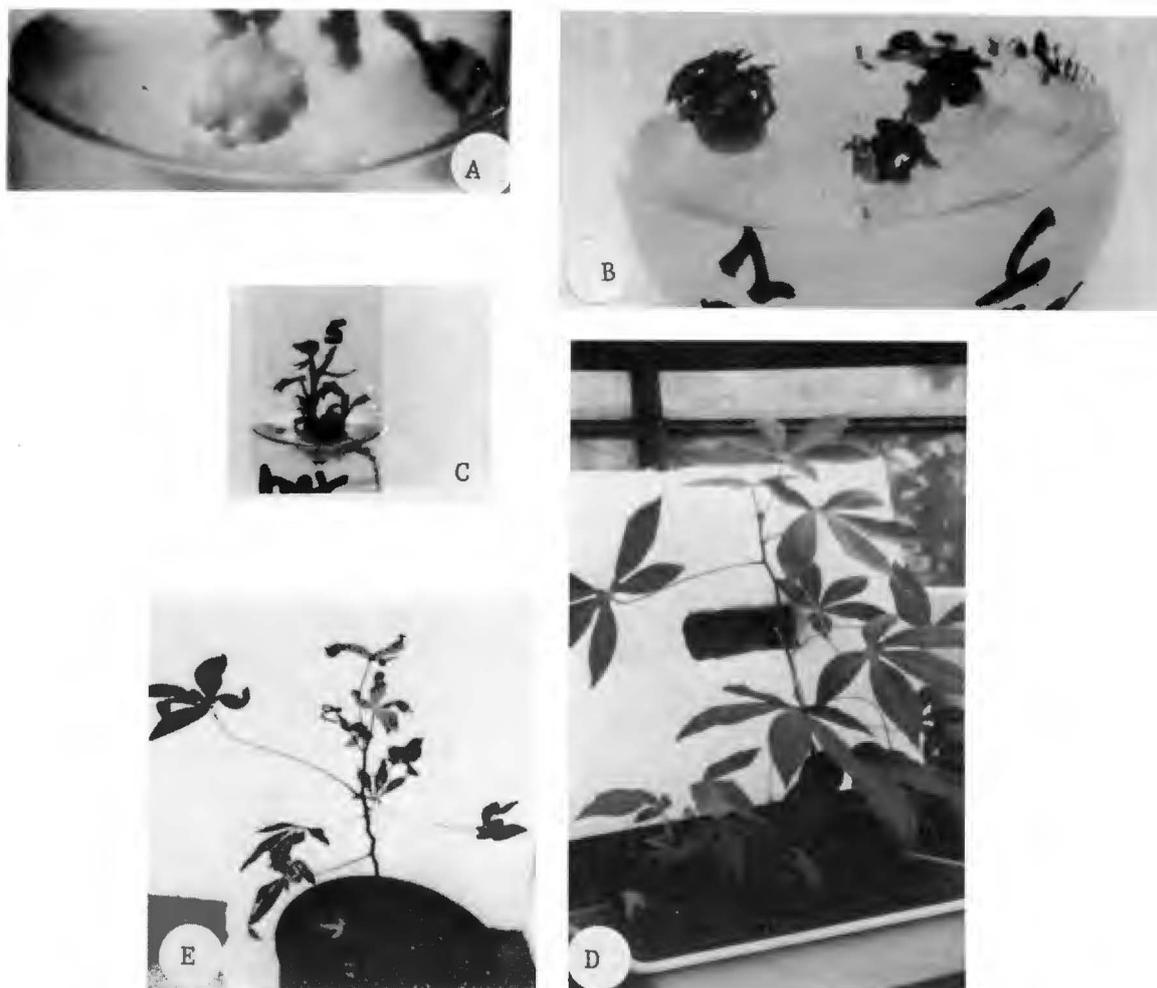
Une callogénèse abondante se produit rapidement chez les explants d'apex. L'explant de 0,2 à 0,3 mm de diamètre, lors de son ensemencement, peut après 7 jours donner un cal de 1 à 2 mm de diamètre. La croissance de ce cal est ensuite ralentie, puis totalement bloquée au bout de 10 jours.

Au moment où la callogénèse est stoppée sur les explants de 0,2 à 0,3 mm, des bourrelets verdâtres s'individualisent au niveau du dôme apical et la croissance de l'explant reste inchangée, même pendant un mois, si nous ne le transférons pas sur un nouveau milieu de culture.

L'inhibition du développement des explants constatée pour l'ensemble des explants isolés sur le milieu 1 (MS + BAP = 0,5 mg/l , ANA = 1 mg/l et AG₃ = 0,1 mg/l) nous a amené à réaliser des transferts sur d'autres milieux.

Ces explants, bloqués après 20 jours lorsque le cal atteint 2 mm à 3 mm de diamètre, sont transférés une première fois sur le milieu 6. Les cals vont alors se développer pour passer de 2 mm à 10 mm de diamètre en 10 jours. Parallèlement, nous observons une formation de touffes feuillues. Un second transfert sur milieu 4 (MS + BAP = 0,1 mg/l et ANA = 0,2 mg/l) permet le développement de ces pousses formées, et favorise leur élongation. Les pousses de même taille peuvent être développées jusqu'au nombre de 4 sur le même cal (figure 16).

Il est donc possible d'obtenir de nombreuses pousses feuillées à partir d'un seul apex caulinaire de manioc d'un diamètre compris entre 0,2 mm et 0,4 mm (MABANZA 1982, MABANZA et JONARD 1981). Lorsque le diamètre de l'explant est inférieur à 0,2 mm, nous avons très peu de chance de régénérer une pousse feuillée.



- A: Initiation de nombreux bourgeons et inhibition de la croissance de l'explant (milieu 1). Les apex de M. glaziovii Muell se sont comportés de la même manière.
- B: développement de nombreuses pousses feuillées touffues sur le milieu 6
- C: Développement de nouvelles pousses sur le cal des pousses repiquées sur le milieu 15.
- D: Le développement de la plante en serre n'a présenté aucune variation apparente. Ces plantes n'ont pas montré des symptômes de mosaïque si on les comparait à celles obtenues par simple microbouturage in vitro à partir d'une même plante mère (E).
- E: Plante du cultivar MM 78 issue de microbouturage in vitro. Contrairement aux plantes issues de la culture d'apex (D), elle montre des symptômes prononcés de mosaïque.

Fig. 16: POTENTIALITES ORGANOGÈNES DU MANIOC: DÉVELOPPEMENT DE NOMBREUSES PLANTES À PARTIR D'UN SEUL EXPLANT APEX DE 0,2 À 0,4 mm DE DIAMÈTRE.

Le transfert des pousses néoformées sur le milieu 15 (MS + ANA = 0,05 mg/l) développe des racines viables en l'espace de 5 jours sur le cal, ou directement sur les pousses repiquées sans cal à leur base.

Au niveau du cal de la pousse repiquée se développe de nouvelles jeunes pousses ; le cal continue à croître et d'autres amas méristématiques se développent avec la même vigueur. Après 10 jours, en séparant les pousses nouvellement formées (tableau IV) avec leur cal à la base, un autre repiquage permet d'obtenir une autre série de nouvelles pousses (MABANZA 1982, MABANZA et JONARD 1981). Dans les cas les plus favorables, le troisième repiquage a aussi fourni de nombreuses pousses vigoureuses.

Tableau IV : Obtention de plusieurs pousses à partir d'un explant unique.

Apex du cultivar CB

Diamètre de l'explant : 0,2 mm - 0,4 mm

Eclairement : 2200 lux.

Niveau 1 Apex n°	Niveau 2 Nombre de pousses	Niveau 3 Nombre de pousses
1	4	4 + de nombreux bourgeons
2	3	7 "
3	2	2 "
4	1	1 "
5	2	2 "
6	2	2 "
7	Nombreux bourgeons	Nombreux bourgeons
Total 7	14 + de nombreux bourgeons	18 + de nombreux bourgeons capables de se développer en pousses au niveau 4

Le niveau représente l'ordre de repiquage de l'explant ; le niveau 1 constitue donc l'ensemencement. En séparant les pousses obtenues au moment du repiquage sur le milieu 15, dans cette expérience, nous arrivons à obtenir

à partir de 7 explants-apex de départ, 18 plantes viables après deux repiquages successifs (30 jours) avec de nombreux bourgeons. Nous devons aussi noter que les explants de grande taille (0,4 mm) (n° 1 et 2) développent beaucoup plus de plantes que les explants de faibles dimensions (0,2 mm) (n° 3 - 7). Les mêmes résultats sont enregistrés au niveau du cultivar Malela 1 (MABANZA 1982).

Pour KARTHA et al. (1974), l'obtention de plante de manioc se faisait en une seule étape après 25 jours (LIU 1975 ; NAIR et al. 1979 ; KARTHA 1975, 1978 ; KAISER et TEEMBA 1978 ; ADEJARE et COUTTS 1981). Nos travaux n'ont pas permis l'obtention de plante en une seule étape sauf pour les explants dont le diamètre est supérieur à 0,5 mm. Nos explants développent un cal abondant dans lequel s'initie la néoformation de bourgeons qui ne se développent en pousses feuillées que lorsque les explants passent au moins 10 jours sur le milieu 4.

L'obtention de nombreuses plantes à partir d'un seul explant-apex nous a permis de mettre au point une technique de multiplication clonale rapide du manioc. En 35 jours, nous pouvons dans les meilleures conditions obtenir 30 à 50 plantes viables, capables de se développer en serre. Ces plantes transférées en serre n'ont montré aucune variation apparente et, même après 6 mois, elles n'ont pas présenté des symptômes de mosaïque (fig. 16).

4 - 2.4. Discussion

Ces essais montrent qu'il y a possibilité d'obtention des plantes saines par la culture de l'apex caulinaire. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus antérieurement par KARTHA et al. (1978, qui notaient 60 % de plantes indemnes, obtenues à partir de la culture de méristèmes. Des résultats semblables ont été aussi enregistrés par KAISER et TEEMBA (1979) et COUTTS et ADEJARE 1981. Dans notre cas, de nombreuses plantes saines peuvent être obtenues à partir d'un seul méristème en un temps

relativement court (30 jours). Ceci nous permet de disposer d'un matériel de choix, favorable à l'isolement des protoplastes.

La néoformation de nombreuses plantes à partir des organes juvéniles (cotylédons et apex caulinaires) souligne les potentialités organogènes des tissus de manioc cultivés *in vitro*.

4 - 3. ISOLEMENT ET CULTURE DES PROTOPLASTES CHEZ LES DEUX ESPECES

4 - 3.1. Isolement des protoplastes

Les conditions d'isolement des protoplastes ont été discutées au cours de nos publications antérieures (MABANZA 1982, MABANZA et JONARD 1983). Nous avons réuni dans le tableau V les résultats concernant les quantités de protoplastes obtenus à partir de nos divers cultivars. Il convient de noter que les vitesses basses de centrifugation (500 *g*) fournissent pour deux macérations environ 1.10^7 protoplastes par gramme de limbe et les vitesses plus élevées (1500 *g*) des quantités plus grandes. Les expériences menées précédemment (MABANZA 1982) ont montré que la solution de rinçage $KCl - Mg SO_4 \cdot 7H_2O$ est celle qui fournit la plus grande quantité de protoplastes ; cependant, cette solution induit une forte mortalité dans le milieu de culture. Nous avons donc décidé pour nos expériences plus récentes, d'employer uniquement la solution M comme solution de rinçage, la vitesse de centrifugation était de 1000 *g*.

Tableau V : Quantité de protoplastes isolés pour 5 cultivars de manioc après deux macérations. Deux vitesses de centrifugation ont été utilisées au cours de ces expériences (500 g et 1000 g).

Répétitions	Quantités de protoplastes isolés (10^6 prot/g de limbe) par les cultivars de :				
	Espèce Manihot esculenta Crantz			Hybride MA 255	Espèce Manihot glaziovii
	MM 78	Malela 1	CB		
1	47,79	20,38	22,44	12,46	41,03
2	45,68	26,47	41,88	23,94	17,86
3	36,40	32,65	24,93	45,0	28,20
4	43,12	45,22	34,43	82,9	43,46
5	-	43,9	30,20	-	-
6	-	30,09	74,33	-	-
7	-	30,90	69,33	-	-
8	-	33,54	35,0	-	-
9	-	-	22,10	-	-
Total	172,99	263,15	354,64	164,9	130,55
Moyenne	43,24	32,89	39,4	41,07	32,63

Les valeurs consignées dans ce tableau montrent que nous isolons toujours plus de 1.10^7 protoplastes par gramme de limbe. Les variations observées sont dues à la vitesse de centrifugation qui a varié de 500 à 1500g . Les centrifugations à grandes vitesses ont libéré de nombreux protoplastes de faibles dimensions (d'un diamètre parfois inférieur à 10 μ m).

De plus grandes quantités de protoplastes sont obtenues lorsque les feuilles macérées sont jeunes, âgées de 4 jours, pour une température supérieure à 25° C. Nous avons noté d'autre part que les protoplastes isolés à partir

des feuilles de plantes cultivées *in vitro* ont des dimensions comprises entre 10 μm et 30 μm de diamètre, dans des proportions relativement identiques. Les protoplastes isolés à partir des feuilles des plantes cultivées en serre par contre ont en majorité des diamètres de 20 μm ou plus (MABANZA 1982) (figure 17). Leur mise en culture montre que toutes ces catégories de protoplastes sont également viables. Nous n'avons noté aucune différence d'apparence entre les protoplastes des cultivars de *Manihot esculenta* Crantz (MM 78, Malela 1, CB) de l'espèce *Manihot glaziovii* Muell et ceux de l'hybride sexué entre les deux espèces (MA 255).

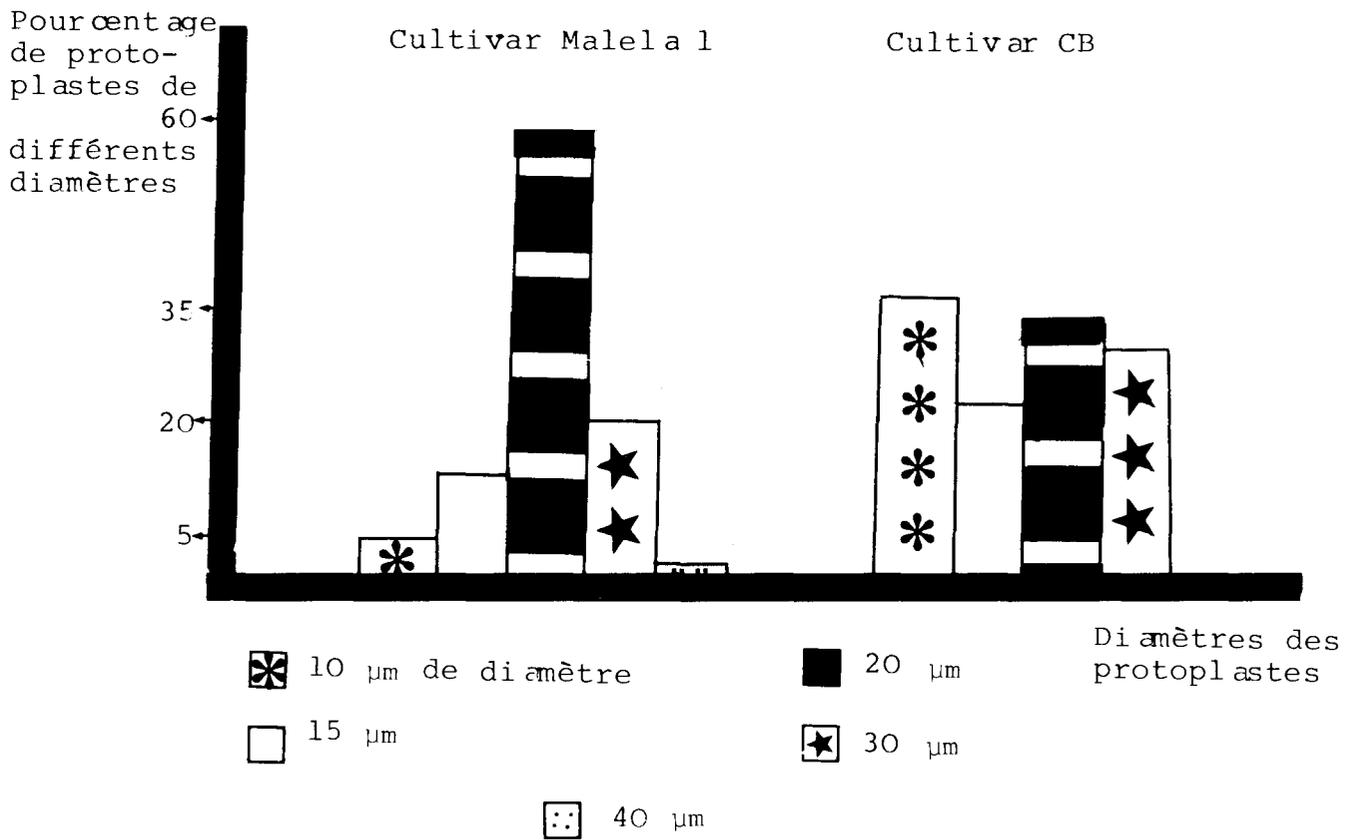
La mise au point d'une technique d'isolement d'une quantité suffisante de protoplastes viables est donc après le microbouturage *in vitro*, la seconde étape que nous avons franchie pour la réalisation de notre dispositif expérimental. Nous pouvons par conséquent disposer de matériel végétal en quantité suffisante au moment voulu et dans des conditions parfaitement reproductibles. Avec notre technique, nous pouvons uniquement à partir de quelques feuilles de plantes obtenues *in vitro*, dans des conditions rigoureuses d'asepsie, opérer des isollements largement productifs pour satisfaire les besoins de notre expérimentation. D'une manière pratique, nous devons encore signaler que la manipulation de quantités faibles de matériel végétal, nous a aidé dans l'obtention des cultures sans contaminations.

4 - 3.2. La mise en culture des protoplastes

4 - 3.2.1. Culture des protoplastes de *Manihot esculenta* Crantz

Au cours de nos travaux antérieurs, nous avons signalé que les protoplastes de manioc n'évoluaient pas de

Figure 17 : Pourcentage de protoplastes de différents diamètres obtenus à partir des feuilles des cultivars Malela 1 et CB



manière satisfaisante dans les milieux de culture utilisés sur le tabac par CABOCHE (1980) et par MEYER (1981), ce qui nous avait conduit à composer le milieu M.

La mortalité des protoplastes observée dans le milieu M, 2 jours après leur mise en culture, est faible, de l'ordre de 10 %. Ce milieu a de plus l'avantage de conserver les cellules en bon état pendant un mois sans en altérer la viabilité. Lorsqu'après l'isolement, nous gardons les protoplastes à l'obscurité à 28° C pendant 2 jours, si nous les exposons ensuite à un éclairage continu pendant 3 semaines, nous observons alors une évolution des protoplastes en cellules viables, capables de prolifération, pour former des colonies. Le premier phénomène observé est toujours une prolifération par bourgeonnement des cellules.

4 - 3.2.1.1. Le bourgeonnement des protoplastes

Ce mécanisme de prolifération non habituel chez les végétaux supérieurs a été observé pour l'ensemble de nos cultures. Il intervient très tôt après un jour de culture. Dans le milieu de culture M, il manifeste son ampleur maximale au 7e jour (près de 80 % de cellules en culture) pour décroître rapidement par la suite. Il est presque nul au 15e jour (figure 18). Nos observations montrent que dans la majorité de nos cultures, les cellules bourgeonnent (figures 18, 19), puis souvent se séparent (figure 20). Les cellules bourgeonnées et séparées peuvent à nouveau bourgeonner et se séparer une seconde fois. Ce phénomène va donc augmenter le nombre de cellules uniques présentes dans le milieu de culture (figure 25), aux environs du 12e jour. Cependant, les cellules bourgeonnées peuvent ne pas se séparer (figure 19). Elles forment alors ce que nous avons appelé des "pseudo-cals" par simple agglomération de cellules sans structure organisée (fig. 21) (MABANZA, 1982).

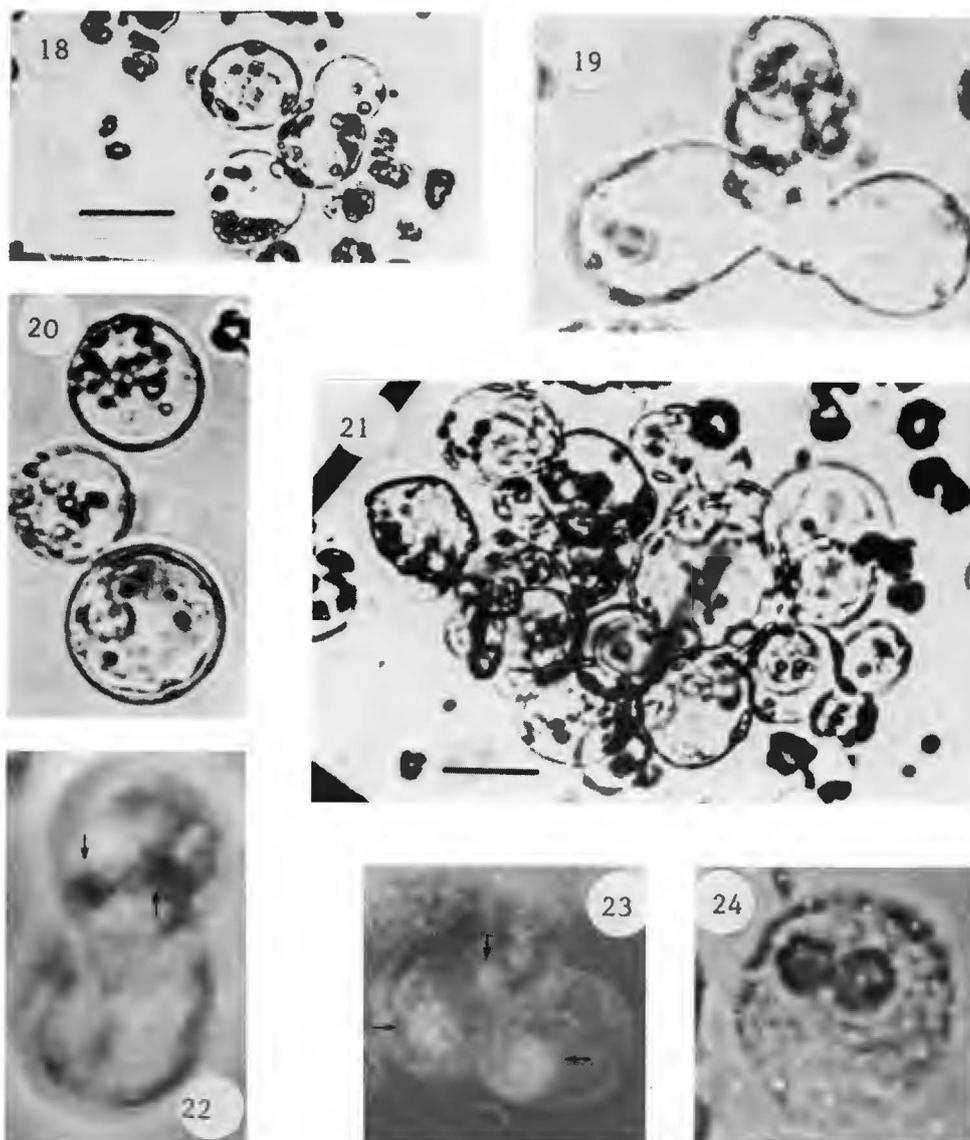


Fig. 18: Le bourgeonnement chez les protoplastes du cultivar Maléla 1. On observe une constriction dans la zone médiane du protoplaste avec partage égal ou non du cytoplasme. (la barre = 20 μ m)

Fig. 19: Bourgeonnement avec cellules filles non séparées. On remarque les 2 grandes cellules et les 2 petites cellules agglomérées.

Fig. 20: Bourgeonnement avec séparation de cellules filles.

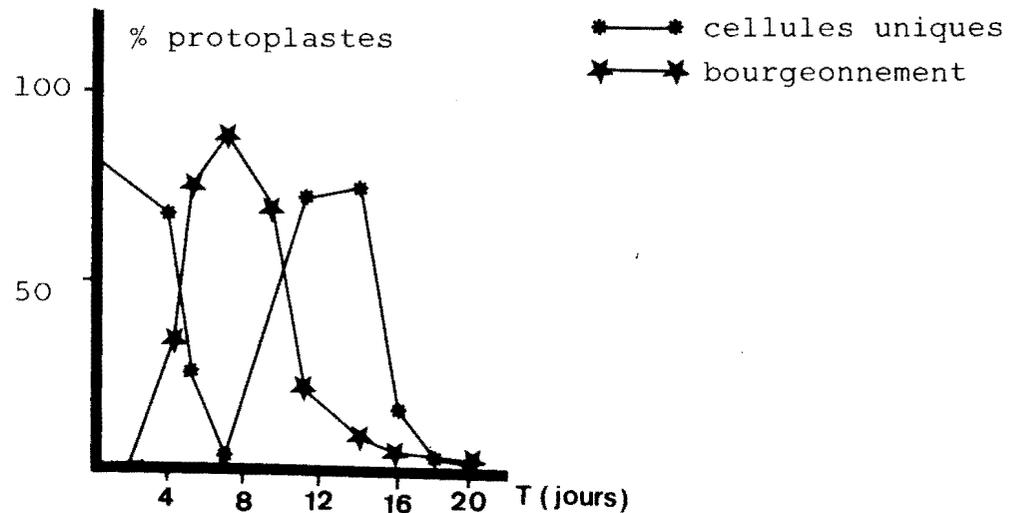
Fig. 21: Formation de pseudo cal par des cellules bourgeonnées et non séparées (la barre = 20 μ m).

Fig. 22: Bourgeonnement, division nucléaire puis descente de l'un des noyaux fils dans l'autre poche de bourgeonnement (les flèches montrent les noyaux fils).

Fig. 23: Cellules bourgeonnées et agglomérées, avec leurs noyaux (indiqués par les flèches)

Fig. 24: Une cellule binucléées.

Figure 25 : Evolution des protoplastes de *Manihot esculenta* Crantz dans le milieu M.



Les deux premiers phénomènes observés dans les premiers temps de la culture des protoplastes de manioc : le bourgeoisement et la présence des cellules uniques. Les cellules uniques diminuent quand le pourcentage des bourgeoisements cellulaires augmente. A partir du 7e jour après avoir atteint la valeur maximale de 88 %, les cellules bourgeoisées se séparent, le taux de cellules en bourgeoisement diminue, tandis que le taux de cellules uniques augmente (au 12e jour) puis devient presque nul au moment où toutes les cellules vont se diviser par clivage vers le 20e jour.

Des observations faites après coloration des noyaux à l'orceine montrent que les cellules bourgeoisées séparées ou agglomérées sont des cellules parfaitement viables, possédant un noyau capable de caryocinèse pour former des noyaux fils viables (figures 22, 23).

Ce phénomène de bourgeoisement très faible à partir du 16e jour, disparaît presque totalement après le 20e jour. Dans beaucoup de cas, le bourgeoisement donne lieu à une cytotidiérèse qui forme des cellules filles de dimensions plus ou moins égales (figure 18). Cependant,

nous avons observé beaucoup de situations où, même dans les cultures les mieux réussies, les cellules filles issues du bourgeonnement présentaient des dimensions très inégales (fig. 19). Certaines peuvent avoir un très gros noyau avec très peu de cytoplasme, d'autres, dans les cultures où nous observons une forte mortalité (plus de 20 %) se présenteront comme des poches de bourgeonnement sans noyaux associées à des cellules binucléées (figure 24).

Dans les cultures réussies à la mortalité faible (10 %), le bourgeonnement conduit toujours à l'obtention de cellules filles parfaitement viables, capables de reformation de parois pecto-cellulosiques.

Ce phénomène de bourgeonnement a retenu l'attention de quelques chercheurs (DUTUIT 1981, NAGATA et TAKEBE 1970, MEYER 1981). Beaucoup ont pensé qu'il s'agissait là d'un état pathologique, ce n'est pas l'avis de MEYER (1981) qui a montré que le bourgeonnement chez le tabac était dans le milieu WO 6, accompagné d'une caryocinèse normale qui se réalise soit avant, soit au moment de la cytodivision. Ce que nous avons également observé dans nos cultures sur manioc (fig. 22). Bien que nous ayons des cellules filles issues du bourgeonnement, qui présentent des dimensions identiques, beaucoup de cellules, cependant, sont de dimensions très inégales (fig. 19, 23). Ce mode de division peut alors dans ces conditions être un facteur de création d'une diversité cellulaire dans nos colonies issues de protoplastes.

Pour notre part, nous considérons le bourgeonnement comme un élément important de notre dispositif expérimental, en tant que mécanisme capable de créer une diversité au sein de la colonie cellulaire.

3 - 3.2.1.2. La prolifération par clivage

Celle observée sur les cellules de manioc est celle décrite antérieurement par NAGATA et TAKEBE (1970). Elle équivaut à une division de la cellule mère en deux cellules filles approximativement égales. Les cellules filles ne se séparent pas, étant reliées entre elles par une lamelle moyenne développée au niveau de l'ancienne plaque métaphasique (fig. 28). Ce mode de division n'a été observé que sur certains milieux (MABANZA 1982 ; MABANZA et JONARD 1983 a). Les milieux concentrés en éléments minéraux ou ayant une pression osmotique forte (près de 0,7 M) n'ont jamais initié des divisions par clivage. Des observations complémentaires ont montré que par contre, le bourgeonnement se réalisait aisément dans ces milieux, à forte teneur en éléments nutritifs avec pour conséquence une absence de reconstruction des parois cellulaires. Comme l'a souligné MEYER (1981), la formation effective des parois cellulaires apparaît dans nos expériences comme la condition préalable à la division cellulaire par clivage. Lorsque les conditions de culture sont satisfaisantes, les cellules ayant alors formé leurs parois peuvent rentrer en clivage (fig. 26, 27, et 28).

La figure 36 montre que les divisions par clivage interviennent très tôt dans le milieu M, dès le 5e jour ; mais restent peu nombreuses pendant une semaine environ. Au contraire, une grande majorité de cellules ne possédant pas encore de parois vont bourgeonner. A partir du 10e jour, l'ensemble des cellules de la culture vont reformer leurs parois. Cette situation nous conduit alors à une entrée en clivage de toute la population cellulaire aux environs du 15e jour. Ceci explique la chute des taux de cellules uniques et de bourgeonnements observée à cette période (fig. 25). Par la suite, les cellules qui se divisent par clivage enchaînent leurs divisions successives pour former des colonies (fig. 28, 29, 30, 33 et 34).

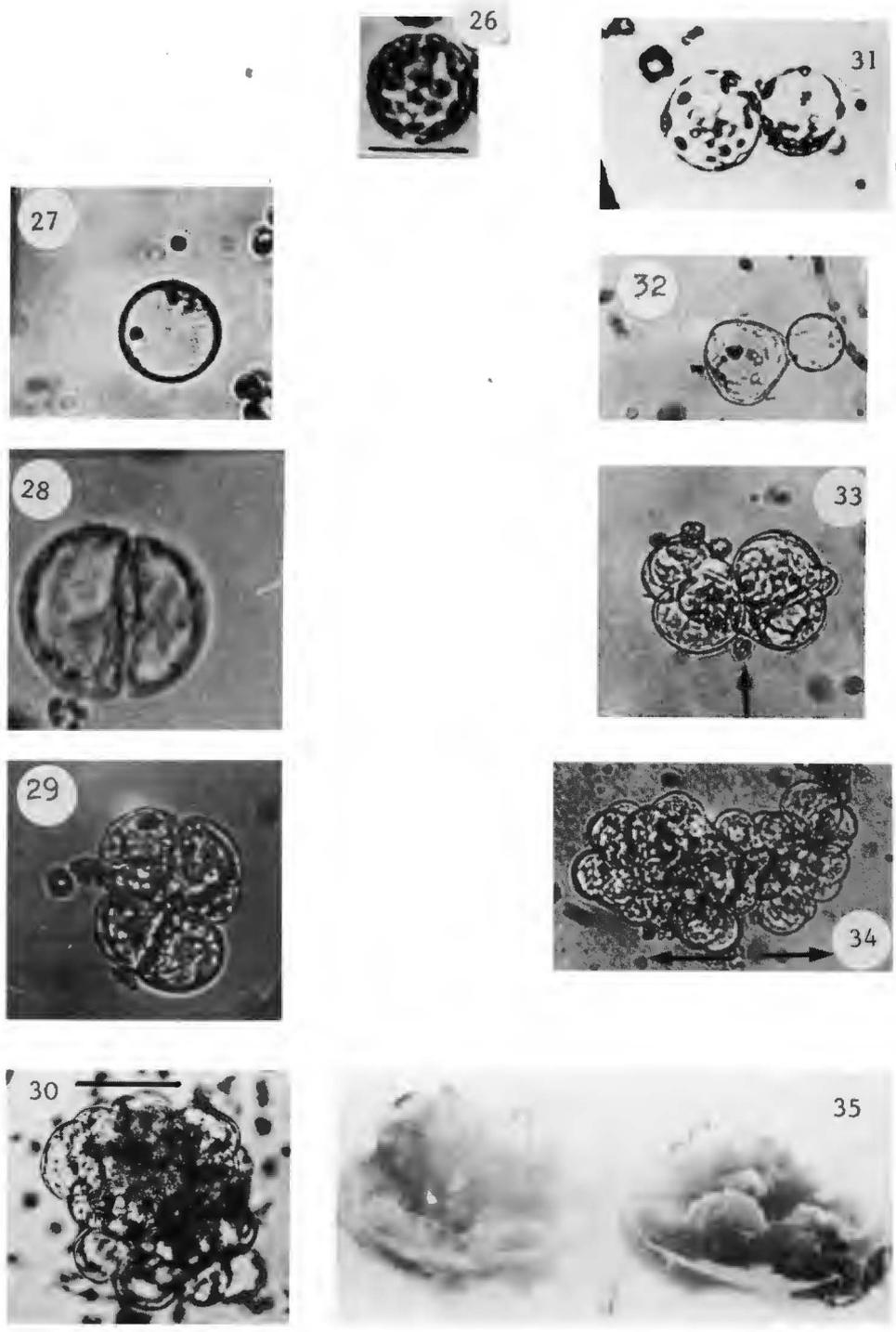
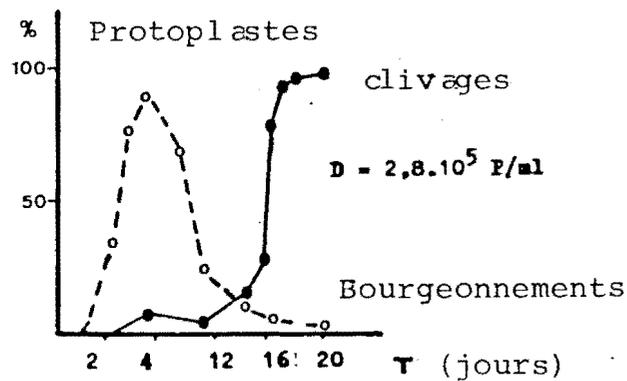


Fig. 26: Protoplaste fraîchement isolé (la barre = 20 μm).
 Fig. 27: Formation des parois cellulaires.
 Fig. 28: Division par clivage. Fig. 29: Cellule à son 2^e clivage
 FIG. 30: Micro cal formé à partir d'une cellule unique. Il présente un développement régulier (la barre = 50 μm).
 Fig. 31: Bourgeonnement d'une cellule sans parois. Fig. 32: Bourgeonnement et non séparation de cellules filles, puis formation des parois
 Fig. 33: Division par clivage après un bourgeonnement sans séparation de cellules filles. La flèche montre le niveau du bourgeonnement.
 Fig. 34: Cal issu de cellules bourgeonnées non séparées. On observe une polarité dans le développement du cal (flèche).
 Fig. 35: Obtention de cals viables sur milieu gélosé.

Figure 36 : Courbe de bourgeonnements (en pointillés) et de divisions par clivage (en traits pleins) des protoplastes du cultivar Malela 1 dans le milieu M. La densité de culture est de $2,8 \cdot 10^5$ protoplastes par ml.



Ces cals ainsi constitués sont nombreux et viables; au 20e jour, ils mesurent environ 0,2 à 0,4 mm de diamètre et peuvent alors être transférés sur milieu gélosé où ils vont proliférer activement (fig. 35).

4 - 3.2.2. Action de différents facteurs sur le développement des protoplastes de manioc

4 - 3.2.2.1 Le milieu de culture

Nous n'avons pas pu confirmer le succès obtenu sur manioc par SHAHIM et SHEPARD en 1980 avec le milieu CL gélosé qui renfermait des teneurs élevées en éléments minéraux. Un autre milieu concentré, préparé par MEYER (1981)

pour le tabac n'a pas induit également des divisions par clivage. Le milieu M plus dilué en macro et micro-éléments par rapport à l'ensemble des milieux utilisés jusqu'ici sur la culture des protoplastes est celui qui nous a fourni de meilleurs résultats.

Il convient de signaler que la conception d'un milieu de culture reste encore "empirique", sans recherche précise, pour chaque matériel végétal, de l'équilibre à observer entre les différents éléments composant ce milieu. Nous ne pouvons affirmer que la prolifération des protoplastes de manioc nécessite un milieu fortement dilué. En effet, le milieu CL 10 fois plus concentré que notre milieu M en macro-éléments a permis le développement des protoplastes sur certains cultivars de manioc selon SHAHIN et SHEPARD (1980). Nous avons pu cependant constater que le milieu M permet la conservation des protoplastes de manioc pendant un temps relativement long sans en altérer la viabilité. Et, sur ce milieu, lorsque les autres conditions de cultures sont favorables, l'entrée en division par clivage se fait d'une façon homogène et la formation des cals intervient d'une façon précoce entre la 2e et la 3e semaine de culture.

La mise au point du milieu M capable de fournir des cals viables que nous pouvons manipuler facilement sur milieu gélosé est la 3e étape franchie pour la réalisation de notre dispositif expérimental. Ceci implique qu'une variation induite au sein d'une cellule viable peut, si elle est transmissible, être entretenue au sein de notre culture par la voie des clivages successifs et la formation des cals viables facilement développés sur milieu gélosé.

Après la mise au point du milieu M favorable au développement des protoplastes de manioc, nous avons cherché

à connaître les effets d'un apport en quelques éléments minéraux ou non à des quantités variables à ce milieu M, considéré comme milieu de base.

4 - 3.2.2.2. Apport en $\text{Ca Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Le $\text{Ca Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ peut servir dans la solution de plasmolyse au niveau des isolements de certains protoplastes, notamment au niveau des graminées. Nous n'avons pas obtenu des résultats encourageants en étendant son utilisation à l'isolement des protoplastes de manioc. Nos résultats antérieurs enregistrés avec les milieux de culture utilisés par CABOCHE (1980) qui renfermaient 440 mg/l de $\text{Ca Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ indiquaient l'apparition précoce de nécroses. Cette observation nous a conduit à utiliser des quantités inférieures pour le manioc.

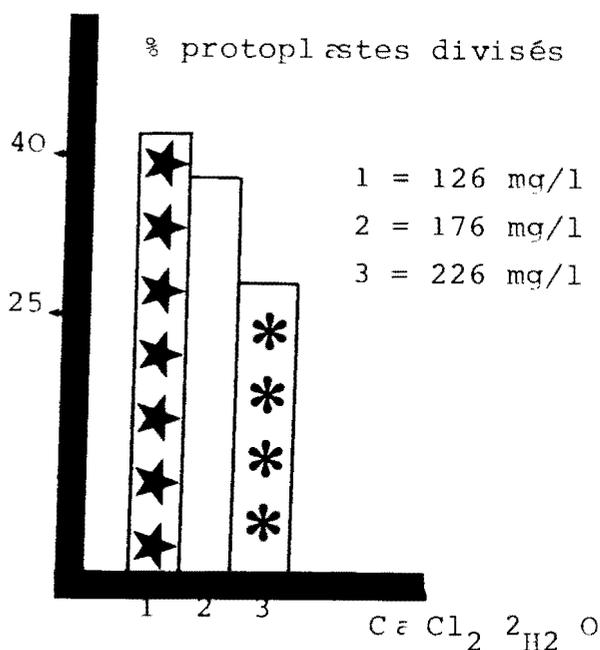
Les figures 37, 38 et 39 indiquent que les très faibles quantités de $\text{Ca Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (126 mg/l) induisent le déclenchement précoce de nombreuses divisions par clivage, cependant les calcs formés, très petits, sont peu développés au 21^e jour. Avec une concentration de 226 mg/l, nous obtenons la formation de calcs importants qui se nécroseront très rapidement dans le milieu de culture. Les teneurs de 176 mg/l en $\text{Ca Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ fournissaient de nombreux calcs développés avec peu de nécrose et une viabilité parfaite.

Les figures 38 et 39a indiquent que les résultats obtenus sur le cultivar CB sont semblables à ceux observés avec le cultivar Malela 1.

4 - 3.2.2.3. Apport de $\text{NH}_4 \text{NO}_3$

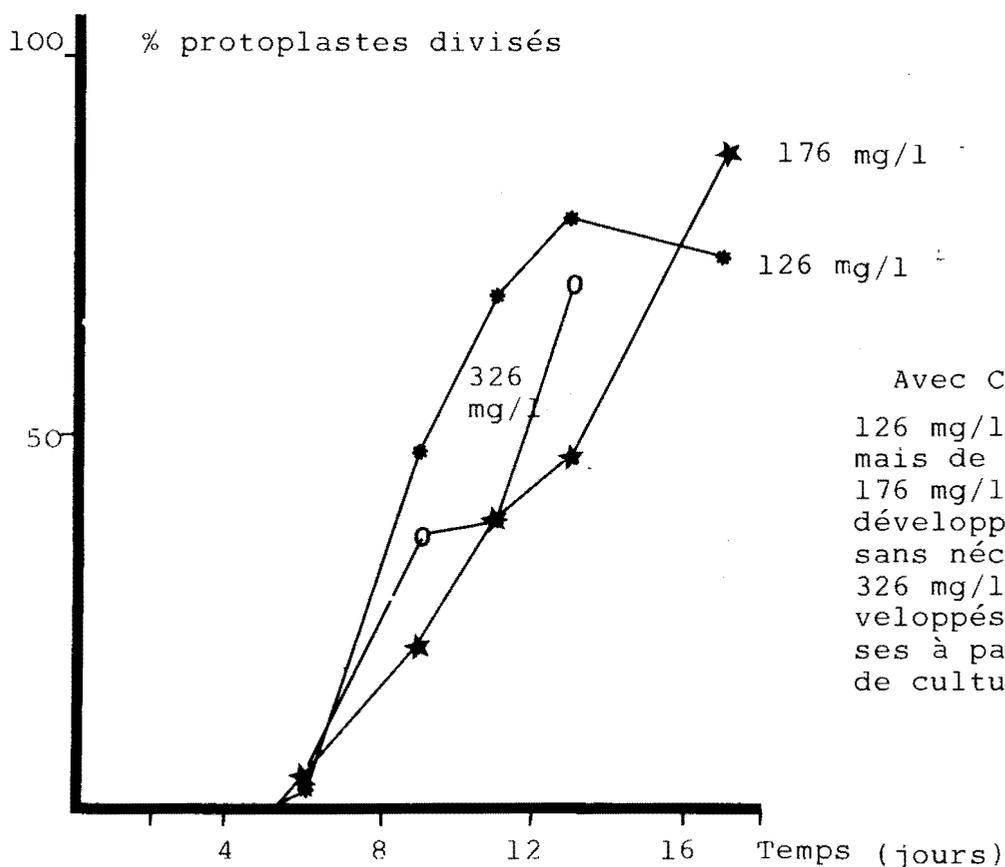
Les effets d'un apport de $\text{NH}_4 \text{NO}_3$ ont été difficiles à déceler avec le milieu M du fait d'une mortalité

Figure 37 : Divisions par clivage chez les protoplastes du cultivar Malela 1. L'observation est faite après 11 jours en fonction de la teneur du milieu en $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (cultivar Malela 1)



L'apport des quantités les plus faibles de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ induit des divisions par clivages. Cependant, les quantités de l'ordre de 126 mg/l n'induisent que des colonies de faibles dimensions et les quantités plus élevées (326 mg/l) n'induisent que des cals nombreux et compacts, mais souvent nécrosés à partir du 11e jour de culture.

Figure 38 : Courbes de division par clivage, associées à différentes quantités de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (cultivar CB)



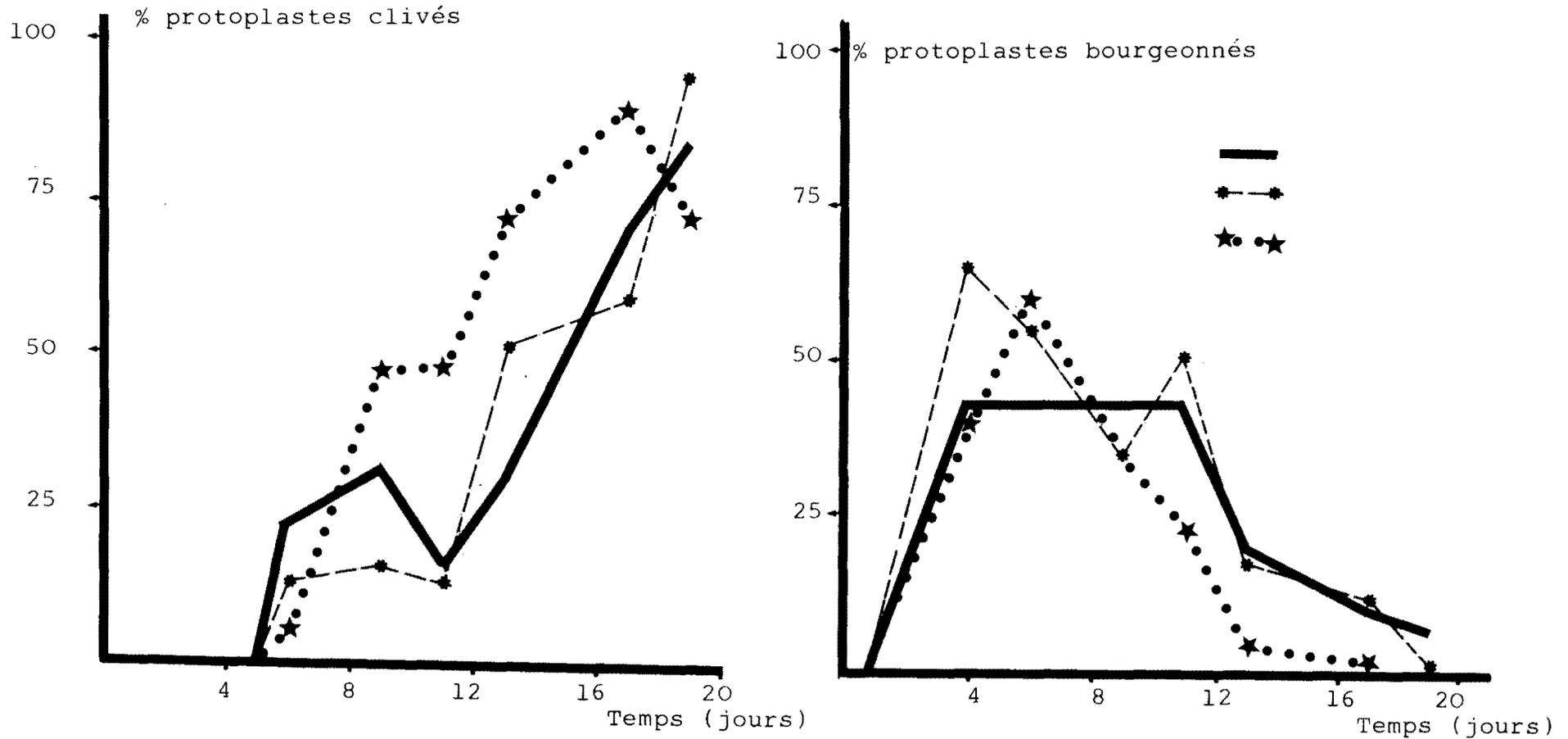
Avec $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$:

- 126 mg/l : cals précoces mais de faible dimension;
- 176 mg/l : cals bien développés, viables et sans nécrose ;
- 326 mg/l : cals très développés, mais avec nécroses à partir du 15e jour de culture

Figure 39 : Effets d'apport de $\text{Ca Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ observés sur la prolifération par clivage (a) et la prolifération par bourgeonnement (b) des protoplastes du cultivar Malela 1.

a) La quantité 176 mg/l correspond à la quantité couramment utilisée dans nos expériences assurant une bonne viabilité des cellules

b) Après le 17e jour, on observe des taux très faibles de bourgeonnements

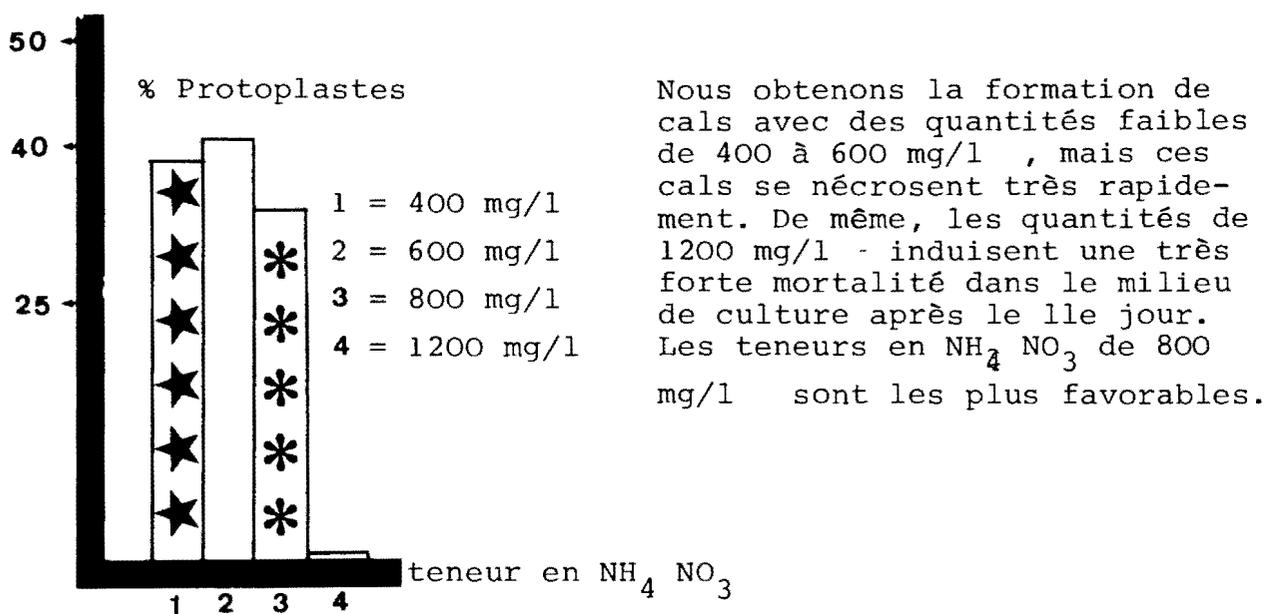


Apport en $\text{Ca Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 126 mg/l (traits pleins)
 176 mg/l (en tirets)
 326 mg/l (en pointillés)

importante enregistrée au cours de cette série expérimentale.

Comme nous le signalent les histogrammes de la figure 40,

Figure 40 : Effet d'un apport de $\text{NH}_4 \text{NO}_3$ sur les protoplastes du cultivar Malela 1.



les teneurs en $\text{NH}_4 \text{NO}_3$ de 400 à 600 mg/l conduisent à la formation de cals ; très tôt cependant, les nécroses apparaissent qui vont altérer la viabilité des cals formés. Avec les quantités de 1200 mg/l nous observons une mortalité totale sur le cultivar Malela 1 après deux semaines de culture, alors que le cultivar CB supportait même le milieu M qui contient 1200 mg/l de $\text{NH}_4 \text{NO}_3$, 800 mg/l de $\text{NH}_4 \text{NO}_3$ nous fournissaient les meilleurs résultats pour tous les cultivars utilisés et conduisaient à la formation des cals viables.

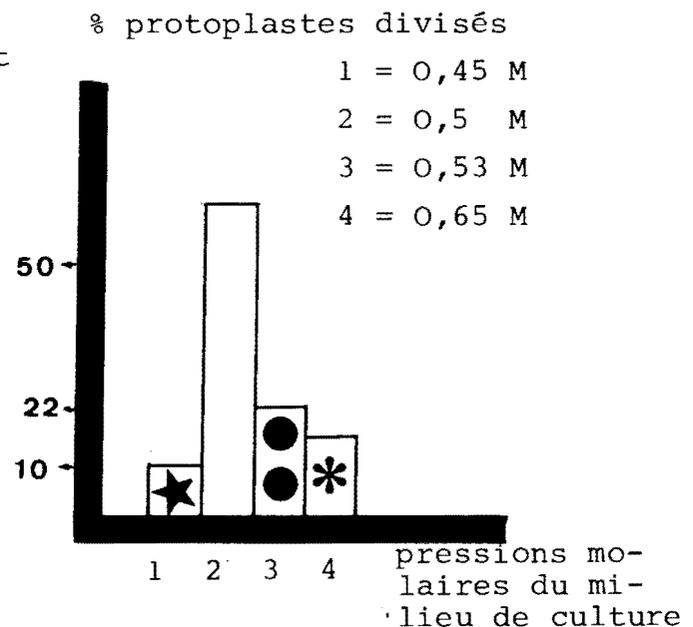
4 - 3.2.2.4. Apport du mannitol

Le mannitol est le seul stabilisateur osmotique que nous ayons utilisé. Dans nos travaux antérieurs (MABANZA 1982), nous avons constaté que les pressions osmotiques fortes (0,6 M à 0,7 M) ne favorisaient pas l'induction des divisions par clivage (milieu WO 6 et milieu F). Nous avons donc dans nos expériences récentes, employé des pressions osmotiques plus faibles.

Des divisions par clivage précoce sont obtenues avec les pressions faibles (0,45 M). Les figures 42 et 43 montrent :

Figure 41 : Effets de la pression osmotique du milieu de culture étudiés par l'apport du mannitol dans le milieu de base M (cultivar Malela 1)

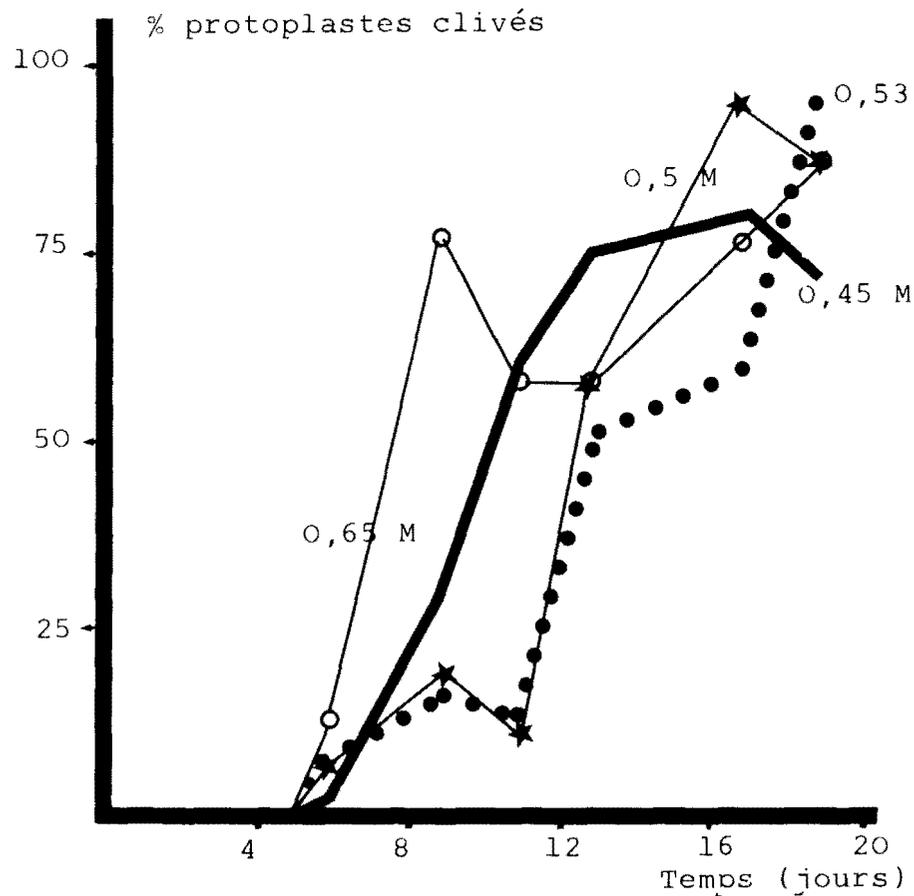
La pression de 0,5 M dans le milieu de culture induit d'une façon précoce (9 jours) un départ massif en clivage des cellules. Avec 0,45 M et 0,65 M, nous obtenons des clivages mais très tôt les cals formés se nécrosent. Les pressions 0,5 M - 0,55 M maintiennent les cals viables jusqu'à 30 jours sans changement de milieu de culture (voir aussi figure 42).



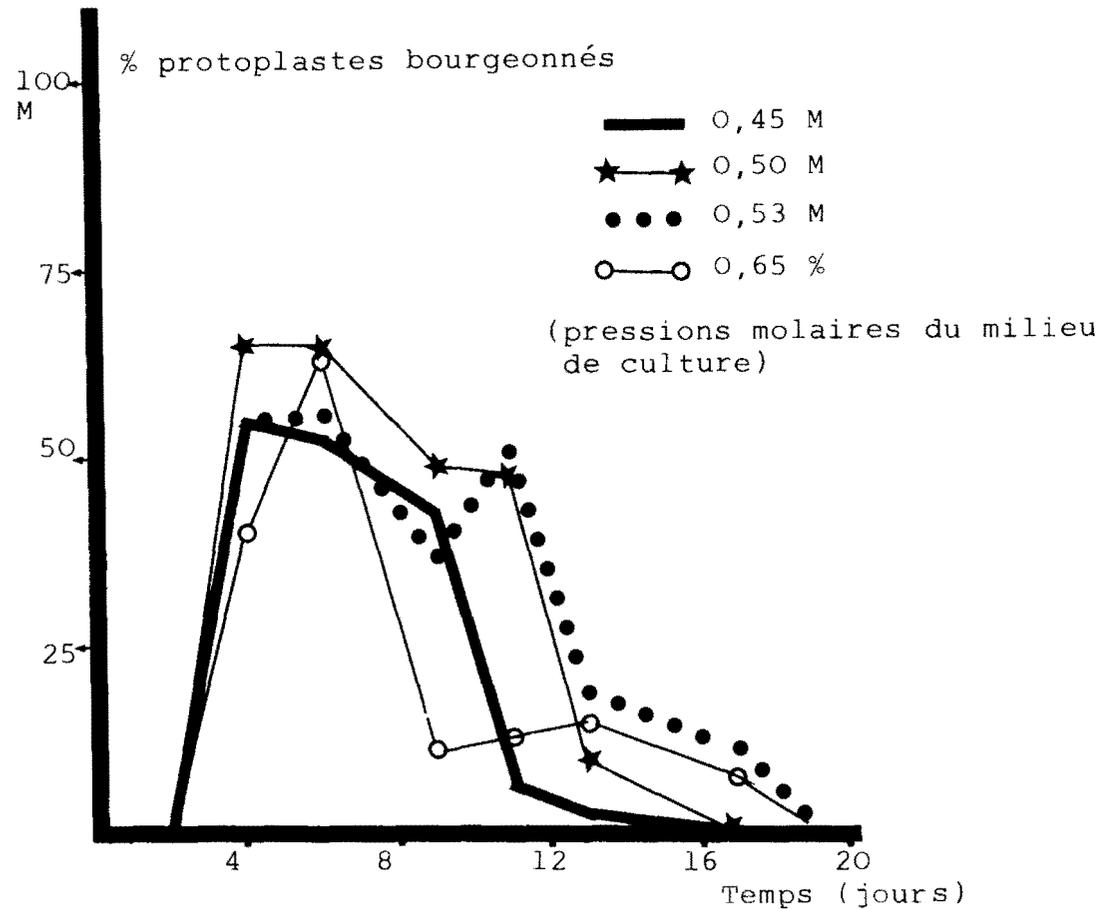
que si le cultivar Malela 1 fournit de bons résultats avec la gamme de pressions molaires situées entre 0,45 M et 0,69 M, par contre les protoplastes du cultivar CB se développent difficilement dans les solutions ayant des pressions molaires

Figure 42 : Effets de la pression osmotique du milieu de culture sur le développement des protoplastes : a) clivages ; b) bourgeonnements. Ces effets sont étudiés au moyen de l'apport du mannitol dans le milieu M (cultivar Malela 1)

42a) Courbes de prolifération par clivages



42b) Courbes de prolifération par bourgeonnements

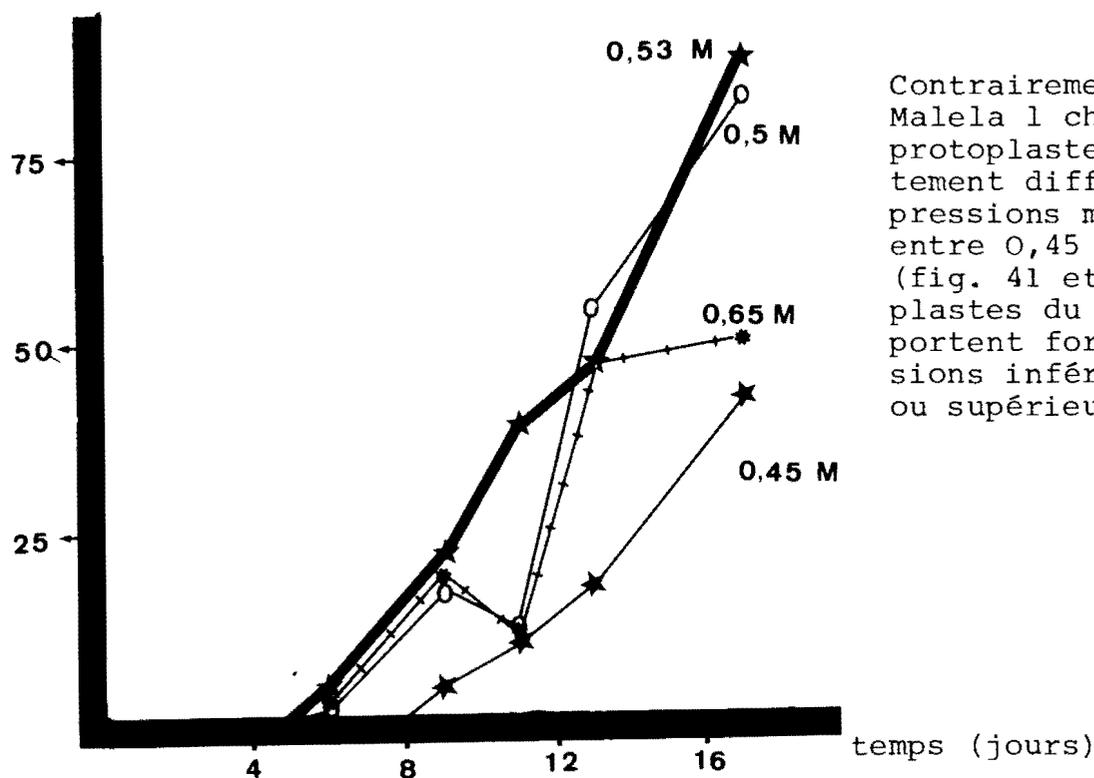


Les pressions molaires de 0,50 M et 0,53 M assurent une meilleure viabilité des cellules. A partir du 19e jour de culture, les taux des bourgeonnements sont nuls.

inférieures à 0,5 M ou supérieures à 0,55 M. En ce qui concerne le cultivar Malela 1, les pressions faibles (0,45 M) induisent de très nombreux cals peu développés tandis que les pressions élevées (0,55 M) permettent la formation de volumineux cals compacts.

La pression la plus favorable pour nos cultures est celle qui correspond à 0,5 M, soit un apport en mannitol de 0,37 M. Notons que notre milieu M possède une pression de 0,53 M, soit un apport en mannitol de 0,4 M.

Figure 43 : Courbes de divisions par clivage, obtenues sur le cultivar CB avec différentes pressions molaires du milieu de culture.



Contrairement au cultivar Malela 1 chez lequel les protoplastes ont un comportement différent pour des pressions molaires comprises entre 0,45 M et 0,65 M (fig. 41 et 42), les protoplastes du cultivar CB supportent fort mal les pressions inférieures à 0,5 M ou supérieures à 0,55 M.

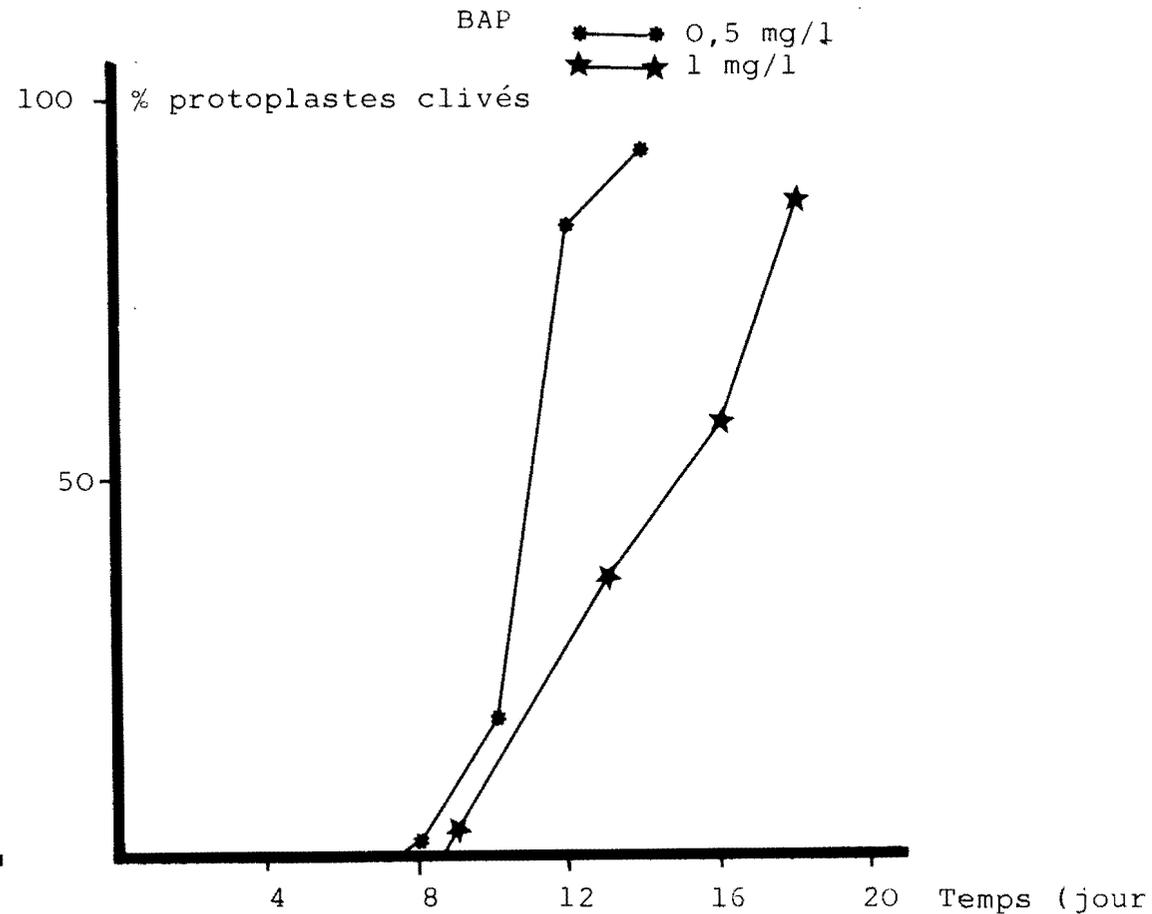
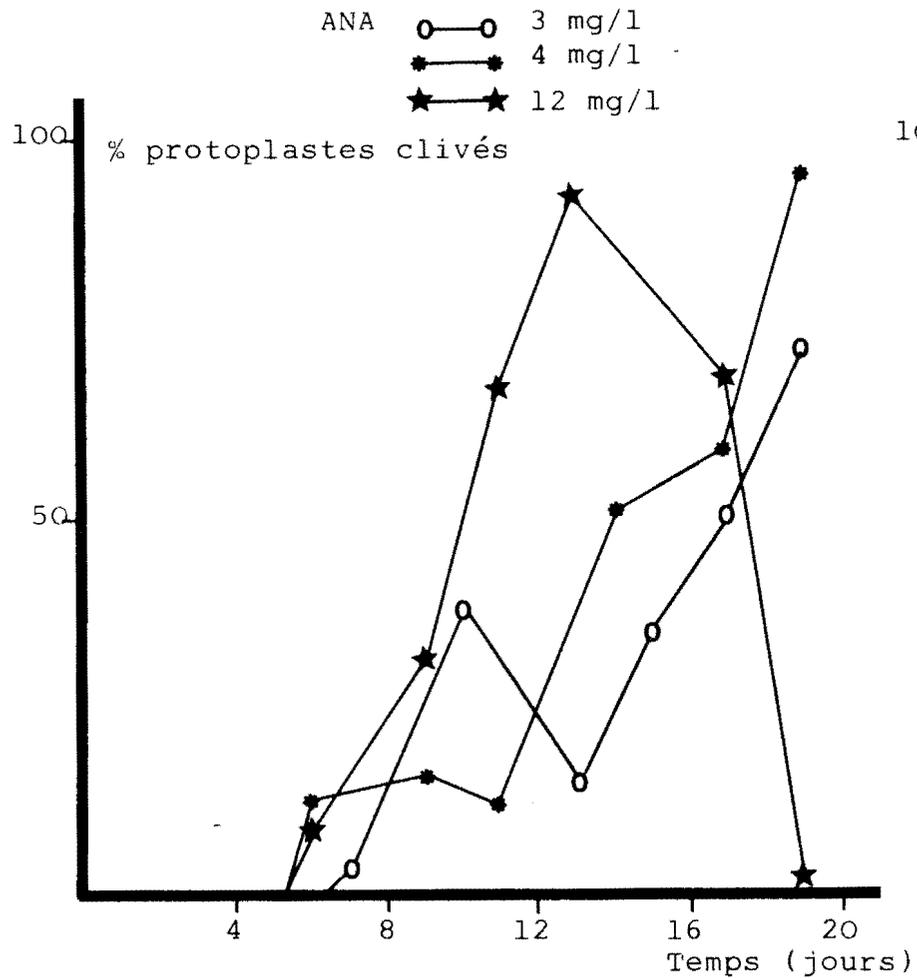
4 - 3.2.2.5. Les apports en phytohormones

A la suite d'expériences préliminaires, nous n'avons utilisé ici que deux catégories de phytohormones : une auxine, l'acide naphthalène acétique (ANA) et une cyto-

Figures 44 et 45 : Rôles de deux phytohormones associées : une auxine (ANA) et une cytokinine (BAP) dans le développement des protoplastes de manioc (*M. esculenta* Cv Malela 1)

Fig. 44 : Teneur en BAP : 0,5 mg/l

Figure 45 : Teneur en ANA : 4 mg/l



C'est à partir de 4 mg/l que nous avons obtenu de meilleurs résultats. Avec 12 mg/l nous observons une apparition massive et précoce des clivages, 10 jours après cependant, les membranes des cellules deviennent fines et les cellules forment plutôt des pseudo-cals. Les meilleurs résultats sont obtenus en présence de 0,5 mg/l de BAP. Une mortalité est observée avec 2 mg/l de BAP.

kinine, la benzylaminopurine (BAP). Les concentrations en ANA variaient de 0 à 12 mg/l avec une concentration associée en BAP égale à 0,5 mg/l. Les teneurs en BAP variaient de 0 à 2 mg/l avec une teneur associée en ANA égale à 4 mg/l.

Les figures 44 et 45 nous indiquent les résultats obtenus avec le cultivar Malela 1 en présence de deux phytohormones. Les observations effectuées signalent que les meilleurs résultats sur la division par clivage et sur la formation de cals sont enregistrés à partir de 3 mg/l d'ANA, associés à 0,5 mg/l de BAP. L'absence d'ANA n'induit aucune division par clivage et conduit à une nécrose des cellules à partir du 6e jour de culture. L'augmentation des teneurs en ANA entraîne une apparition précoce des divisions et la formation des cals viables, en moins de 2 semaines. A partir de 7 mg/l cependant, nous observons la formation de nombreux petits cals et avec 12 mg/l, à partir du 10e jour de culture, les cellules issues pourtant de division par clivage présentent une paroi de plus en plus fine, et deviennent parfaitement rondes. Les cals ont plutôt l'apparence des agglomérats cellulaires rencontrés lors du phénomène de bourgeonnement. Au 19e jour, nous n'avons obtenu qu'une faible quantité de cals bien constitués (20 %).

La concentration en BAP de 1 mg/l initie des cals très peu développés et sujets à des nécroses si l'on ne change pas rapidement de milieu de culture par un milieu neuf. Avec 2 mg/l de BAP, nous observons une très forte mortalité. L'association la plus favorable au développement des protoplastes à 4 mg/l d'ANA et 0,5 mg/l de BAP a donc été choisie.

4 - 3.2.2.6. Le rôle de la densité de culture

La majorité des travaux insistent très peu sur le rôle de la densité de culture des protoplastes. Pourtant,

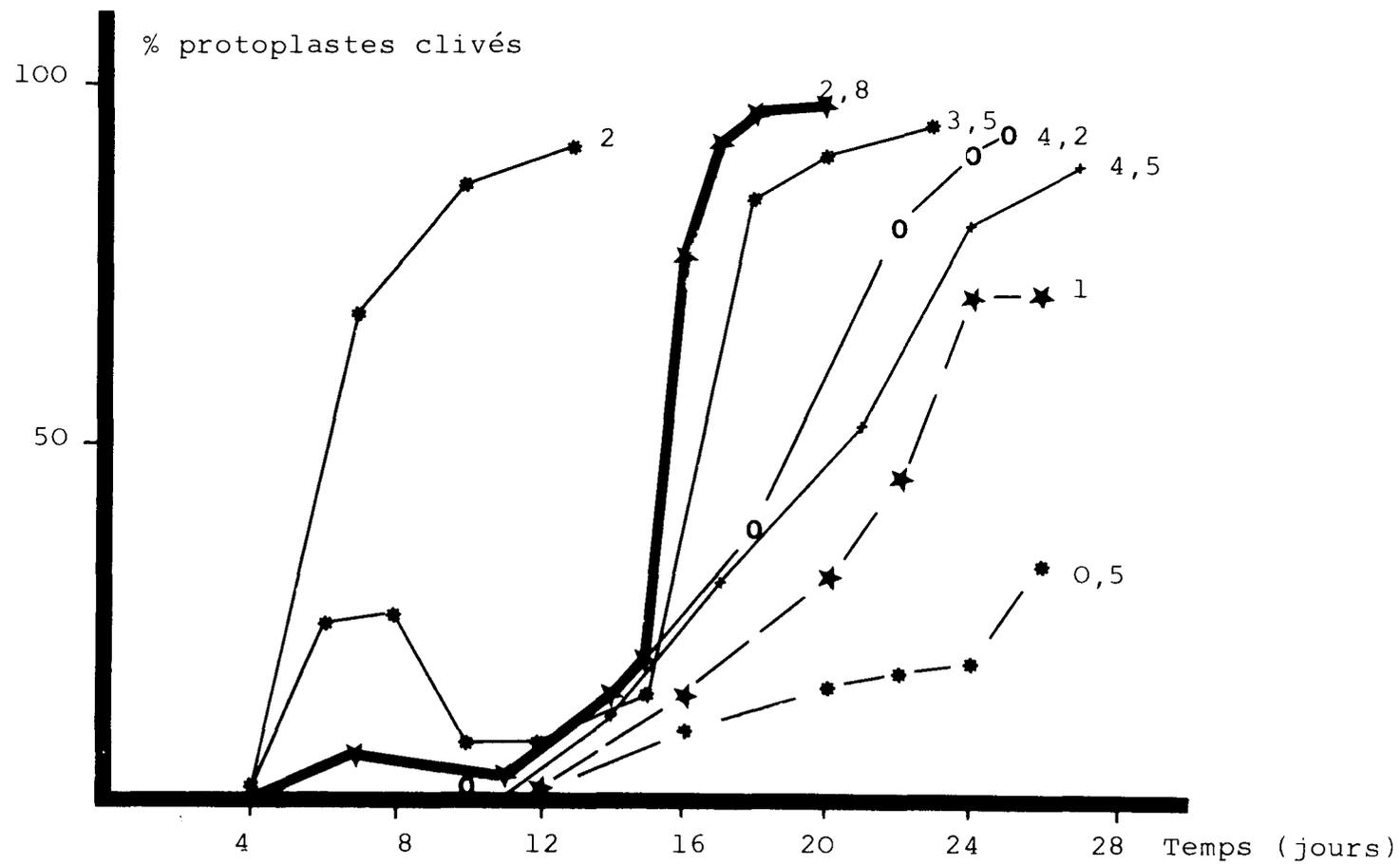
le développement des protoplastes dans le milieu M n'est satisfaisant que lorsque la culture est réalisée avec une densité convenable, même si nous pouvons observer des divisions par clivage avec des densités de culture très variées. Ces densités de culture différentes peuvent influencer profondément l'équilibre existant entre les deux types de prolifération décrits : le bourgeonnement et le clivage. Le bourgeonnement est plus marqué dans les cultures à faible densité de protoplastes. Par ailleurs, des agrégats cellulaires se forment lorsque la densité de culture est trop élevée. Ces cellules agrégées restent viables et peuvent bourgeonner pour former des agglomérats désorganisés. Et, lorsque les cellules reforment leurs parois pectocellulosiques, elles rentrent en division par clivage et forment alors dans ces conditions, des amas de cals à structure désordonnée.

Ces phénomènes de bourgeonnement et d'agrégation des cellules en fonction de la densité de culture peuvent être influencés par la mortalité qui affecte très souvent la culture des protoplastes. Nous avons vu (MABANZA 1982) que dans nos expériences, la mortalité habituelle était de 10 % environ pour les cultivars Malela 1 et CB. Cette mortalité peut varier pour une culture donnée, car elle est souvent liée à la technique d'isolement des protoplastes, l'état physiologique de la plante mère, à la pureté des solutions enzymatiques et au milieu de culture. Aussi, lorsqu'une culture subit une forte mortalité, alors la densité de culture diminue et la formation d'agglomérats cellulaires par bourgeonnement est très importante ; mais on peut aussi observer des phénomènes d'agrégation, provoqués par la toxicité du milieu, due aux débris cellulaires qui libèrent des métabolites toxiques.

La figure 46 montre que les densités de culture

Figure 46 : Effets de la densité de culture des protoplastes (exprimée en 10^5 Prot/ml) sur la prolifération des protoplastes de manioc (*Manihot esculenta* Cv Malela 1)

Les densités de culture convenables sont celles comprises entre 2 et $3,5 \cdot 10^5$ prot/ml. L'apparition des clivages est très tardive pour les densités inférieures à $2 \cdot 10^5$ prot/ml ou pour celles supérieures à $3,5 \cdot 10^5$ prot/ml.

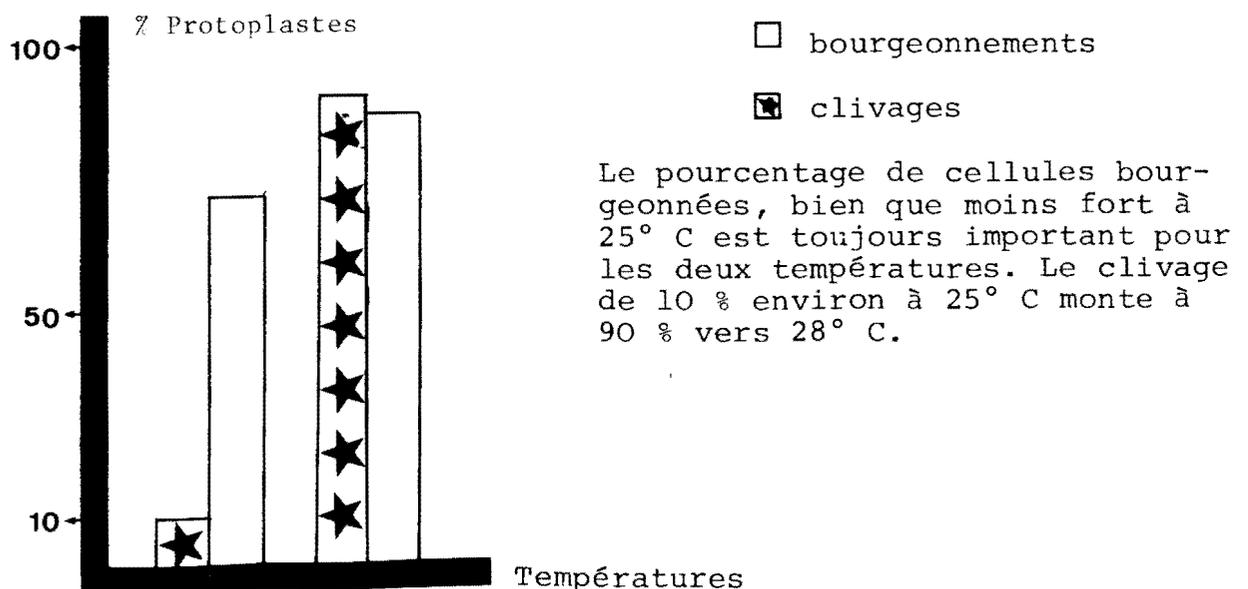


utilisables pour le cultivar Malela.1 dans le milieu M sont situées entre 2 et $3,5 \cdot 10^5$ protoplastes par millilitre. Ainsi, avec $2 \cdot 10^5$ protoplastes par millilitre, nous observons avant le 7e jour, environ 60 % de divisions par clivage, ce qui conduit à la formation de très nombreux petits cals microscopiques, en moins de deux semaines.

Pour les densités supérieures à $2 \cdot 10^5$ protoplastes par millilitre, les divisions par clivage apparaissent au cours de la première semaine de culture et demeurent peu importantes jusqu'à 15 jours, période à laquelle toute la culture entre alors en divisions par clivage (fig. 46) ; ce qui conduit à l'obtention de colonies parfaitement homogènes, d'environ 0,3 mm de diamètre dès le 20e jour de culture. Les densités de culture plus faibles, comme celles plus fortes, induisent un clivage très tardif vers le 10e jour de culture (fig. 46).

4 - 3.2.2.7. Le rôle de la température

La température joue également un rôle déterminant dans l'évolution des protoplastes au sein de nos cultures. Les expériences menées à 25°C et à 28°C montrent que si nous observons un bourgeonnement important des cellules, quelle que soit la température utilisée, par contre, le taux de division par clivage n'est que de 10 % à 25°C alors qu'il dépasse 90 % à 28°C .



Il semble donc qu'il existe un seuil en-dessous duquel la division par clivage ne s'observe pas ; ce seuil se situerait à 25° C pour nos conditions d'expérimentation.

4 - 3.2.2.8. Les différentes voies d'évolution des protoplastes

1 - Le premier mécanisme de division que nous décrirons est le bourgeonnement qui conduit à la formation d'agglomérats cellulaires sans structures organisées. Ces agglomérats constitués de cellules filles, non séparées, peuvent compter plus de 10 cellules. Ils sont dans le milieu M moins compacts que dans le milieu F (MABANZA 1982), où ils constituent de véritables "pseudo-cals". Si dans le milieu F, ces agglomérats restent sans évolution, dans le milieu M toutes les cellules peuvent rentrer en divisions par clivage à partir du 15e jour de culture. La formation de ces pseudo-cals constitue pour notre étude, la première voie d'évolution du protoplaste. Elle est observée quand le milieu ou les conditions de culture ne sont pas favorables à la formation des parois cellulaires et à l'induction des divisions par clivage.

2 - La deuxième voie commence également par un bourgeonnement, mais très tôt les cellules bourgeonnées non séparées reforment leurs parois, puis se divisent par clivage, et, constituent des cals viables. Sur ces cals, nous pouvons observer deux pôles de croissance (voir aussi fig. 33 et 34). Il semble que les cellules filles issues d'un bourgeonnement, même liées entre elles ensuite par une structure organisée (lamelle moyenne), imposent chacune de son côté un programme de fonctionnement tout à fait différent, ce qui aboutit à une croissance dissymétrique du cal (fig. 34).

3 - Dans la troisième voie d'évolution du protoplaste au sein de nos cultures, les cellules filles bourgeonnées se séparent. Elles forment leurs parois, puis se divisent par clivage et forment des colonies au développement régulier. Si pendant la période de bourgeonnement, au moment de la caryocinèse il est intervenu des accidents chromosomiques, nous pouvons donc penser que chaque cellule fille, issue du bourgeonnement est différente de l'autre. En conséquence, les colonies cellulaires viables, formées seront différentes les unes des autres. Cette voie augmente donc le nombre de colonies formées et crée parallèlement une diversité cellulaire dans la culture.

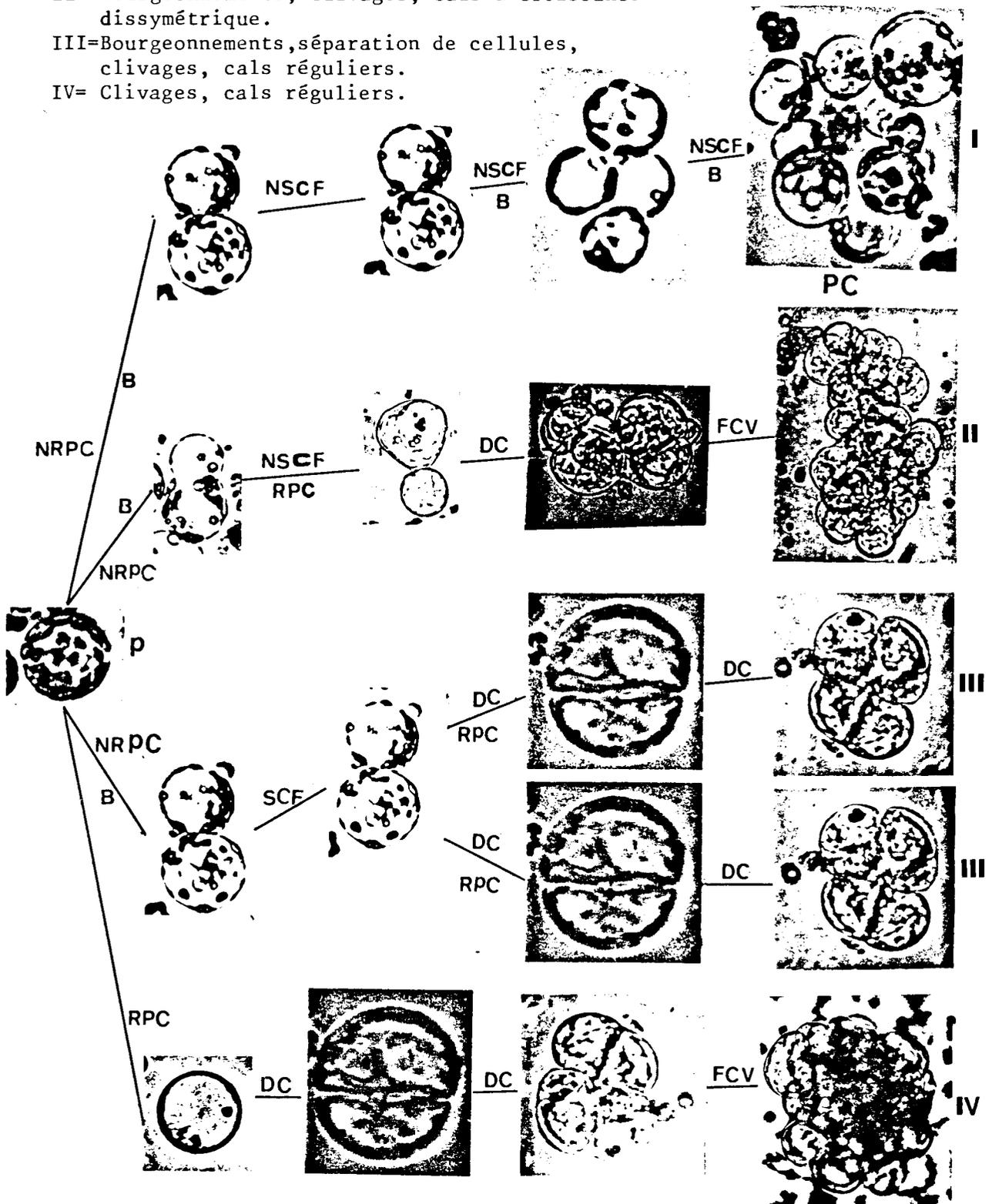
La présence dans nos cultures des cellules viables sans parois pectocellulosiques pouvant ensuite se diviser par clivage pour fournir des cals viables, présente un intérêt certain dans notre dispositif expérimental. Ainsi, au cours de nos expériences en milieu sélectif, nous pouvons prétendre à un temps d'accoutumance des cellules à la manihocine assez long, avant que celles-ci ne reforment leurs parois qui constituent pour elles un organe de protection.

4 - La quatrième voie est celle qui initie la formation rapide des parois et l'entrée en clivage des cellules. Ceci se réalise généralement à partir du 4^e jour de culture, les cals formés sont alors homogènes et présentent un développement régulier (voir également les figures 27, 28, 29 et 30).

La figure 48 nous permet de mieux comprendre ces différents mécanismes. Notons que dans le milieu M, ces quatre voies conduisent, toutes, à la formation de cals viables, capables de se développer sur milieu gélosé après le 21^e jour de culture

Fig. 48: LES DIFFERENTES VOIES D'EVOLUTION DU PROTOPLASTE OBSERVEES DANS NOS CULTURES

I = Bourgeoisements → Agglomérats cellulaires
 II = Bourgeoisements, clivages, cals à croissance dissymétrique.
 III = Bourgeoisements, séparation de cellules, clivages, cals réguliers.
 IV = Clivages, cals réguliers.



P = Protoplaste; B = Bourgeoisement; NSCF = Non séparation des cellules filles; NRPC = Non reformation des parois cellulaires; RPC = Reformation des parois cellulaires; SCF = Séparation des cellules filles; DC = Division par clivage; FCV = Formation de cal viable; PC = Pseudo-cal.

L'évolution du protoplaste de manioc dans le milieu M conduit donc à l'obtention d'une grande diversité de cals (cals à développement irrégulier, issus d'agglomérats cellulaires ou de cellules filles bourgeonnées non séparés, cals à développement régulier, issus des cellules uniques ou des cellules filles bourgeonnées et séparées). Ces différents types de cals, faciles à discerner très tôt dans le milieu liquide, ne sont plus décelables quand les cals prolifèrent activement sur le milieu gélosé. Tous les cals ainsi formés seront également viables.

4 - 3.2.3. Conclusion et discussion sur la culture
.....
de protoplastes de *Manihot esculenta* Crantz.
.....

L'obtention des divisions par clivage et la formation des colonies capables d'être entretenues facilement sur milieu gélosé, constituent donc un résultat utile. Quels que soient les éléments nutritifs ou non choisis dans les limites que nous avons fixées dans notre expérimentation, il est possible d'obtenir avec le milieu M de très nombreux cals viables. Pour certaines conditions de nutrition (forte teneur en ANA ou en $\text{Ca Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ par exemple), nous pouvons obtenir un taux élevé de divisions par clivage d'une manière précoce ; il faut alors souvent changer de milieu au cours de la 2e semaine (10e jour), afin d'éviter l'apparition des nécroses et de préserver ainsi la viabilité des cals. Nous avons choisi la composition équilibrée du milieu M qui a le mérite d'induire des divisions par clivage d'une façon homogène, même dans les cas d'isolements à forte mortalité, et de conserver les cals formés dans de bonnes conditions jusqu'à 1 mois environ sans transfert dans un milieu neuf. Compte-tenu de notre dispositif expérimental, cela nous a donné une latitude de travail suffisamment large.

A cette étape de notre expérimentation, nous pouvons affirmer que les protoplastes de manioc peuvent facilement être isolés et mis en culture pour donner des colonies viables que nous pouvons entretenir sans difficulté.

Notre expérimentation a permis de mettre en évidence 4 voies différentes d'évolution du protoplaste de manioc dans le milieu M. Chacune de ces voies semble imprimer un programme de fonctionnement différent à la descendance de chaque cellule mère. Si nous obtenons des individus identiques aux parents avec la voie 4, il n'en sera pas de même avec les 3 premières voies au cours desquelles le mode de division observé lors des premiers stades semble impliquer une dissymétrie de fonctionnement dans la descendance. La 4e voie serait donc une voie "conservatrice" et les trois premières voies, des voies "diversifiantes". Remarquons que dans la plupart de nos cultures, les cellules évoluent tout d'abord dans une voie diversifiante (bourgeoisement), avant de suivre une voie conservatrice (division par clivage).

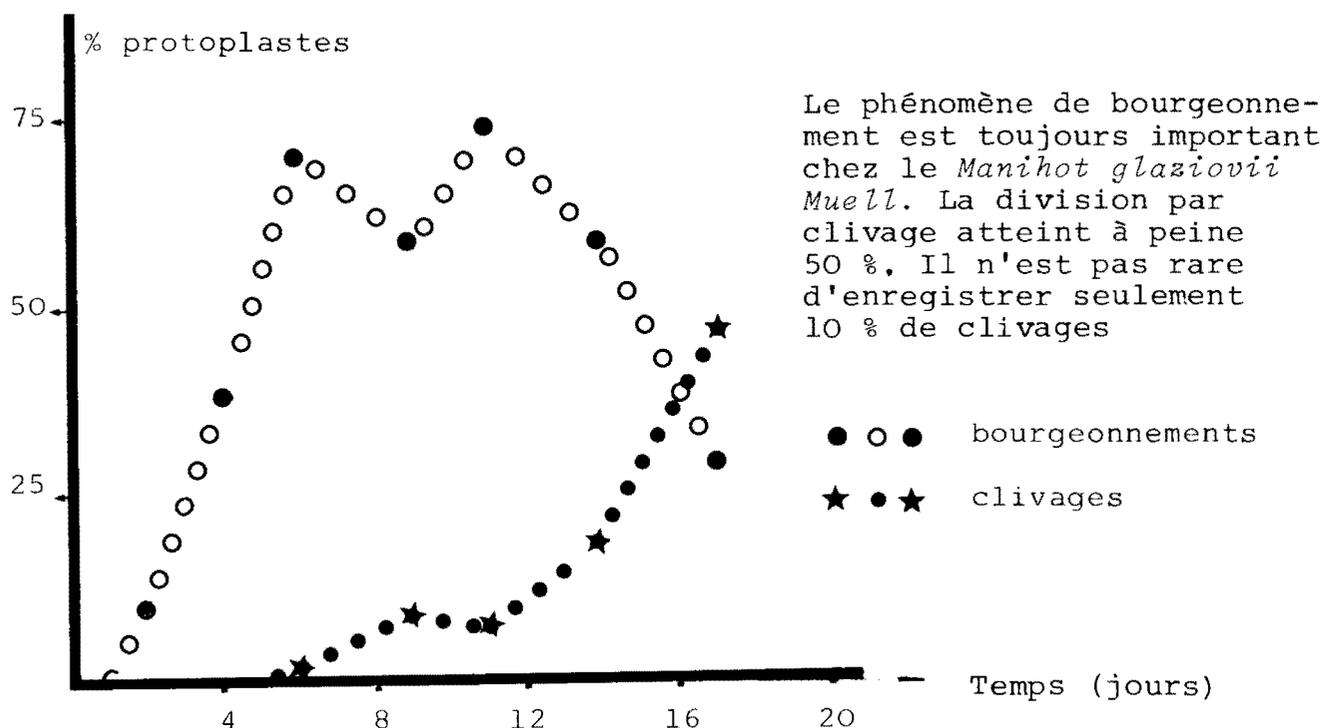
La quantité de protoplastes isolés par gramme de limbe, les manipulations rares pendant la culture en milieu liquide et la formation en grand nombre des cals viables nous permettent de conclure qu'à partir de très peu de matériel, nous sommes capables d'obtenir de nombreux protoplastes viables et d'induire la formation de milliers de cals. Une situation transmissible survenue au cours de la culture peut donc être facilement conservée et entretenue. Si un succès analogue est obtenu dans le cas des cultures de protoplastes chez le *Manihot glaziovii* Muell, espèce résistante à la bactériose due au *Xanthomonas campestris pathovar manihotis*, notre dispositif sera alors solidement établi.

4 - 3.2.4. Le développement in vitro des protoplastes
de *Manihot glaziovii* Muell

4 - 3.2.4.1. Le développement des protoplastes en milieu liquide

Les figures 49, 50, 51 et 56 montrent que les protoplastes de *Manihot glaziovii* Muell sont viables et aptes à proliférer lorsqu'ils sont entretenus dans le milieu M. Comme chez le *Manihot esculenta* Crantz, le bourgeonnement des cellules commence après 24 h de culture. Cette division atteint près de 70 % de cellules au 6e jour (fig. 49). Contrairement aux protoplastes de *Manihot esculenta* Crantz, le bourgeonnement chez *Manihot glaziovii* Muell reste très important tout au long de la culture. Au 17e jour, les pseudo-cals constitués par bourgeonnements de cellules représentent 30 % environ des cellules, pourcentage élevé si on le compare à celui observé sur des cultures de *Manihot esculenta* Crantz qui à ce stade est pratiquement nul.

Figure 49 : Division par bourgeonnement et division par clivage chez les protoplastes de *Manihot glaziovii* Muell.



Dans les meilleures conditions, nous observons des divisions par clivage à partir du 6e jour. Ces divisions vont évoluer comme pour les cultures de *Manihot esculenta* Crantz (fig. 36 et 49). A partir du 15e jour, nous obtenons un pourcentage de divisions par clivage assez élevé qui atteindra près de 50 % au 17e jour. A ce moment les cals formés ont environ 0,2 mm de diamètre. Ils peuvent séjourner dans le milieu liquide sans nécessiter de transfert ultérieur dans un milieu neuf. Jusqu'au 45e jour, temps après lequel ils se nécrosent et dépérissent. Ces cals vigoureux restent de couleur jaune pâle pendant toute la durée de leur culture.

4 - 3.2.4.2. Le développement sur milieu gélosé

Après 30 jours dans ce milieu M liquide, les cals peuvent être repris à l'aide d'une pipette stérile et transférés sur milieu gélosé où ils vont proliférer activement. Les milieux riches en cytokinines (2 mg/l de BAP) ne permettent pas un développement vigoureux de ces cals qui brunissent et présentent un développement ralenti. Mais, lorsque ces cals sont transférés dans des milieux n'ayant que très peu de cytokinines, la prolifération devient alors active et une légère coloration verte apparaît. Ces cals peuvent manifester des propriétés organogènes et initier des racines. Cependant, ces racines sont apparues tardivement après 8 mois et elles sont moins nombreuses que chez le *Manihot esculenta* Crantz.

4 - 3.2.4.3. Les facteurs qui influencent le développement des protoplastes de *Manihot glaziovii* Muell dans le milieu M : les densités de cultures

Comme l'indique le tableau VI, les densités de culture qui nous ont donné les meilleurs résultats sont celles comprises entre $0,5 \cdot 10^5$ et $1,5 \cdot 10^5$ protoplastes par millilitre.

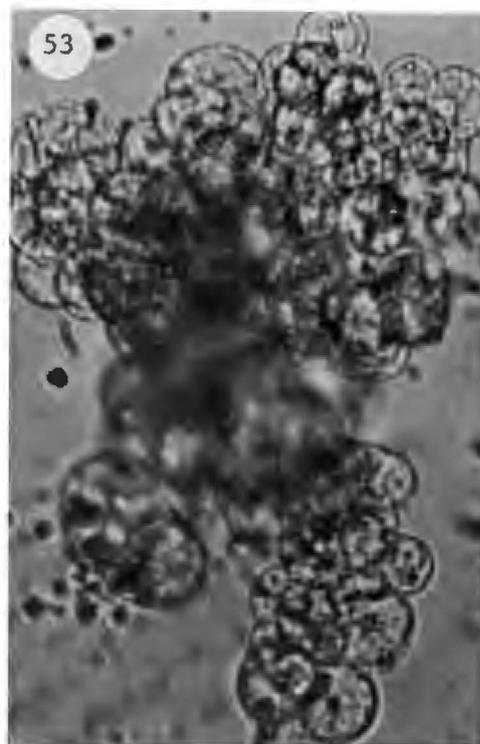
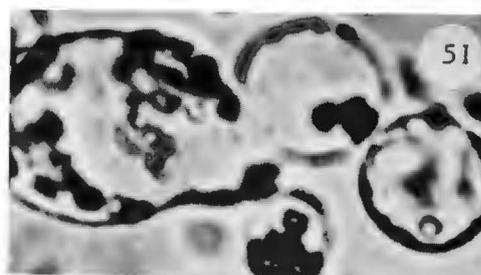
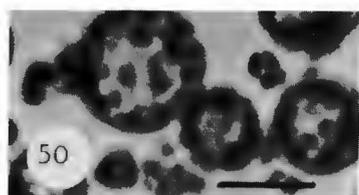


Fig. 50: Protoplastes fraîchement isolés de M. glaziovii Muell
(la barre = 20 μ m)

Fig. 51: Bourgeoisements successifs d'une cellule.

Fig. 52: Début de division par clivage.

Fig. 53: Formation de micro cal viable en milieu liquide.

Fig. 54: Développement actif d'un cal sur milieu gélosé.

Contrairement aux cals de M. esculenta Crantz qui sont vert intense, les cals de M. glaziovii Muell sont facilement reconnaissables car très peu chlorophylliens; dans les milieux riches en cytokinines ils sont bruns ou jaunes pâle.

Tableau VI : Les effets des densités de culture sur la prolifération des protoplastes de *Manihot glaziovii* Muell

Densité de culture en prot./ml	Délai d'apparition des clivages (en jours)	Pourcentages des protoplastes en clivages
$0,5 \cdot 10^5$	18	8 %
$0,8 \cdot 10^5$	12	8 %
$1 \cdot 10^5$	6	47 %
$1,5 \cdot 10^5$	6	47 %
$2 \cdot 10^5$	-	-

On peut remarquer que les densités de culture convenables se situent entre $0,5 \cdot 10^5$ p/ml et $1,5 \cdot 10^5$ p/ml.

Les densités de cultures sont les seuls facteurs qui ont influencé le développement des protoplastes de *Manihot glaziovii* Muell dans nos expériences. Il convient de signaler que pour l'étude des autres facteurs, les expériences nombreuses mises au point, en ce qui concerne l'apport de certains éléments comme le $\text{Ca Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, le $\text{NH}_4 \text{NO}_3$, le mannitol, l'ANA et la BAP etc..., ces expériences n'ont guère été concluantes et le taux de 47 % de divisions par clivage n'a jamais été dépassé. La composition du milieu M a donc été maintenue telle qu'elle pour la suite de nos expérimentations sur les protoplastes de *Manihot glaviozii* Muell.

4 - 3.2.4.4. Discussions

D'une manière générale, si l'obtention des protoplastes de *Manihot glaziovii* Muell est aussi aisée que celle du *Manihot esculenta* Crantz (paragraphe 4 3 1, tab. V), la réponse de ces protoplastes ne s'effectue pas dans les mêmes limites de densités de culture. Toutefois, l'obtention de cals à croissance indéfinie sur *Manihot glaziovii* Muell est pour nous fort encourageante. Le *Manihot glaziovii* Muell est une espèce ligneuse arbustive, le taux de 47 % de formation de cals viables est donc appréciable.

Par ailleurs, les protoplastes de *Manihot glaziovii* Muell offrent les mêmes possibilités d'évolution que ceux de *Manihot esculenta* Crantz dans le milieu M, à savoir : bourgeonnement avec séparation ou non de cellules filles, division par clivage chez les cellules uniques, comme dans les agglomérats cellulaires. Les cals formés sont viables et organogènes et peuvent initier des racines.

Le comportement in vitro des protoplastes de *Manihot glaziovii*, semblable à celui des protoplastes de *Manihot esculenta* Crantz nous permet d'envisager favorablement la suite de notre expérimentation.

Ainsi, pour nos tests de sensibilité à la manihocine des protoplastes de *Manihot esculenta* Crantz, nous pourrions utiliser les protoplastes de *Manihot glaziovii* Muell comme témoin-résistant, et, la fusion des protoplastes entre les deux espèces devrait aboutir à la création des cellules hybrides viables, capables de proliférations cellulaires.

4 - 3.3. Conclusion sur l'isolement et la culture des protoplastes des espèces *Manihot esculenta* Crantz et *Manihot glaziovii* Muell

Nous sommes, maintenant, en mesure de dégager

quelques caractéristiques importantes sur la culture des protoplastes des deux espèces.

La multiplication rapide, développée sur la culture du méristème chez les deux espèces nous permet d'obtenir des plantes saines, en un temps relativement court.

Le microbouturage in vitro rapide que nous avons mis au point, nous permet de disposer en quantité et en temps voulu du matériel végétal des deux espèces et de travailler dans des conditions parfaitement homogènes.

La mise au point d'une technique d'isolement conduit à l'obtention en quantité élevée de protoplastes viables (jusqu'à plus de 4.10^7 protoplastes par gramme de limbe), la confection d'un milieu de culture capable d'entretenir la vie cellulaire dans des conditions souhaitables jusqu'à l'obtention dans un court délai, des cals à croissance indéfinie, sont autant des conditions favorables.

Les modifications légères du milieu de culture peuvent influencer le comportement des protoplastes. On peut, en effet, par l'apport de certains éléments (mannitol, $Ca Cl_2 \cdot 2H_2O$, phytohormones etc...), ou par changements des densités de culture, modifier le développement des protoplastes de manioc, sans altérer leur viabilité, ou encore obtenir des cals viables en moins de 2 semaines, ou prolonger la durée du séjour en milieu liquide jusqu'à 1 mois, sans modifier la capacité de prolifération du protoplaste.

L'évolution du protoplaste dans le milieu M se réalise par deux voies principales. La première voie, classique, est celle qui permet à un protoplaste de régénérer en l'espace de 48 heures sa paroi pecto-cellulosique et de se diviser par clivage, ceci ne permet par conséquent aucune modification au niveau des cellules ; elle obéit à la multiplication conforme ; nous l'avons donc appelée

"voie conservatrice". La seconde voie, par contre, s'établit par l'intermédiaire des bourgeonnements successifs. Les cellules filles obtenues à partir de ce type de division sont dans beaucoup de cas dissymétriques (taille très différente, cellules binuclées, certaines ayant très peu de chloroplastes par rapport à d'autres, issues de la même cellule mère). Cette deuxième voie nous l'avons qualifiée de "voie diversifiante".

L'obtention des cals viables à partir de toutes les cellules peut donc conduire à une diversité de "situations" dans notre culture cellulaire.

Essayons maintenant de mettre au point un système expérimental permettant de créer une variabilité orientée vers la résistance du manioc aux attaques de bactériose provoquées par *Xanthomonas campestris pathovar manihotis*.

4 - 4. ETUDE DES SYSTEMES D'OBTENTION D'UNE VARIATION ORIENTEE DANS LE SENS DE LA RESISTANCE DU MANIOC A LA BACTERIOSE

4 - 4.1. L'utilisation d'un milieu sélectif à manihocine

4 - 4.1.1. Mise en évidence de l'effet toxique de la manihocine

Xanthomonas manihotis, agent responsable du flétrissement bactérien du manioc, se développe favorablement sur milieu synthétique, utilisant comme source de carbone l'hydroxyéthyl-cellulose (HEC). Le filtrat isolé d'une culture de 2 jours, induit *in vitro* sur lobe foliaire un flétrissement du même type que celui rencontré dans les plantations attaquées par la bactérie (MABANZA 1982). Après

son isolement du filtrat, la fraction purifiée a confirmé les symptômes de flétrissement au niveau des différents bio-essais mis au point au cours de nos expériences (fig. 57, 58, 59). Le flétrissement observé dans nos tests a été plus ou moins intense, parfois inexistant suivant que le cultivar est plus ou moins résistant à la bactériose due au *Xanthomonas campestris pathovar manihotis* (fig. 59 et 57).

Nous pouvons donc dire que les bio-essais que nous avons réalisés indiquent un effet toxique de l'extrait de culture de *Xanthomonas campestris pathovar manihotis*. Cette action toxique s'exprime par le flétrissement du lobe foliaire : organe que nous avons utilisé pour nos bio-essais. Les témoins utilisés n'ayant jamais exprimé des symptômes de flétrissement (fig. 58), on peut affirmer que cette action toxique est bien liée à la culture du parasite sur le milieu liquide. La culture de *Xanthomonas manihotis* sur milieu synthétique produit donc une substance toxique, capable d'induire un flétrissement sur les lobes fraîchement cueillis des cultivars sensibles de l'espèce *Manihot esculenta Crantz*.

Les figures 57, 58, et 59 montrent que les cultivars CB et MM 78 sont les plus sensibles à la toxine. Malela 1 est un peu moins sensible. Dans nos différents bio-essais, MA 255 n'a manifesté que des symptômes atténués de flétrissement (MABANZA 1982). Le cultivar de l'espèce *Manihot glaziovii Muell* semble résistant à la toxine bactérienne.

Il existe donc une différence de sensibilité des cultivars au flétrissement induit par l'extrait toxique au niveau de nos bio-essais. La manihocine peut donc être utilisée *in vitro* comme un agent de criblage des cultivars de *Manihot esculenta Crantz*, vis à vis de leur ré-

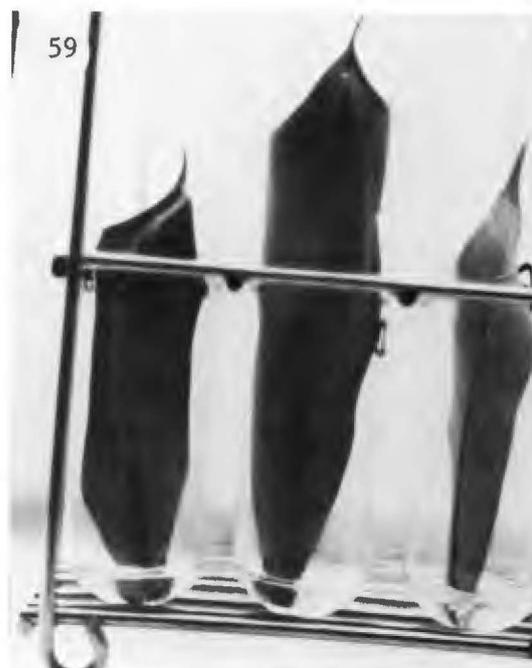
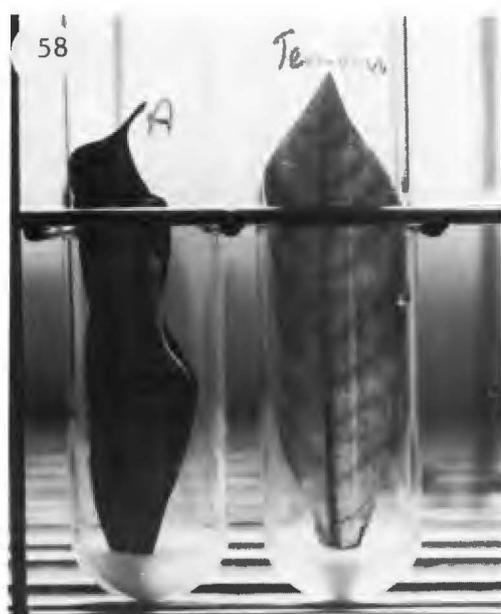


Fig. 55: Isolement de *Xanthomonas campestris pathovar manihotis* suivant la technique de BRADBURY (1978). *X. manihotis* a été caractérisé au Congo par DANIEL et al. (1978).

Fig. 56: Le lobe foliaire détaché est un organe qui reste en survie jusqu'à plus de 8 mois, il s'enracine dans l'eau et reste vert. Il peut donc être utilisé dans un bio-essai.

Fig. 57: Les bio-essais effectués sur *M. esculenta* Crantz cv MM 78 et *M. glaziovii* Muell montrent qu'après 3 jours le lobe de MM 78, à gauche a complètement flétri, celui de *M. glaziovii* Muell à droite reste vivant et n'est pas sensible aux effets toxiques de la manihocine.

Fig. 58: Bio-essai sur le cultivar CB. On note un effet toxique très prononcé sur le lobe (A) en présence de la manihocine. Le lobe mis dans le traitement témoin-sbstrat ne montre aucun symptôme de flétrissement.

Fig. 59: Bio-essai sur 3 cultivars de *M. esculenta* Crantz. De gauche à droite: MM 78 = flétrissement prononcé; CB = flétrissement prononcé et Maléla 1 = le lobe reste encore vert, seule la partie terminale a flétri.

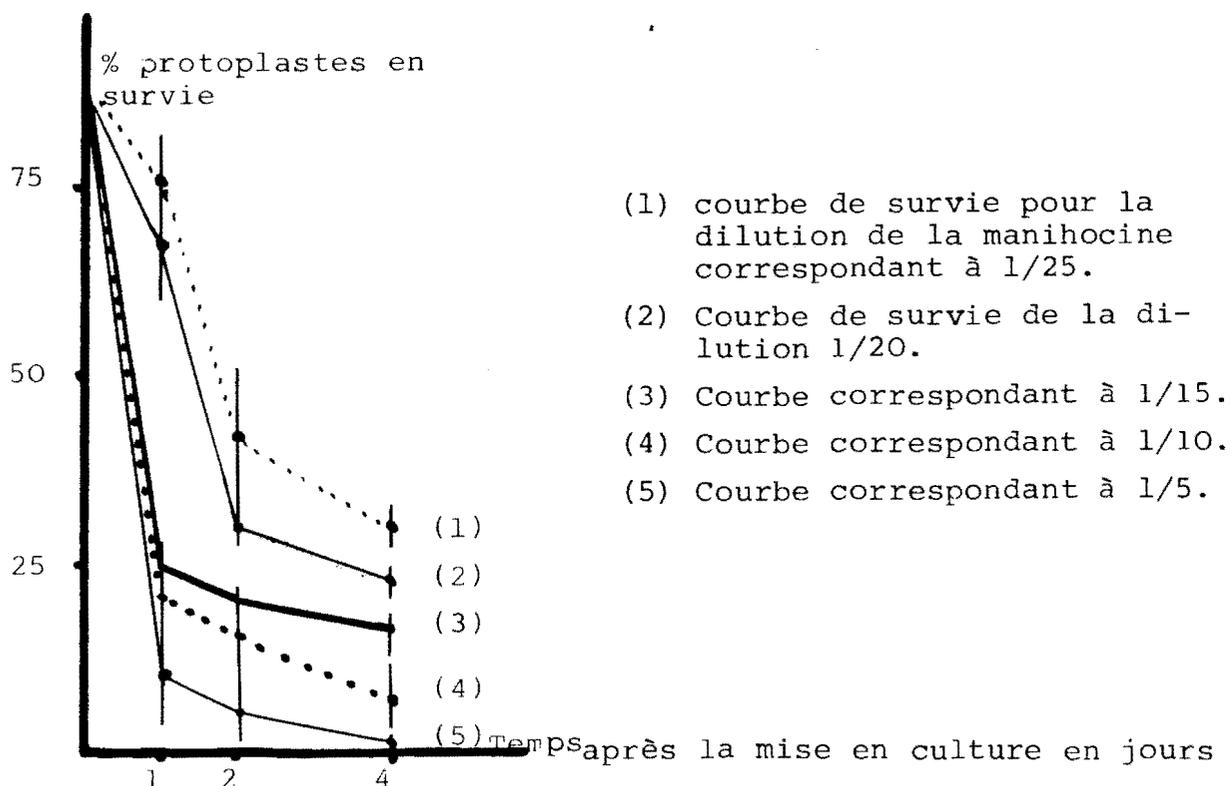
sistance à la bactériose due au *Xanthomonas campestris* pathovar *manihotis*. Elle peut par conséquent contribuer à la confection d'un milieu sélectif de choix au niveau de notre expérimentation sur les protoplastes.

4 - 4.1.2. Culture des protoplastes dans le milieu à manihocine

Ce travail qui a débuté en 1982 (MABANZA 1982) avec des protoplastes mis en culture dans le milieu de CABOCHE (1980), a été poursuivi dans nos expériences récentes en utilisant le milieu M qui permet une meilleure évolution des protoplastes en culture.

4 - 4.1.2.1. La survie des protoplastes dans le milieu de manihocine

Figure 60 : Taux de survie des protoplastes en fonction de la quantité de manihocine, dans le milieu de culture M (V/V). Les dilutions effectuées correspondent à 1/25, 1/20, 1/15, 1/10 et 1/5 (V/V)



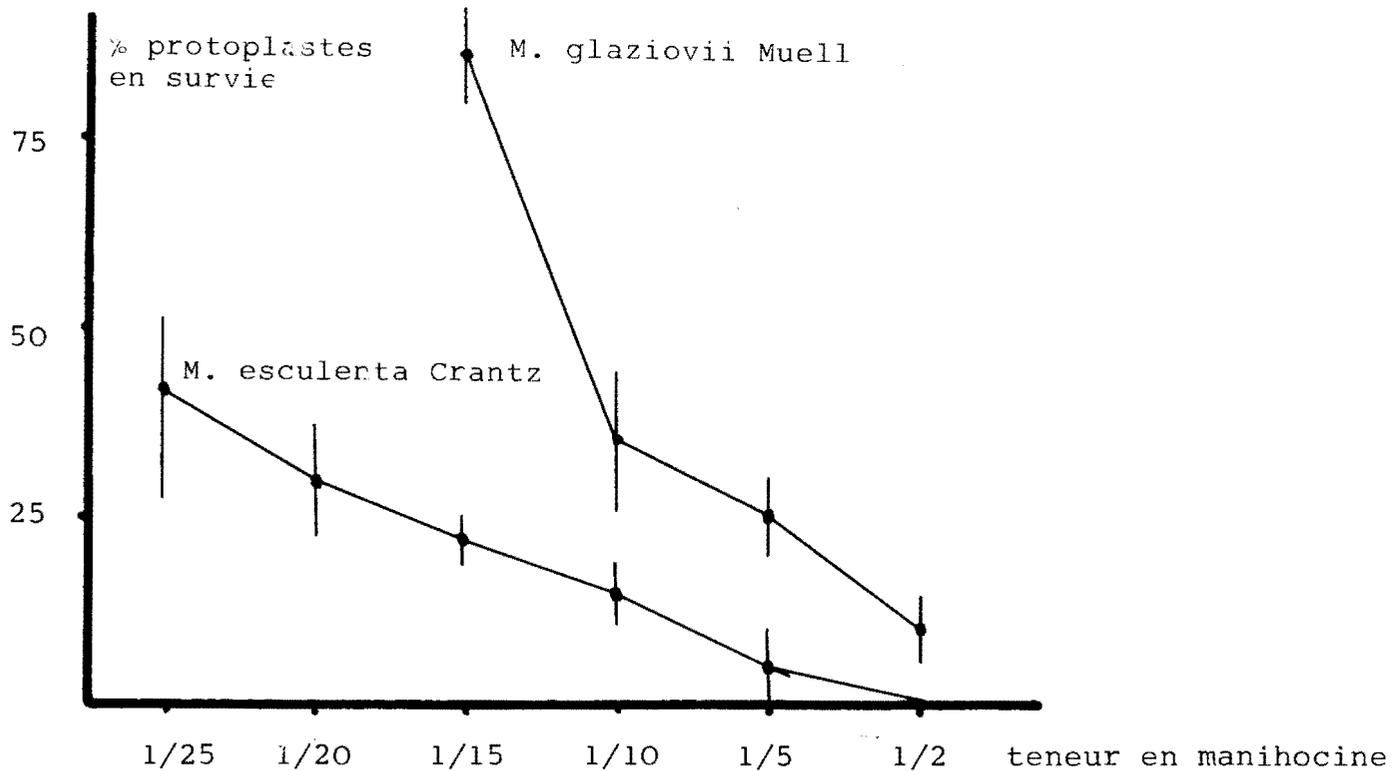
Les valeurs marquées sont des moyennes de trois répétitions avec 5 comptages par répétition (cultivar CB).

Au 4^e jour, beaucoup de cellules bourgeonnent. On peut donc considérer qu'à partir de ce moment, les cellules présentes dans le milieu sont viables. Ainsi, donc, nous voyons qu'avec 1/25 de manihocine, nous n'avons plus que 30 % de cellules vivantes, 22 % de cellules pour 1/20, 16 % de cellules pour 1/15, 6 % de cellules survivantes pour la dilution de 1/10 et une mortalité presque totale pour 1/5 de manihocine.

La figure 60 indique les pourcentages de survie des protoplastes du cultivar CB en fonction de la dilution de la manihocine (V/V) et en fonction du temps. Avec 1/25 de manihocine, nous comptons 30 % de cellules en survie au 4^e jour. Le comptage des protoplastes en survie a été cependant rendu délicat par le phénomène de bourgeonnement qui intervient dans ces cultures après le second jour, dans la mesure où l'on sait qu'après le bourgeonnement, les cellules filles peuvent ou ne pas se séparer. Ce qui n'a pas été le cas en ce qui concerne les faibles dilutions (1/2, 1/5 et 1/10) pour lesquelles nous avons observé une très forte mortalité.

FIGURE 61 : Courbe de survie des protoplastes des espèces *Manihot esculenta* Crantz, Cv CB et *Manihot glaziovii* Muell, en fonction des teneurs en manihocine. Les comptages sont effectués après 2 jours de culture. Les valeurs indiquées sont des moyennes de 3 répétitions avec 5 comptages par répétition.

Nous constatons qu'une teneur de 1/15 en manihocine n'affecte pas les protoplastes de *Manihot glaziovii* Muell. Cette quantité laisse en survie seulement 22 % de protoplastes chez l'espèce *Manihot esculenta* Grantz, Cv CB sensible. Nous avons retenu cette dilution de 1/15 pour nos expériences ultérieures.



Dans la figure 61, nous comparerons les courbes de survie des 2 espèces *Manihot esculenta* Crantz CV CB et *Manihot glaziovii* Muell en fonction de différentes dilutions en manihocine dans le milieu M. Ces courbes ont été tracées en fonction des comptages effectués 2 jours après la culture, ceci en raison du bourgeonnement qui peut apparaître après 2 jours. Nous pouvons constater qu'à la dilution 1/15, les protoplastes de *Manihot glaziovii* Muell ne sont pas détruits par la manihocine, quand nous n'avons que 22 % de protoplastes en survie pour le cultivar CB sensible à la bactériose. Et quelle que soit la quantité de manihocine utilisée, nous devons remarquer que les protoplastes de *Manihot glaziovii* Muell la supportent mieux.

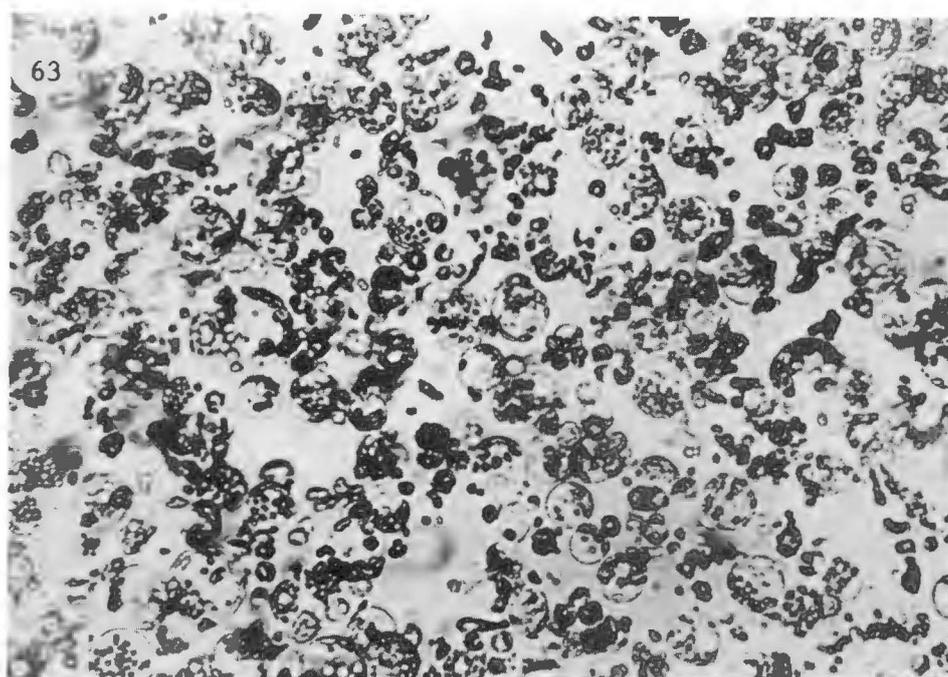
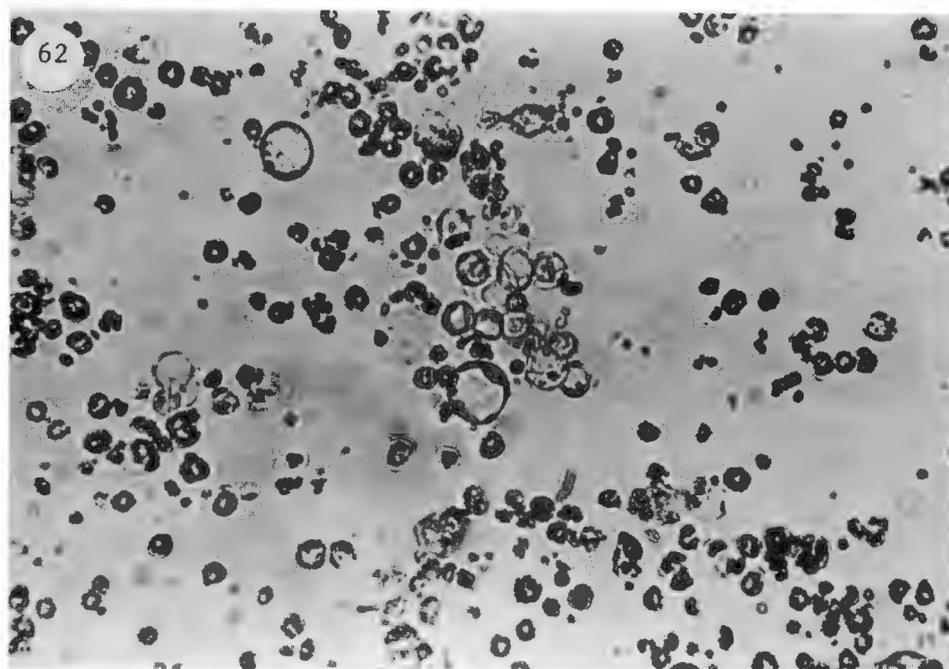


Fig. 62: Survie des protoplastes du cultivar CB dans le milieu MX renfermant $1/15$ de manihocine: 16% de cellules restent viables.

Fig. 63: Protoplastes du cultivar CB dans le milieu MT (milieu témoin préparé le témoin-substrat Hydrxyéthylcellulose ayant subi le même procédé de purification que la toxine): aucune mortalité observable.

Nous pouvons donc considérer que les protoplastes de *Manihot glaziovii* Muell sont résistants à la manihocine. Dans nos expériences ultérieures, effectuées uniquement avec le dilution 1/15, ces protoplastes de *Manihot glaziovii* Muell vont donc nous servir de témoins résistants à la manihocine.

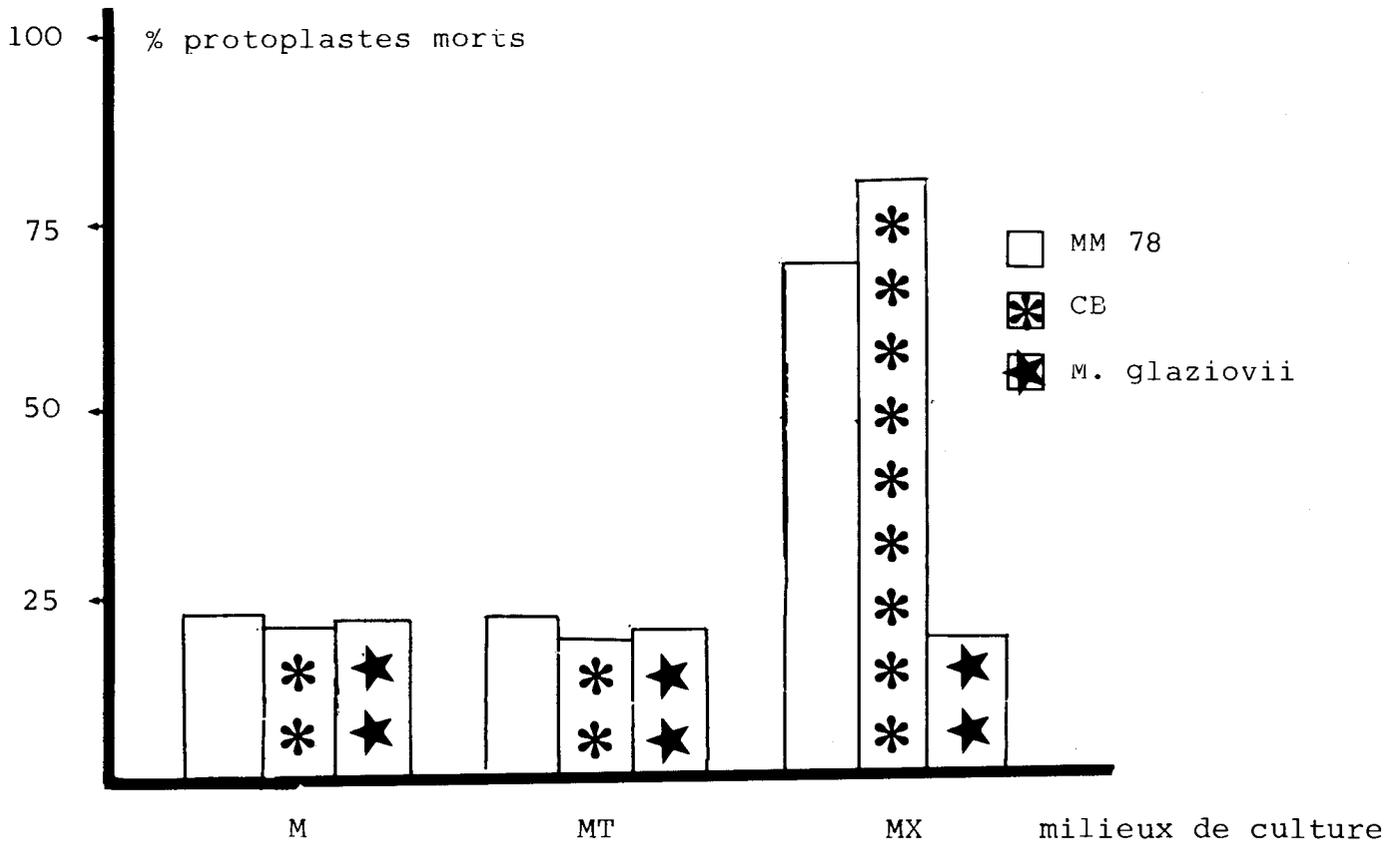
4 - 4.1.2.2. La mortalité dans le milieu à manihocine

Les histogrammes de la figure 64 nous indiquent les mortalités observées dans les différents milieux utilisés (milieu normal M, milieu témoin MT préparé avec le témoin substrat hydroxyéthyl-cellulose ayant subi le même procédé de purification que la manihocine, et le milieu à manihocine MX) après 2 jours de culture. Nous pouvons remarquer que dans les milieux M et MT, les mortalités sont presque inchangées au niveau des deux cultivars de l'espèce *Manihot esculenta* Crantz (MM 78 et CB) et au niveau de l'espèce *Manihot glaziovii* Muell. Les mortalités observées dans le milieu MX à la manihocine sont de l'ordre de 80 % pour le cultivar CB, 69 % pour le cultivar MM 78 et 19,24 % seulement pour l'espèce résistante *Manihot glaziovii* Muell.

Figure 64 : Mortalité observée dans les milieux M, MT et MX sur l'espèce *Manihot esculenta* Crantz (CV MM 78 et CB) sensible à la bactériose et sur *Manihot glaziovii* Muell, espèce résistante après 2 jours de culture

Dans la majorité de nos expériences, la mortalité dans le milieu MT a été très légèrement inférieure à celle observée dans le milieu ordinaire M. De même, la mortalité observée de l'espèce *Manihot glaziovii* Muell dans le milieu MX (renfermant la manihocine) a été légèrement inférieure par rapport à celle observée dans les 2 premiers milieux ; tandis que pour les cultivars MM 78 et CB, les mortalités

sont très fortes, 69 % pour le premier et 80 % pour le second, en présence de ce même milieu MX.



Les trois figures 62, 63 et 64 confirment que les protoplastes des cultivars de l'espèce *Manihot esculenta Crantz* sont sensibles aux effets de la manihocine, tandis que ceux de *Manihot glaziovii Muell* demeurent viables en totalité. Pour compléter ces résultats, nous avons mis au point une nouvelle série expérimentale conduite avec un dispositif blocs, de façon à réaliser une analyse de la variance. Dans cette expérience, nous avons choisi :

2 espèces : *Manihot esculenta Crantz* Cv CB
Manihot glaziovii Muell

2 traitements : MX₃
MX₄

avec trois répétitions.

MX₃ : milieu confectionné avec un extrait de manihocine isolé à partir de la souche X₂ en 1983. Cet extrait a été conservé à - 18°C pendant 6 mois.

MX₄ : milieu confectionné avec un extrait de manihocine, obtenu à partir d'une souche de *Xanthomonas manihotis* nouvellement isolée à partir des feuilles récoltées en mars 1983.

Les résultats obtenus sont consignés dans les tableaux VII et VIII.

Tableau VII : Pourcentages des protoplastes en survie en présence des deux traitements MX₃ et MX₄ appliqués aux 2 espèces *Manihot esculenta* Grantz Cv CB et *Manihot glaziovii* Muell. Les valeurs consignées sont des moyennes calculées sur 5 comptages par répétition.

Traitements Répétitions	CB MX ₃	CB MX ₄	Manihot glaziovii MX ₃	Manihot glaziovii MX ₄	Totaux
I	26,2	20	80,6	83,4	210,2
II	23,6	19,4	88	89,4	220,4
III	23,6	22	91	87,4	224
Totaux	73,4	61,4	259,6	260,2	654,6
Moyennes	24,4	20,4	86,5	86,7	$\bar{X}=54,55$

Tableau VIII : Tableau regroupant les pourcentages des protoplates en survie, en fonction des deux traitements et pour les deux espèces

	CB	Manihot glaziovii	Totaux
MX ₃	73,4	259,6	333
MX ₄	61,4	260,2	321,6
Totaux	134,8	519,8	654,6
Moyennes	22,46	86,63	

Le tableau IX nous donne les résultats obtenus au niveau de l'analyse de la variance pour les différents facteurs de variation étudiés (répétitions, manihocine, espèce et inter-action espèce x manihocine).

Tableau IX : Tableau d'analyse de la variance pour les principaux facteurs de variation

Origine de la variation	Somme des carrés des écarts	Degré de liberté	Variances	F	F 0,05	F 0,01
Totale	12460,33	11	-	-		
Répétitions	25,61	2	12,806	1,3	5,14	10,92
Manihocine	10,83	1	10,830	1,1	5,99	13,74
Espèce	12352,08	1	12352,08	1265,58	5,99	13,74
Espèce x manihocine	12,233	1	12,233	1,35	5,99	13,74
Résiduelle	58,57	6	9,76	-	-	-

Le coefficient de variation moyen $CVM = \frac{\sigma}{x} \times 100 =$
 $CVM = \frac{9,76}{54,55} \times 100 = 5,7 \%$ assez faible, nous permet d'avancer
les conclusions suivantes :

L'analyse de la variance indique une différence significative entre les 2 espèces aux seuils de 5 % et 1 %. La plus petite différence significative (PPDS) est au seuil de 5 % de :

$$t_{n-1} = 6 = 2,447 \sqrt{\frac{2 \times 9,76}{2 \times 3}} = 4,41$$

donc les différences observées entre les 2 espèces sont hautement significatives :

<i>Manihot glaziovii</i> Muell	86,63] H S
<i>Manihot esculenta</i> Grantz Cv CB	22,46	

Les protoplastes de *Manihot glaziovii* Muell sont résistants aux effets nocifs de la manihocine, contrairement à ceux du cultivar CB de *Manihot esculenta* Grantz qui manifestent une sensibilité marquée. Ce qui vient confirmer les résultats antérieurs.

Par contre, nous n'observons pas d'après ces résultats, de différence significative entre les deux extraits de manihocine, ni également au niveau de l'interaction espèce x manihocine. Ceci nous amène donc à considérer que la manihocine peut être extraite d'une souche bactérienne et conservée pendant 6 mois à - 18° C sans qu'elle perde ses propriétés toxiques.

Les expériences menées au cours des années 1982 1983 et 1984 concernant la survie des protoplastes dans un

milieu renfermant la manihocine, permettent de réunir les données recueillies dans le tableau X.

Tableau X : Résultats obtenus sur plusieurs expériences effectuées entre 1982 et 1984, concernant la survie des protoplastes de *Manihot esculenta* Crantz Cv CB et de *Manihot glaziovii* Muell dans le milieu sélectif à manihocine

Traitements Expériences ou répétitions	CB		Manihot glaziovii		Totaux
	MT	MX	MT	MX	
I (1982: MX2)	90,40	20,50	93,40	68,00	272,30
II (1983: MX3)	81,00	43,00	80,00	87,00	291,00
III (1984: MX3)	95,00	21,80	73,80	86,40	277,00
IV (1984: MX4)	92,80	24,60	74,00	86,74	278,14
V (1984: MX4)	86,20	26,00	81,00	83,60	276,80
VI (1984: MX3)	78,80	25,20	82,80	80,40	267,20
VII (1984: MX3)	80,00	26,80	79,00	73,20	259,00
Totaux	604,20	187,90	564,00	565,34	1921,44

La moyenne générale des expériences est de $\bar{X} = 78,6$.

MX = milieu de culture renfermant la manihocine à la dilution de 1/15.

MT = milieu témoin préparé avec le témoin substrat hydroxyéthyl-cellulose ayant subi le même procédé de purification que la manihocine utilisée.

En 1982, la souche de *Xanthomonas manihotis* X₂ est isolée d'un échantillon de feuilles récoltées en mars

1981 à ODZIBA sur le cultivar NGAMFOUO attaqué par la bactériose. Les expériences de survie des protoplastes sont réalisées dans le milieu de base de CABOCHE (1980).

En 1983, la souche X₃ est isolée à partir d'un nouvel échantillon récolté en mars 1983 dans la collection de manioc d'ODZIBA sur le cultivar NGAMFOUO. Les expériences de survie de protoplastes sont réalisées sur notre milieu M.

En 1984, MX₃ est l'extrait de manihocine isolé en 1983 et conservé à - 18° C. X₄ est la nouvelle souche de *Xanthomonas manihotis* récemment isolée à partir du même échantillon foliaire récolté en 1983. Toutes ces expériences sont réalisées avec notre milieu M.

Nous pouvons donc constater qu'indépendamment du milieu de culture et de la souche à partir de laquelle nous avons extrait la manihocine, nous avons répété nos expériences sur la manihocine 7 fois sur plusieurs années sur 2 espèces différentes. Nous pouvons par conséquent procéder à l'analyse de la variance de différents facteurs de variation qui dans notre cas sont :

Les deux espèces : *Manihot glaziovii* Muell
Manihot esculenta Crantz
CV CB

Les 2 traitements : Milieu témoin MT
Milieu à manihocine MX

avec 7 répétitions.

Le tableau XI regroupera les pourcentages de survie des protoplastes en fonction des espèces et traitements appliqués.

Tableau XI : Tableau regroupant les pourcentages de survie des protoplastes sur les milieux MT et MX au niveau des 2 espèces dans nos expériences réalisées de 1982 à 1984

Espèces Milieux de culture	Manihot esculenta	Manihot glaziovii	Totaux	Moyen- nes
MT	604,2	564	1168,2	83,44
MX	187,9	565,34	753,24	53,8
Totaux	792,1	1129,34	1921,44	
Moyennes	56,57	80,66		

A partir de ces données, nous pouvons alors dresser le tableau d'analyse de la variance de principaux facteurs de variation (répétitions, manihocine, espèces et interaction entre effets de la manihocine et les espèces).

Tableau XII : Tableau d'analyse de la variance des principaux facteurs de variation

Origine de la variation	Somme des carrés des écarts	Degré de liberté	Variance	F	F 0,05	F 0,01
Totale	17630,89	27	-	-		
Répétitions	148,85	6	24,8	0,42	2,66	4,01
Manihocine	6149,7	1	6149,7	106,32	4,41	8,28
Espèces	4061,81	1	4061,81	70,22	4,41	8,28
Manihocine x espèce	6229,4	1	6229,4	107,7	4,41	8,28
Résiduelle	1041,13	18	57,84	-	-	-

Le coefficient de variation moyen CVM = 11 % peu élevé, nous permet de tirer quelques conclusions sur ces expériences.

L'analyse de la variance montre qu'au seuil de 5 % aussi bien qu'au seuil de 1 %, on note une différence significative entre le milieu témoin MT et le milieu à manihocine MX. Ceci implique un effet néfaste de la manihocine décelable au niveau de la survie des protoplastes. La plus petite différence significative (PPDS) entre les traitements au seuil de 5 % est de :

$$2,101 \sqrt{\frac{2 \times 57,84}{7 \times 2}} = 6$$

soit une différence significative d'action des deux milieux

milieu témoin MT	83,44] S
milieu à manihocine MX	53,57	

Nous notons encore une différence significative de sensibilité entre les 2 espèces avec une PPDS égale à 6,

soit	<i>Manihot glaziovii</i> Muell	80,66] S
	<i>Manihot esculenta</i> Crantz	56,57	

Cette analyse confirme les observations précédentes : les protoplastes de *Manihot glaziovii* Muell sont plus résistants aux effets nocifs de la manihocine que les protoplastes de *Manihot esculenta* Crantz.

Nous noterons également une différence significative au niveau de l'interaction manihocine x espèces avec une PPDS égale à 8,5,

soit	<i>Manihot esculenta</i> Crantz x MT	86,3] N.S.] S
	<i>Manihot glaziovii</i> Muell x MT	80,57	
	<i>Manihot glaziovii</i> Muell x MX	80,76	
	<i>Manihot esculenta</i> Crantz x MX	26,84	

Ces résultats nous montrent qu'au niveau de l'espèce *Manihot glaziovii* Muell, il n'y a pas de différence significative entre le milieu MT et le milieu MX du fait de la résistance des protoplastes de *Manihot glaziovii* Muell aux effets nocifs de la manihocine. Tandis que nous observons une différence significative entre, d'une part les protoplastes de *Manihot esculenta* Crantz dans le milieu MT et le milieu à manihocine MX, et d'autre part entre les protoplastes des 2 espèces. Ceci indique que la mortalité observée sur les protoplastes de *Manihot esculenta* Crantz CV CB est bien induite par la manihocine extraite du filtrat de culture de *Xanthomonas manihotis*.

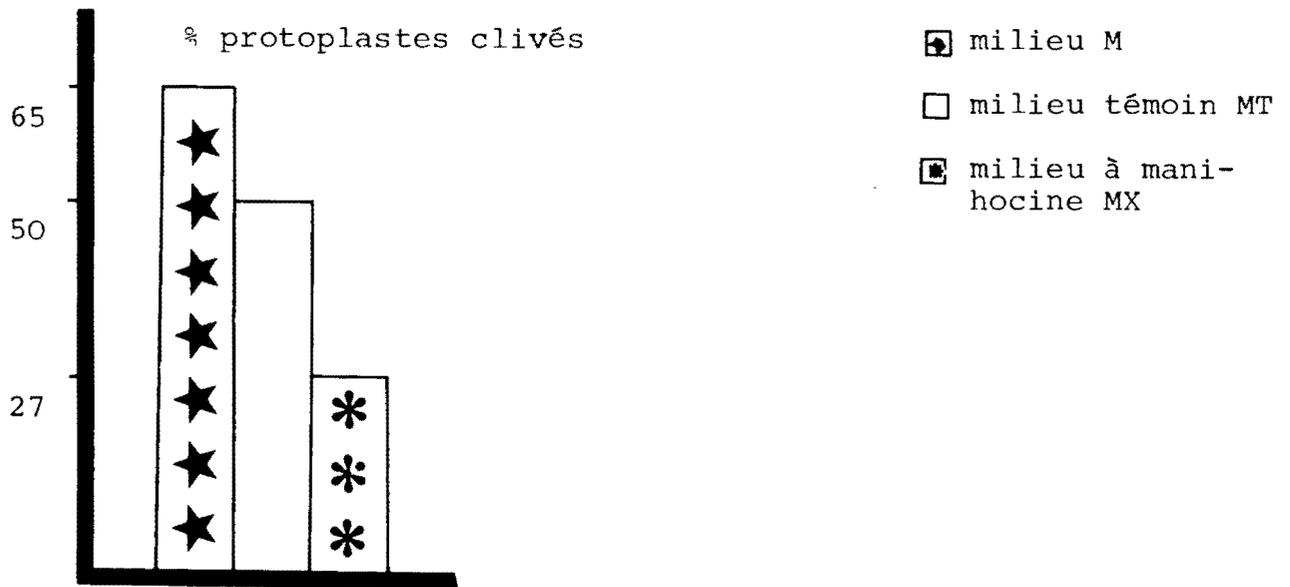
Par contre, l'analyse de la variance ne fait pas apparaître une différence significative entre les diverses expériences.

A la suite de ces nombreuses expérimentations répétitives, nous pouvons donc conclure que la manihocine a un effet détectable au niveau de la survie des protoplastes de *Manihot esculenta* Crantz et n'affecte pas la survie des protoplastes de *Manihot glaziovii* Muell, espèce résistante à la bactériose provoquée par *Xanthomonas campestris* pathovar *manihotis*. Ce caractère peut donc être utilisé dans les analyses de criblage des différents cultivars de manioc.

4 - 4.1.2.3. L'évolution des protoplastes de *Manihot esculenta* Crantz dans le milieu à manihocine

4 - 4.1.2.3.1. Divisions par clivage

Figure 65 : Pourcentages des protoplastes clivés dans les 3 milieux de culture M, MT et MX



Milieux de culture

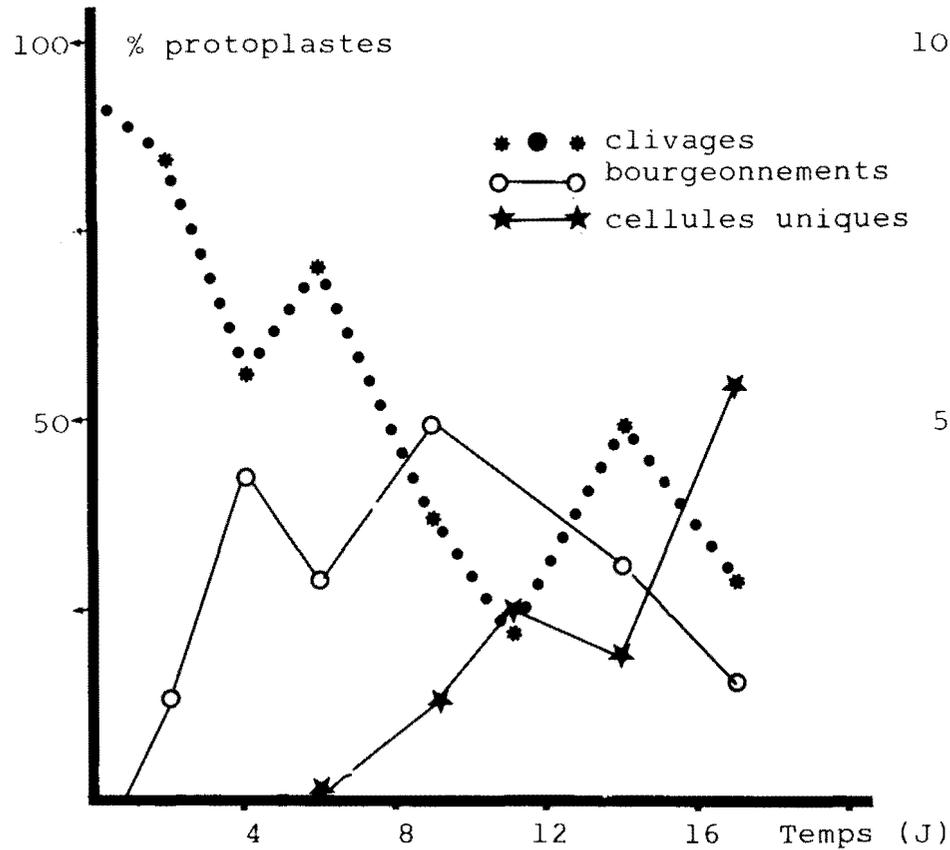
Tandis que le taux de division par clivage dans le milieu MX n'est que de 27 %, nous pouvons remarquer que le taux de division par clivage dans le milieu MT est plus bas que celui observé dans le milieu M.

Nous enregistrons cependant une différence marquée entre le milieu MX et le milieu MT.

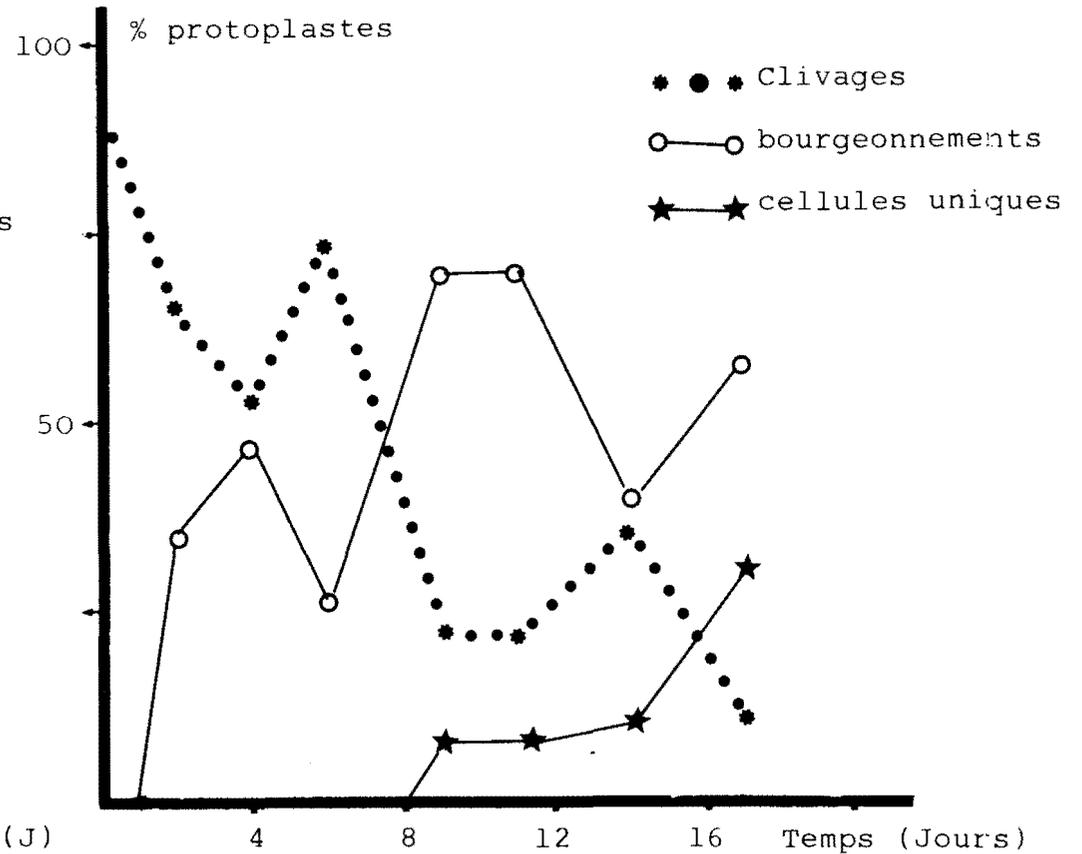
L'observation des figures 65 à 71 indique que nous obtenons des divisions par clivage dans le milieu à manihocine MX. Nous remarquerons également que le nombre de divisions par clivage par millilitre dans le milieu à manihocine MX (1040) est loin d'être négligeable.

Figure 66 : Evolution des protoplastes du cultivar CB dans le milieu témoin MT

Figure 67 : Evolution des protoplastes du cultivar CB dans le milieu renfermant la manihocine



Dans le milieu témoin MT, les protoplastes suivent la même évolution que dans le milieu ordinaire M. Nous observons une diminution des bourgeoisements et du taux des cellules uniques alors que le taux de clivages augmente.



Dans le milieu à manihocine, l'apparition des clivages est tardive. Nous notons un faible taux de cellules uniques et un taux de bourgeoisements très important (58 %) alors que le taux de clivages n'est que de 31 %.

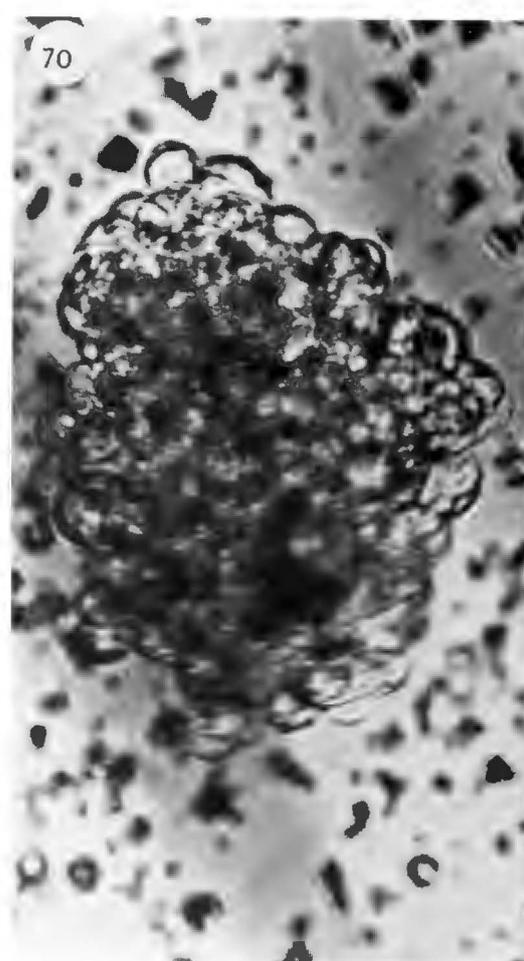
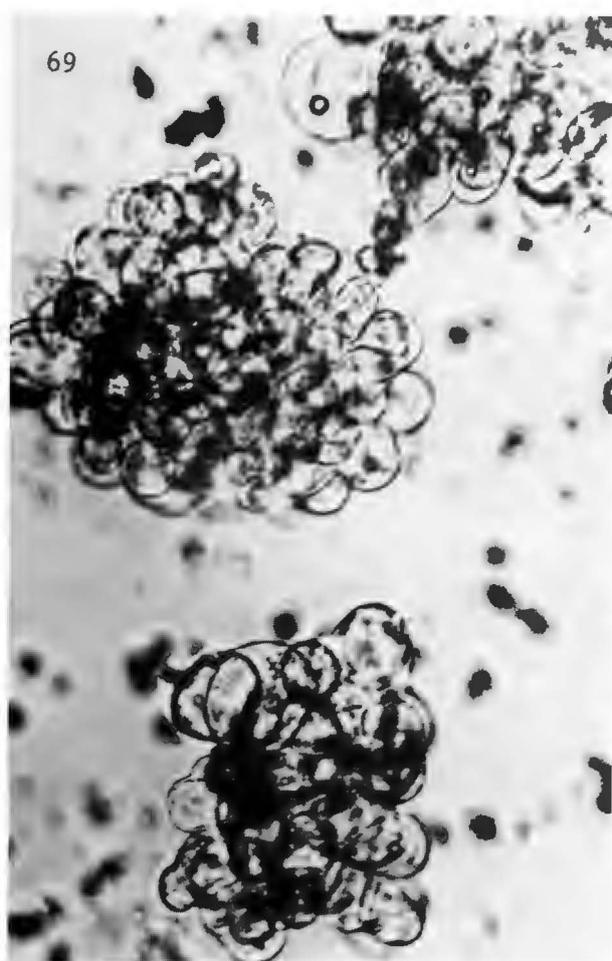
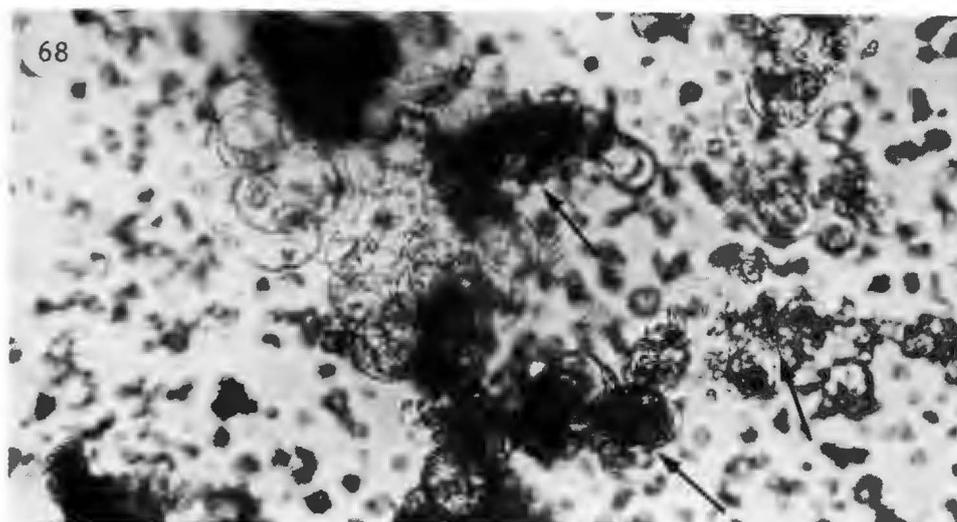
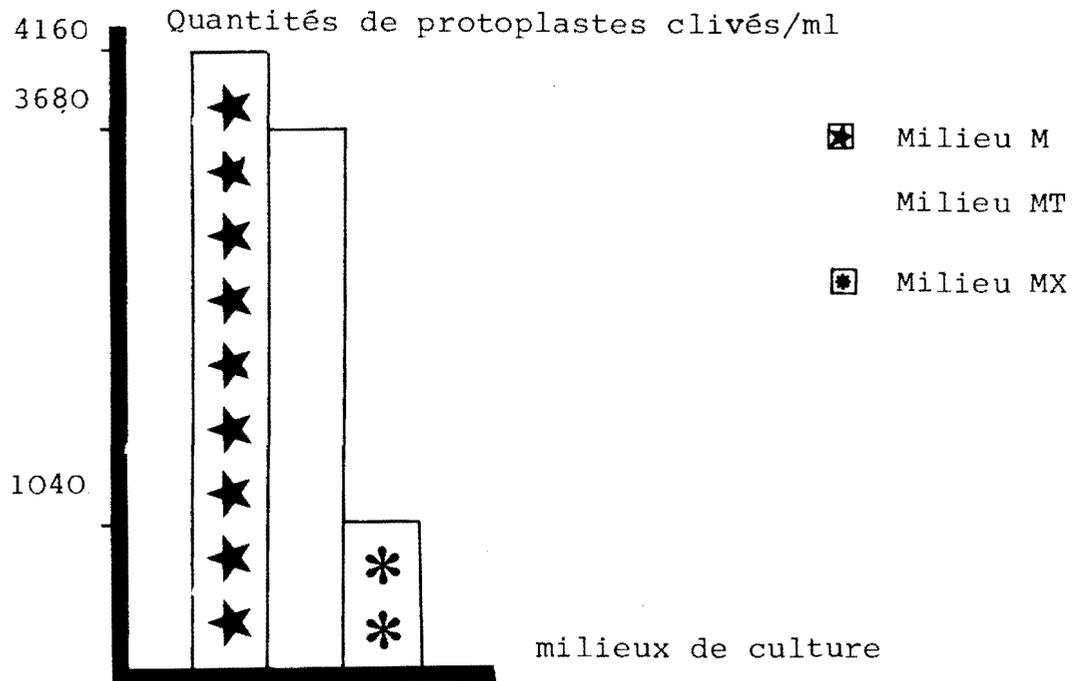


Fig. 68: Photographie montrant des cals dans le milieu MX. Les flèches montrent les restes des cellules tuées par la manihocine(cultivar CB)

Fig. 69: Formation de nombreux cals à croissance régulière dans le milieu MT (cultivar CB).

Fig. 70: Obtention de quelques cals viables dans le milieu à manihocine

Figure 71 : Quantités de protoplastes clivés par millilitre après 15 jours de culture dans les 3 milieux (M, MT et MX)



Bien que le taux de divisions par clivage soit élevé (27 %, fig. 60), la forte mortalité intervenue dans le milieu MX ne permet qu'un nombre faible de divisions par clivage. Nous observons une légère différence entre le milieu MT et le milieu M.

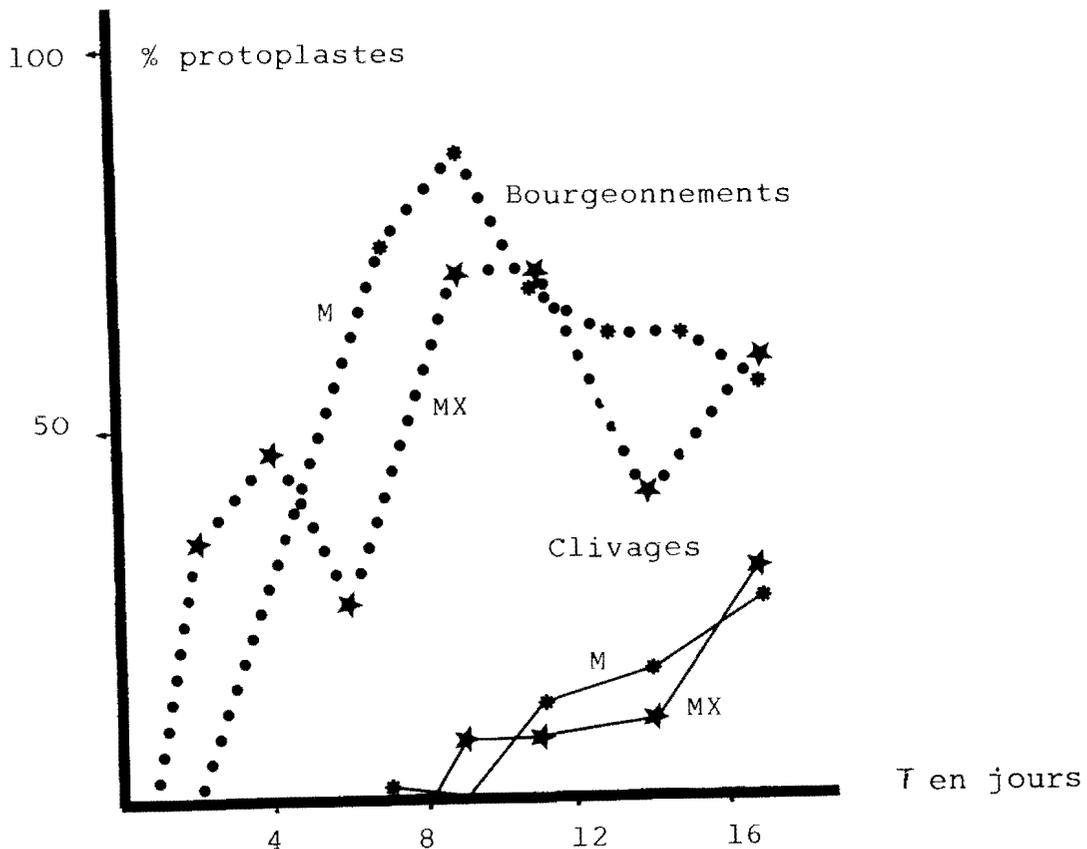
4 - 4.1.2.3.2. Le bourgeonnement dans le milieu à manihocine MX

Si la division par clivage est la plus intéressante, par son caractère de conservateur de toutes les caractéristiques de la cellule mère et par son aptitude à la formation des cals à croissance indéfinie, d'autres phénomènes y sont associés. Déjà signalés précédemment, ces phénomènes sont la présence des cellules non divisées et le bourgeonnement cellulaire. Si l'évolution des taux de cellules uniques est presque le même dans le milieu témoin

MT et le milieu MX (fig. 66 et 67), celle des taux de bourgeonnements n'est pas identique dans les 2 milieux. En effet, dans le milieu MT, le taux des bourgeonnements n'est que de 15 % au 17e jour de culture, celui observé dans le milieu MX reste toujours élevé au cours de la culture et dépasse 55 % au 17e jour.

Il nous est difficile de dire si le taux élevé des bourgeonnements, observé dans le milieu MX est dû à la présence de la manihocine. Si nous comparons le développement des protoplastes dans le milieu M ordinaire avec une faible densité de culture, nous obtenons des courbes d'évolution semblable (fig. 72).

Figure 72 : Evolution comparée des protoplastes dans le milieu M ($D = 0,5 \cdot 10^5$ p/ml) et le milieu MX ($D = 3 \cdot 10^5$ prot./ml)

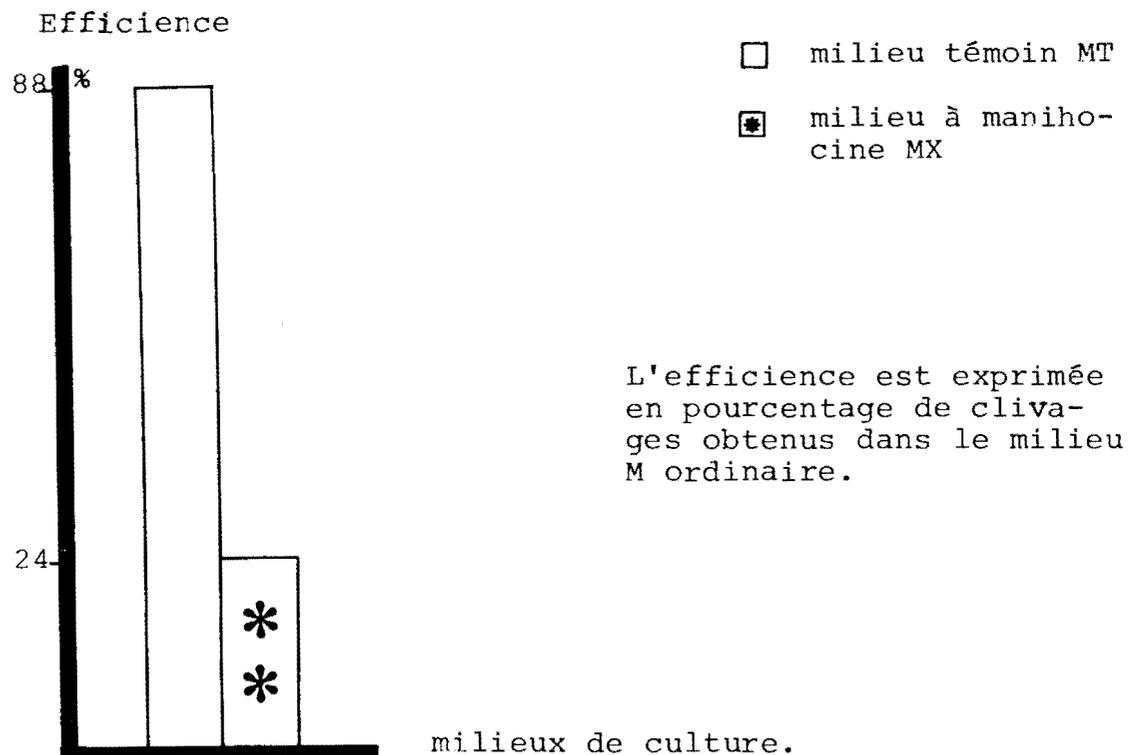


Nous remarquons une évolution identique dans les 2 milieux. L'effet de la manihocine fait donc correspondre l'évolution d'une culture ayant une densité primaire forte ($3 \cdot 10^5$ P/ml) à celle d'une culture à densité nouvelle faible, correspondante à $0,5 \cdot 10^5$ P/ml.

Nous pouvons donc considérer que les protoplastes en survie dans le milieu à manihocine sont des protoplastes viables ; leur évolution en cal, en fait, ne serait alors conditionnée que par la densité de culture qui reste faible à cause de la mortalité induite en présence de la manihocine. Il faut cependant noter que si dans le milieu M ordinaire, à faible densité de culture, les protoplastes restent viables, tout au long de la culture, dans le milieu MX à manihocine par contre, les nécroses apparaissent chez les cellules bourgeonnées et sans parois (fig. 68), qui dépérissent généralement après 2 semaines de culture.

4 - 4.1.2.3.3. Efficience de la culture dans le milieu MX

Figure 73 : Efficience de la culture dans le milieu MX à manihocine et dans le milieu témoin MT. La souche X₃ de manihocine a été utilisée (cultivar CB)



Nous avons défini l'efficience de la culture dans le milieu sélectif comme étant le rapport entre le nombre de clivages obtenus dans le milieu à manihocine et le nombre de clivages observés à la même période dans le milieu M. Nous pouvons exprimer ce rapport en pourcentage de divisions observées dans le milieu M. Cette efficience nous permettra de définir la concentration en manihocine à utiliser suivant la toxicité de l'extrait isolé.

La figure 73 montre que pour l'extrait de manihocine de la souche X₃, nous avons obtenu une efficience de 25 % pour la dilution 1/15. Nous pouvons constater que l'efficience de la culture dans le milieu témoin MT est de 88 % soit seulement 12 points de différence avec le milieu normal M.

L'efficience 25 % observée dans le milieu à manihocine est importante car elle permet d'obtenir de nombreux cals dans un milieu sélectif.

4 - 4.1.2.3.4. Discussion et conclusion sur la culture des protoplastes dans milieu sélectif à manihocine

Comme nous l'avons déjà signalé au cours des travaux antérieurs (MABANZA 1982), la manihocine manifeste une action nocive certaine sur les protoplastes isolés des cultivars sensibles à la bactériose. La mortalité observée dans une culture de protoplastes après 2 jours est très importante pour le cultivar CB (80 %), appartenant à l'espèce *Manihot esculenta* Crantz sensible à la bactériose due au *Xanthomonas campestris* pathovar *manihotis*.

Par contre, cette mortalité est faible (15 %) et se confond avec la mortalité ordinaire rencontrée

dans le milieu de base M, pour l'espèce *Manihot glaziovii* Muell, lorsque nous employons les dilutions 1/15 (V/V) de manihocine dans le milieu M. Les travaux réalisés pendant 3 années avec 3 souches différentes de *Xanthomonas manihotis* indiquent une différence significative entre l'espèce *Manihot glaziovii* Muell et l'espèce *Manihot esculenta* Crantz CV CB. La manihocine peut donc servir d'agent de criblage des cultivars de manioc pour leur sensibilité à la bactériose.

La manihocine peut être isolée, conservée à - 18° C et utilisée après 6 mois sans que soit altéré l'effet toxique.

Les cellules du cultivar CB en survie (16 % après 4 jours) dans le milieu à manihocine restent viables. Le bourgeonnement intensif qui intervient dans ce milieu, en augmentant le nombre de cellules, conduit à la formation d'un nombre appréciable de cals viables. Ceci montre qu'une situation transmissible intervenue au sein d'une cellule viable, peut dans le milieu à manihocine, être conservée et entretenue sur milieu gélosé. L'efficacité élevée obtenue dans le milieu à manihocine rend le système culture de protoplastes de manioc en milieu sélectif, applicable à notre dispositif expérimental.

4 - 4.2. Les hybridations somatiques

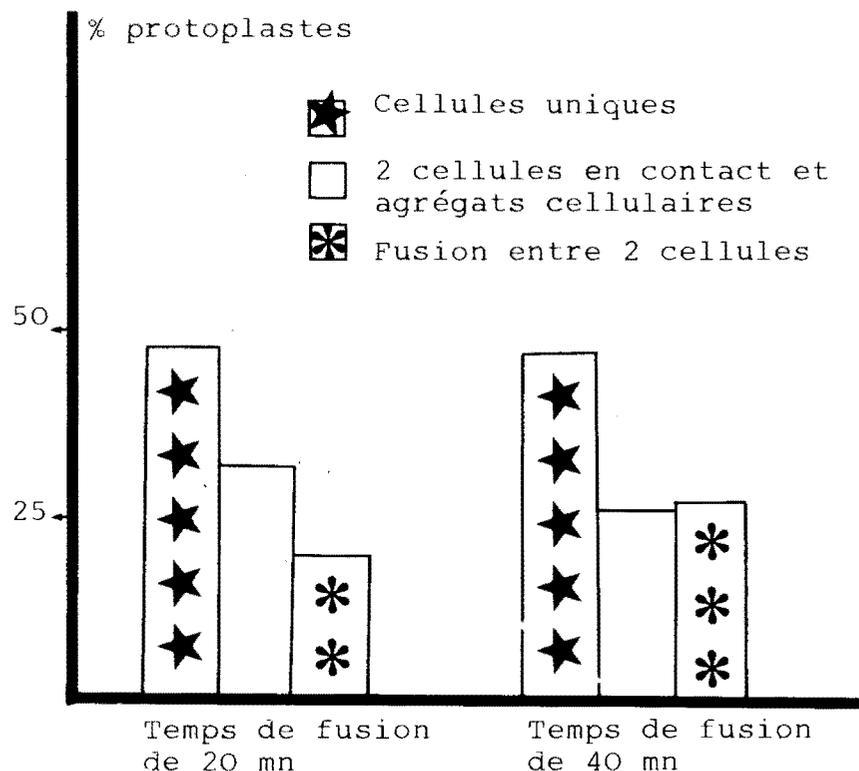
4 - 4.2.1. Obtention de fusion de protoplastes chez le manioc

Les figures 74, 75, 76 et 77 montrent que la fusion entre protoplastes de manioc est aisément réalisable. Les comptages effectués après nos expériences de fusion sont rassemblés dans les histogrammes de la figure 74. On peut

constater que pour un temps de fusion de 20 mn, nous obtenons 20 % de fusions véritables par rapport aux cellules uniques et aux agglutinations cellulaires (fusions en amas de plusieurs cellules ou simplement contact superficiel entre 2 cellules).

Un temps de fusion prolongé de 40 mn améliore encore ces résultats ; nous observons moins d'agglutinations cellulaires et alors le pourcentage de fusions véritables entre 2 cellules sera d'environ 27 %. Notre solution M qui sert de solution de rinçage permet une meilleure fusion de protoplastes que la solution de CABOCHE (1980) avec laquelle nous n'obtenions que 10 % de fusion (MABANZA 1982). Un temps de fusion de 60 mn ne provoque pas d'augmentation sensible de la fusion.

Figure 74 : Essai de fusion entre les protoplastes de Malela 1 et les protoplastes de *Manihot glaziovii* Muell.



Nous remarquons que quel que soit le temps de fusion, le taux de cellules uniques reste le même, seules les catégories de cellules agglutinées et fusions véritables sont modifiées.

Ce taux est inférieur à 50 %. Avec un temps de fusion de 40 mn, le taux de fusion véritable entre 2 cellules est de 27 % environ et celui des agglutinations de 26 %.

Quel que soit le temps de fusion, le taux de cellules uniques est toujours identique, légèrement inférieur à 50 %. La diminution du taux de cellules agglutinées indique que les cellules en contact simple ont fusionné au dernier moment, augmentant le taux de fusions véritables. Une certaine catégorie de cellules ne serait pas capable de fusionner. Cette catégorie constituerait donc moins de 30 % du nombre total des cellules de notre culture. Si le taux de 27 % de fusions véritables obtenu est appréciable, il reste à connaître la nature de la fusion obtenue.

4 - 4.2.2. Vérification de l'allofusion

Nous avons remarqué précédemment qu'il n'existait pas de différence d'apparence entre les protoplastes des 2 espèces. Il nous est par conséquent difficile de détecter l'allofusion (la fusion véritable entre un protoplaste de *Manihot esculenta* Crantz et un protoplaste de *Manihot glaziovii* Muell).

Afin de déceler les possibilités d'allofusion dans nos expériences, nous avons utilisé des colorants vitaux différents pour les 2 espèces (rouge neutre et bleu de méthylène).

Ces colorants sont des colorants du vacuome et beaucoup de cellules non vacuolisées ne sont pas colorées chez les 2 espèces. Très peu de cellules vacuolisées sont

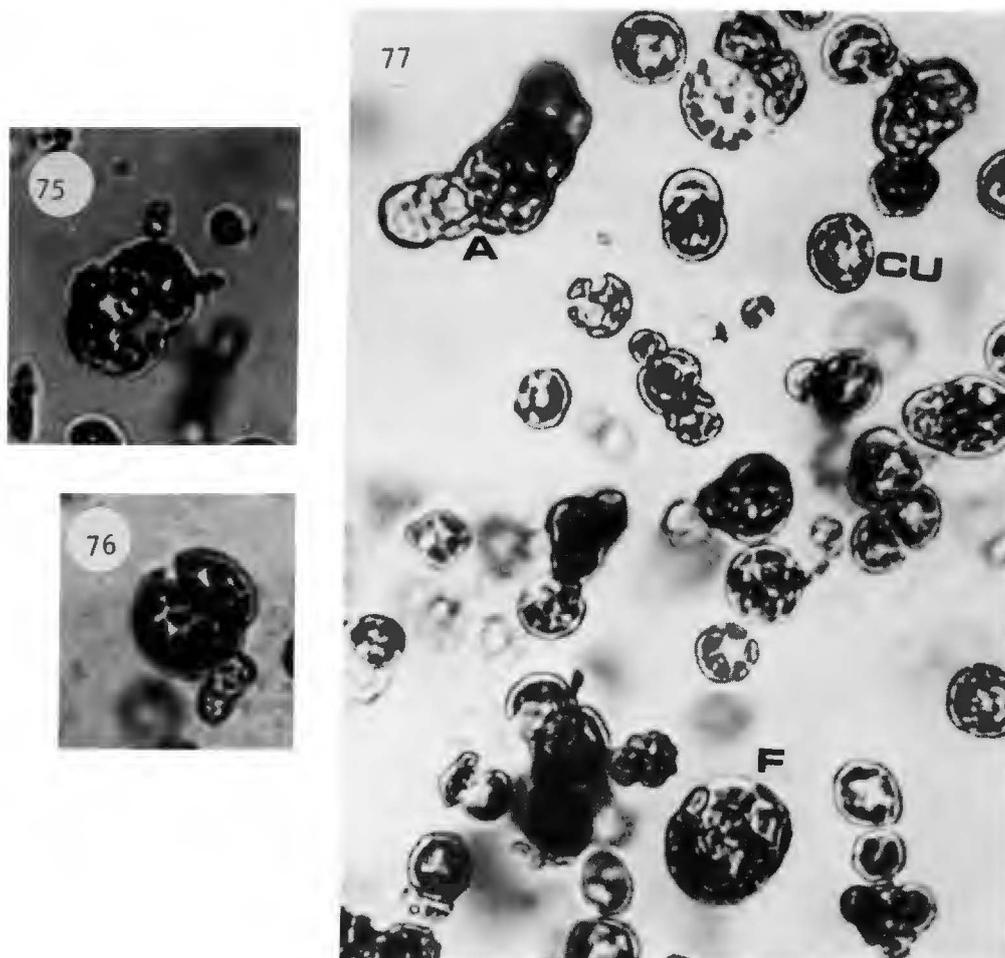


Fig. 75: Cellules en pleine fusion.

Fig. 76: cellules fusionnées.

Fig. 77: Expérience de fusion entre *M. esculenta* Crantz cv CB et *M. glaziovii* Muell. Dans cette expérience, nous avons compté environ 36% de cellules uniques (CU), 23% de fusions véritables (F) et 41% d'amas de cellules agrégées (A) dont 62,5% constitués de groupes de 4 à 5 cellules et le reste de groupes de 3 cellules. Nous avons donc pour l'ensemble de notre expérience seulement près de 14% de l'ensemble de la population cellulaire constitués de cellules uniques, ce qui est relativement faible et montre que les chances d'allofusion sont grandes.

colorées en rouge chez le cultivar Malela 1 et en bleu chez le *Manihot glaziovii* Muell. Nous avons cependant pu observer des fusions entre les 2 espèces comme le montre la figure 80. Ce type d'expérience ne nous a servi que dans la mesure où nous voulions nous rendre compte des possibilités d'allofusion entre les 2 espèces. En effet, comme nous venons de le voir, d'une part une catégorie de cellules n'est pas apte à fusionner, d'autre part beaucoup de cellules des 2 espèces ne sont pas colorables.

Après ces essais de repérage des allofusions par les colorations vitales, nous avons cherché à observer les aptitudes d'allofusion entre les protoplastes de manioc et ceux d'autres espèces plus éloignées comme l'igname (*Dioscorea alata*). Ces derniers, isolés par les mêmes techniques utilisées pour le manioc sont généralement plus grands (30 à 40 μm de diamètre au lieu de 10 à 20 μm pour le manioc), avec des chloroplastes d'un vert sombre (fig. 78, 79). De nombreuses cellules renferment par ailleurs des pigments anthocyaniques.

Comme le montre la figure 81, l'allofusion entre les protoplastes de manioc et ceux d'igname peut se réaliser dans le milieu M.

Ces deux types d'expériences montrent que les protoplastes de manioc possèdent une grande capacité d'allofusion. Cependant, la fusion pour des cellules aptes est un phénomène qui semble se dérouler au hasard, il est donc probable que la quantité d'autofusions ou d'allofusions sera déterminée au hasard au cours des expériences. Pour obtenir un pourcentage élevé d'allofusion, il est donc nécessaire de bien mélanger les protoplastes des 2 espèces au moment de l'expérience de fusion.

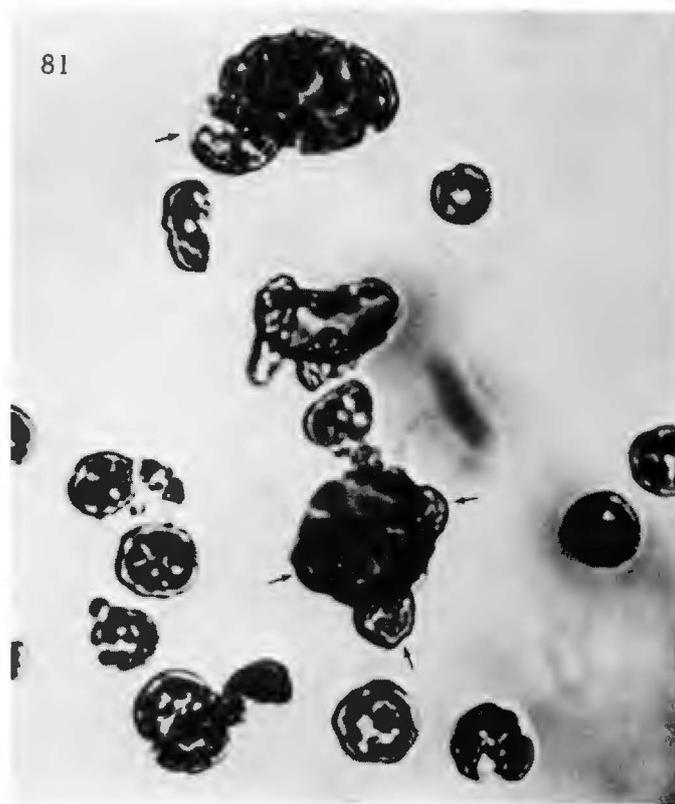
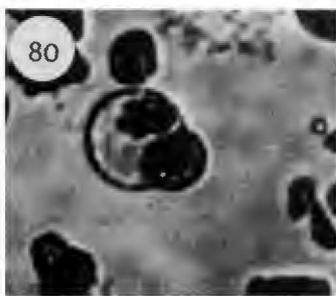
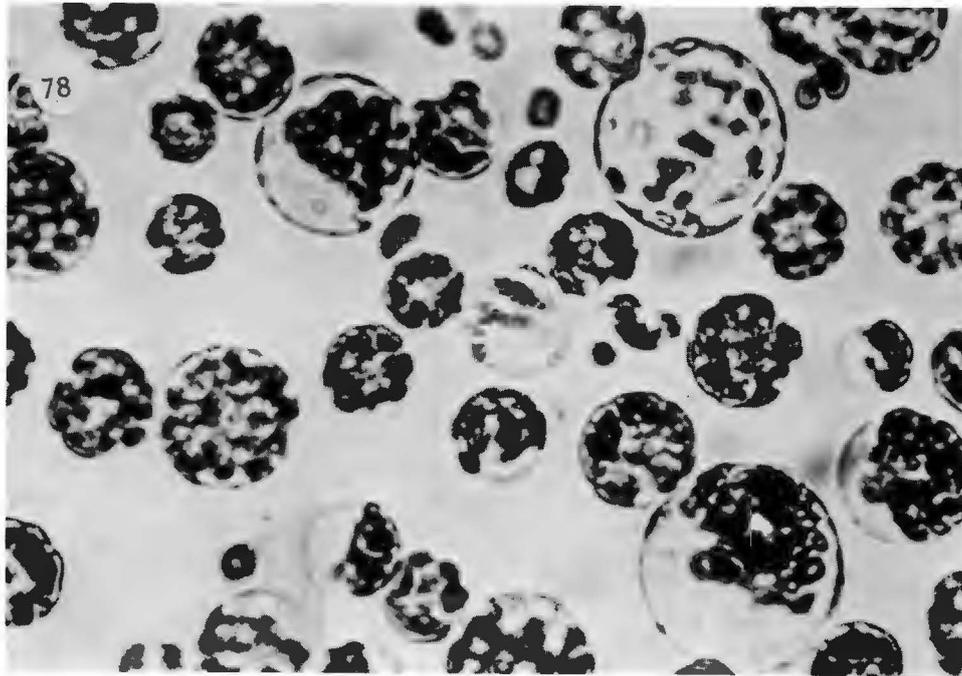


Fig. 78: Les protoplastes de Dioscoréa alata peuvent être isolés dans de bonnes conditions jusqu'à plus de 3.10^6 de protoplastes/gr de limbe.

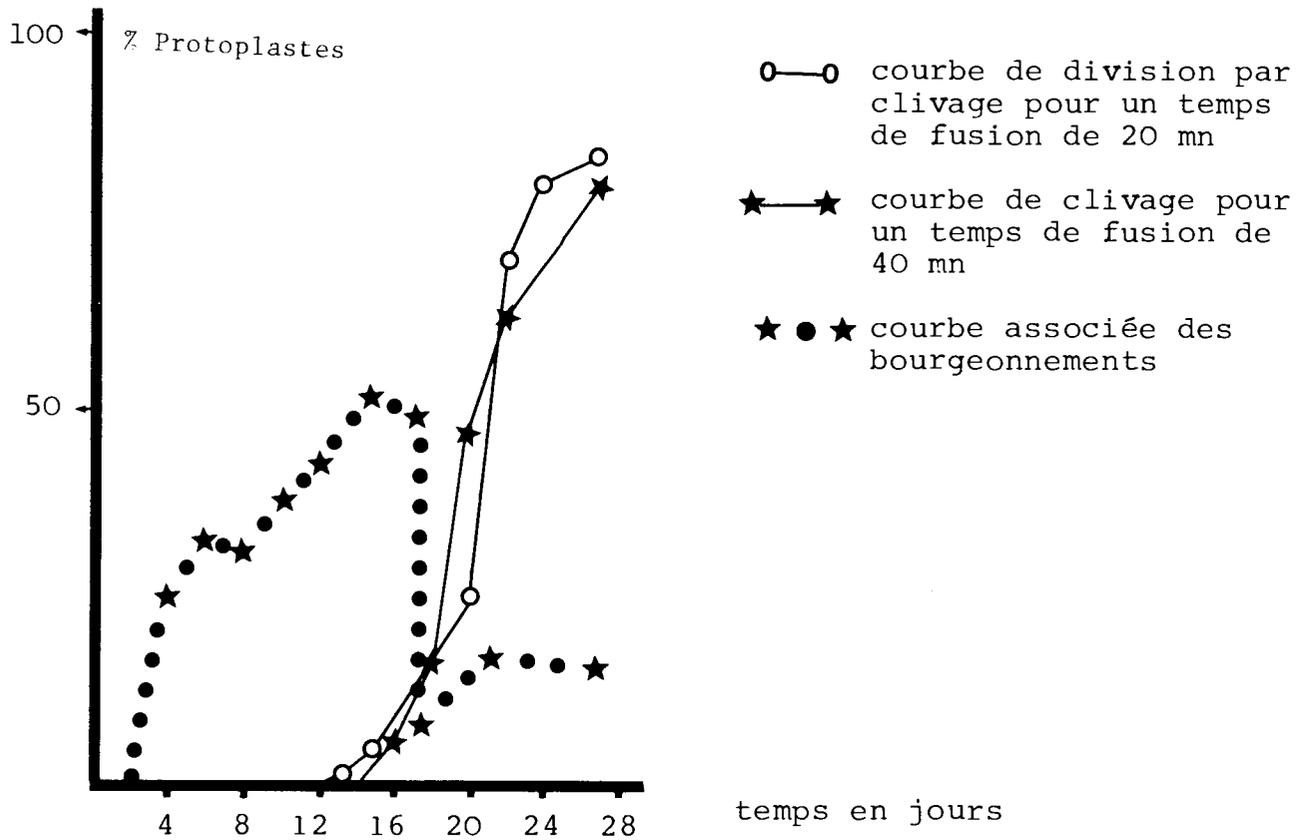
Fig. 79: Les protoplastes de D. alata restent viables. Ils bourgeonnent dans le milieu M.

Fig. 80: Vérification de l'allofusion entre M. glaziovii en bleu(clair) et M. esculenta cv Maléla 1 en rouge (sombre).

Fig. 81: Vérification des possibilités d'allofusion: D. alata (grande taille) et M. esculenta cv Maléla 1 (petite taille) (flèches).

4 - 4.2.3. Evolution des cultures après les expériences
de fusion

Figure 82 : Evolution des cellules après une expérience
de fusion



On pourra observer des bourgeonnements dès le 2e jour de culture. Comme pour la culture dans le milieu M ordinaire, les clivages commencent au moment de l'arrêt des bourgeonnements. Les premières divisions apparaissent très tard vers le 14e jour pour atteindre près de 80 % après 4 semaines.

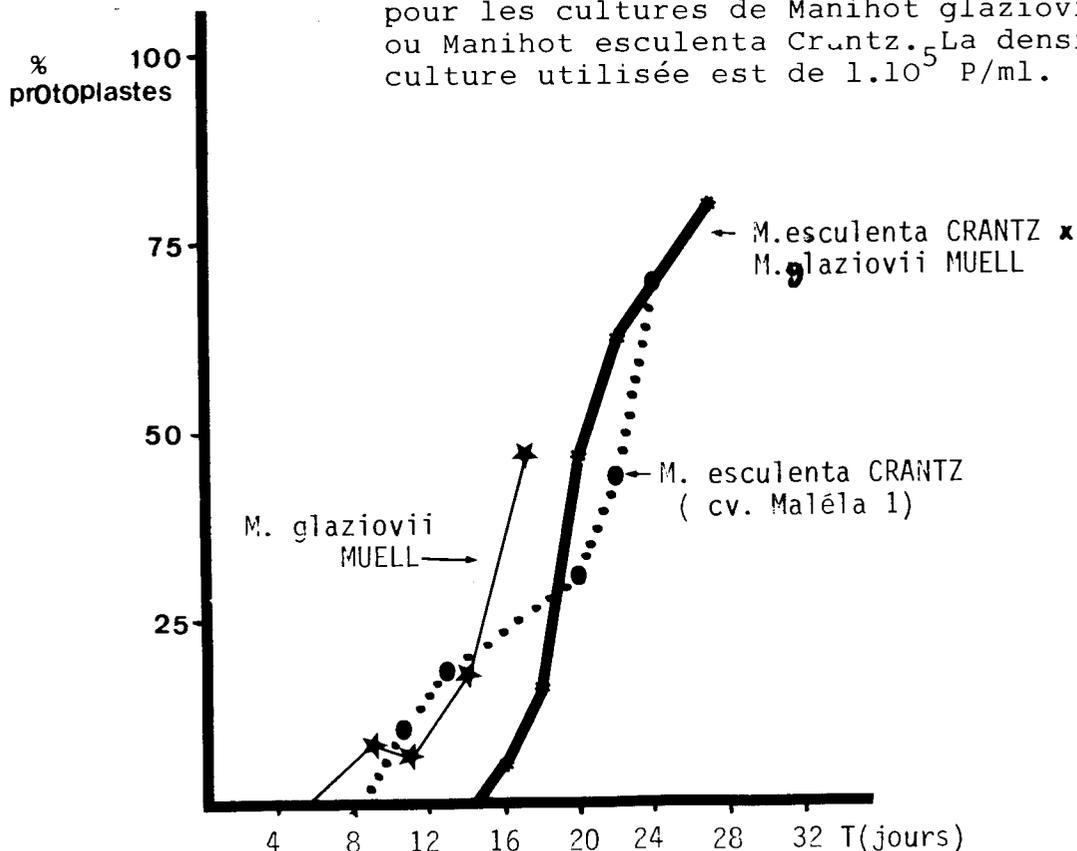
La figure 82 montre que les deux mécanismes d'évolution des protoplastes dans le milieu M se réalisent également après les expériences de fusion. Dans ces expé-

riences, le bourgeonnement ne se manifeste que sur environ 50 % des cellules. Les divisions par clivage qui commencent tardivement vers le 14^e jour atteignent près de 80 % au 27^e jour.

Ces résultats également signalent qu'après une expérience de fusion, la culture suit une évolution semblable à celle observée pour les cultures ordinaires des protoplastes de manioc dans le milieu M. Le taux de clivages obtenu dans ces expériences nous permet de travailler dans des conditions satisfaisantes si nous les comparons à ceux observés dans nos travaux antérieurs, effectués avec le milieu de CABOCHE (1980), qui n'étaient que de 20 %.

Avec notre technique, nous utilisons au moment de l'expérience de fusion, une densité de culture de 1.10^5 P/ml. La figure 83 compare l'évolution des divisions dans le milieu après une expérience de fusion avec l'évolution des divisions, observée pour les cultures ordinaires de *Manihot glaziovii* Muell ou de *Manihot esculenta* Crantz à la densité de 1.10^5 P/ml.

Figure 83 : Comparaison de l'évolution des clivages dans l'expérience de fusion et de celles observées pour les cultures de *Manihot glaziovii* Muell ou *Manihot esculenta* Crantz. La densité de culture utilisée est de 1.10^5 P/ml.

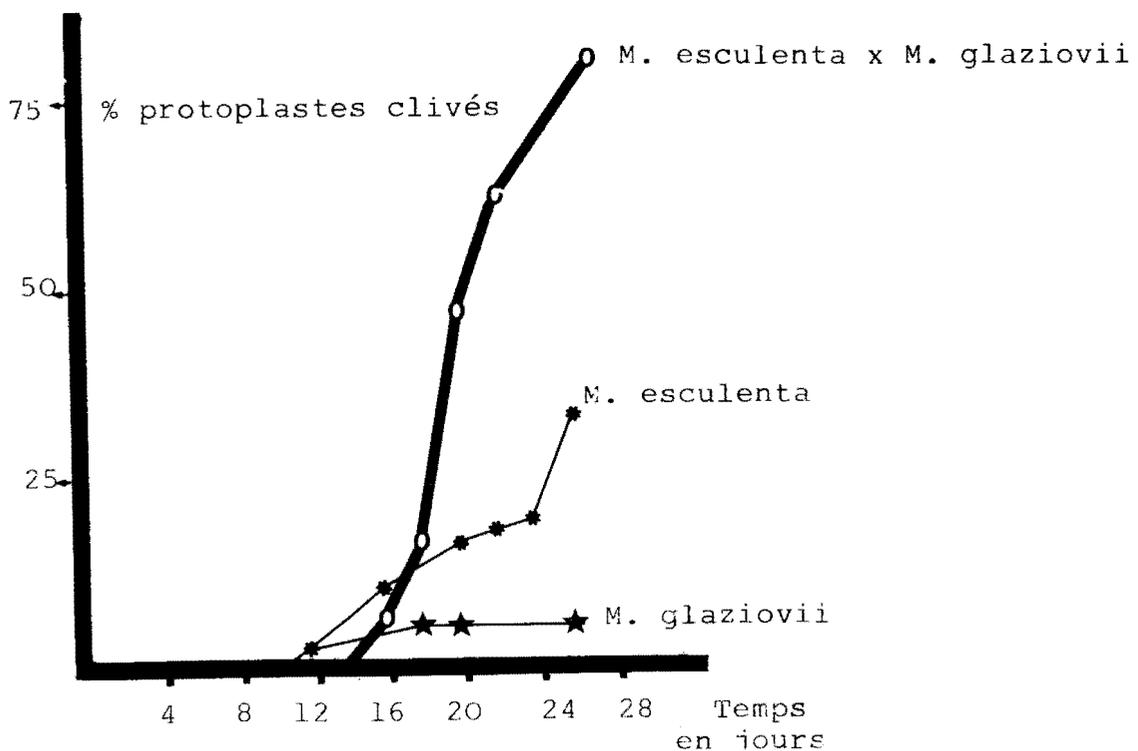


Le pourcentage de clivages maximum atteint est de 47 % pour *Manihot glaziovii*, 70 % pour *Manihot esculenta* et 80 % dans l'expérience de fusion entre les 2 espèces.

Or, notre technique de fusion favorise la formation de beaucoup d'agglutinations cellulaire (fig. 74 et 77). Ces agglutinations cellulaires n'évoluent pas et éclatent dans le milieu de culture. Les cellules agglutinées intéressent plus de 44 % de la population cellulaire totale de l'expérience (fig. 74 et 77). Compte-tenu de la présence des cellules fusionnées et des cellules n'ayant pas fusionné, nos cultures présentent une densité nouvelle de culture inférieure à $0,4 \cdot 10^5$ P/ml.

La figure 84 compare l'évolution des clivages, observée dans le milieu après l'expérience de fusion avec l'évolution des clivages dans les cultures ordinaires des protoplastes de *Manihot glaziovii* Muell ou de *Manihot esculenta* Crantz avec la densité de culture de $0,5 \cdot 10^5$ P/ml.

Figure 84 : Comparaison de l'évolution des clivages dans l'expérience de fusion et de celle observée pour les cultures de *Manihot glaziovii* Muell ou *Manihot esculenta* Crantz. La densité de culture est de $0,5 \cdot 10^5$ P/ml.



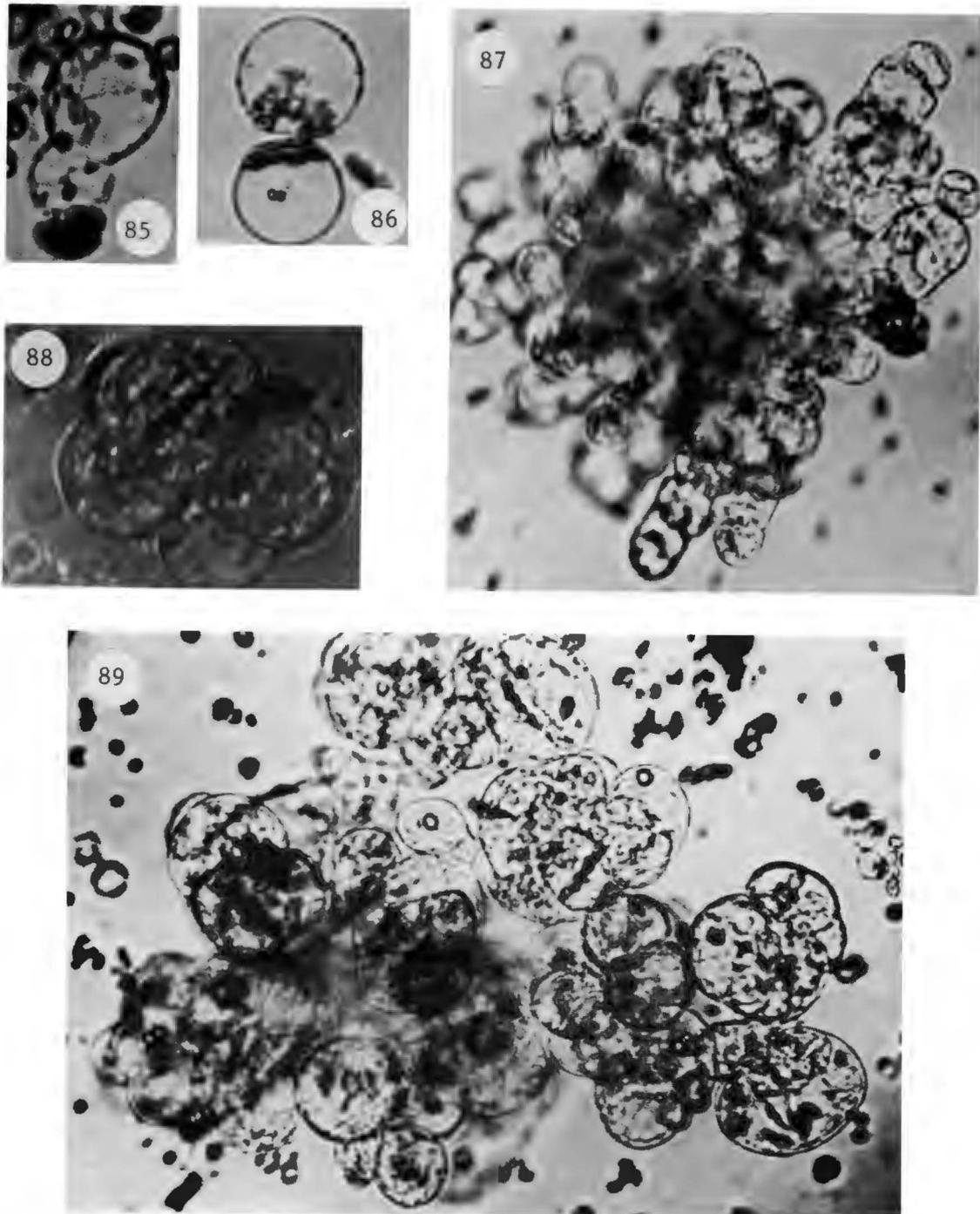
Le pourcentage de clivages maximum atteint est de 8 % pour *Manihot glaziovii*, 31 % pour *Manihot esculenta* et 80 % dans l'expérience de fusion entre les deux espèces.

La densité de $0,5 \cdot 10^5$ P/ml, faible, ne permet pas une culture favorable des protoplastes de *Manihot esculenta* Crantz (fig. 46) ou *Manihot glaziovii* Muell (tableau VI).

La bonne évolution des cellules, observée dans le cas des expériences de fusion (fig. 82) semble donc signaler la présence d'un nouveau type de cellules qui présenteraient un développement optimal avec des densités de culture faibles.

4 - 4.2.4. Observation de différents types de cals en milieu liquide

20 jours après une expérience de fusion, nous sommes en mesure d'observer au microscope inversé de nombreux cals d'environ 0,1 mm de diamètre. Comme nous le montrent les figures 87, 88 et 89, les cals observés après une expérience de fusion peuvent être classés en 3 catégories. Une première catégorie de cals très compacts est composée de cellules mesurant en moyenne 20 μ m de diamètre. Ce type de cals nous rappelle les cals observés sur *Manihot esculenta* Crantz (fig. 87). La 2ème catégorie comporte des cals renfermant des cellules volumineuses d'environ 30 μ m de diamètre à contours réguliers, cals que nous avons rencontrés dans les cultures de protoplastes de *Manihot glaziovii* Muell (fig. 88). La 3e catégorie de cals nous montre des cellules plus volumineuses, le plus souvent à des contours irréguliers (fig. 89). Ils ne sont pas compacts comme ceux des 2 premières catégories. Ils n'avaient jamais été observés précédemment au cours de nos multiples cultures antérieures pour chacune des 2 espèces isolées séparément.



- Fig. 85: Bourgeoisement observé après une expérience de fusion.
 Fig. 86: Séparation des cellules bourgeonnées.
 Fig. 87: Cal compact issu de l'évolution du protoplaste de M. esculenta cv CB dans le milieu de fusion.
 Fig. 88: Cellule en 2^e clivage de M. glaziovii. Les contours sont réguliers
 Fig. 89: Cals obtenus après fusion des cellules. Remarquer les contours très irréguliers des cellules.

Ils seraient donc initiés à partir de cellules fusionnées. Il nous a été cependant difficile d'opérer des comptages sur ces 3 catégories de cals ; au fur et à mesure qu'ils grossissaient, les irrégularités observées dès les premiers moments de divisions devenaient en effet difficiles à distinguer à cause de l'opacité des cals plus développés.

4 - 4.2.5. Evolution des 3 catégories de cals en milieu
.....
liquide
.....

Ces trois catégories distinctes de cals ne manifestent pas la même évolution. Les cals de *Manihot esculenta* Crantz, issus des cultivars CB ou Malela 1 deviennent rapidement compacts et commencent à se nécroser. Les cals de *Manihot glaziovii* sont après un mois de culture, visibles à l'oeil nu ; ils sont jaunâtres ; la moitié des cellules meurt après 45 jours. Les cals blanchâtres de la 3e catégorie pourront par contre séjourner dans le milieu de culture jusqu'à plus de 60 jours. Et, à ce moment existent encore, dans le milieu de culture, des cals brunâtres, viables, issus du développement des protoplastes de *Manihot glaziovii* Muell. La figure 90 montre qu'après 2 mois en milieu liquide, tous les cals issus des protoplastes de *Manihot esculenta* Crantz vont dépérir. Finalement, l'ensemble des cals présents dans le milieu de culture est composé de 11 % de cals bruns de *Manihot glaziovii* Muell et de 89 % de cals blanchâtres hybrides. La présence de nombreux cals hybrides dans nos cultures nous permet de constater que l'allofusion entre les deux espèces, déjà observée pendant les expériences de fusion (fig. 80), s'opère de manière satisfaisante. L'élimination de cal d'un des parents dans le milieu de culture, la faible quantité des cals de l'autre parent permettent un contrôle facile du développement des cals hybrides.

4 - 4.2.6. Le développement des cals hybrides sur milieu
gélifié

Tous les cals formés dans le milieu liquide peuvent être repris à l'aide d'une pipette stérile et transférés sur milieu gélifié où ils vont proliférer activement. Dans toutes nos cultures, les cals formés à partir de protoplastes de *Manihot glaziovii* Muell sont très peu chlorophylliens, si on les compare aux cals obtenus avec le *Manihot esculenta* Crantz, Cv Malela 1 ou CB. Les milieux riches en cytokinines (2 mg/l de BAP) accentuent encore cette différence de coloration. Dans ces derniers milieux, les cals de *Manihot glaziovii* Muell sont bruns et croissent très lentement, atteignant seulement 5 mm de diamètre au bout d'un mois, alors que ceux de *Manihot esculenta* Crantz mesurent au même moment 10 à 15 mm de diamètre et sont intensément verts.

50 jours après leur transfert sur un milieu gélifié, riche en cytokinine, les cals issus d'une expérience de fusion ne présentent jamais de coloration vert intense. Ce qui indique que les cals de *Manihot esculenta* Crantz ont dépéri après un long séjour (2 mois) en milieu liquide. La présence de cals bruns au développement très ralenti signale l'existence de quelques cals de *Manihot glaziovii* Muell. Ces cals visiblement différents des autres à cause de leur couleur brune et de leur faible développement sont faciles à dénombrer. Mais une autre catégorie de cals demeure importante dans la culture. Cette catégorie très hétérogène est composée de cals développés (10 mm de diamètre), ou au contraire de faible diamètre (2 à 3 mm), légèrement verts ou blanchâtres. Ce type de cals qui ne se forment pas lors des cultures séparées des protoplastes des 2 espèces, seraient donc issus du développement des cellules fusionnées. La figure 90 montre que ces cals sont

nombreux : ils constituent environ 94 % des cals viables développés sur le milieu gélosé, 6 % seulement étant composés de cals bruns de *Manihot glaziovii* Muell.

La plupart de ces cals issus de la fusion de protoplastes sont viables et présentent une prolifération rapide, comparée à celle des cals bruns de *Manihot glaziovii* Muell. Conservés sur ces milieux riches en cytokinines, ils deviendront rapidement chlorophylliens, mais leur coloration verte reste discrète, intermédiaire entre celle des cals bruns de *Manihot glaziovii* Muell et celle des cals d'un vert intense du *Manihot esculenta* Crantz. Lorsque nous les transférons dans un milieu pauvre en phytohormones (0,05 mg/l d'ANA), les cals issus des protoplastes fusionnés initient des racines, comme le montre la figure 94.

Si après une culture classique des protoplastes de *Manihot esculenta* Crantz ou de *Manihot glaziovii* Muell, les cals transférés sur milieu gélosé sont parfaitement homogènes, les cals issus des protoplastes fusionnés constituent par contre une population non homogène : certains sont bien développés, d'autres fort peu développés ; ils sont tous les deux peu colorés au cours du premier mois de leur développement sur milieu gélosé, riche en cytokinines.

L'analyse des échantillons de cals âgés de 2 mois effectuée au laboratoire de Madame le Professeur PARIS-PYREIRE, laboratoire de la Physiologie de la Nutrition Minérale des Végétaux (U.S.T.L.) montre des chloroplastes déjà fonctionnels pour les cals de *Manihot esculenta* Crantz, uniquement des proplastés chez le *Manihot glaziovii* Muell et des proplastés en phase d'organisation en chloroplastes pour les cals hybrides.

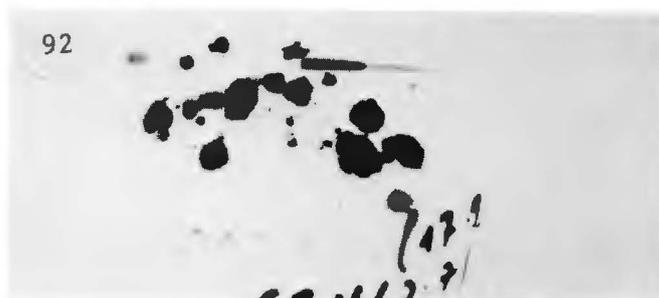


Fig. 91: Développement de la culture après une expérience de fusion de protoplastes des 2 espèces de Manihot, 60 après en milieu liquide.

Fig. 92: Développement des cals issus d'une expérience de fusion. Après 50 jours sur milieu gélosé, on remarque un ensemble de cals hétérogènes du point de vue de leur coloration et de leur développement.

Fig. 93: Les 3 types de cals observés:

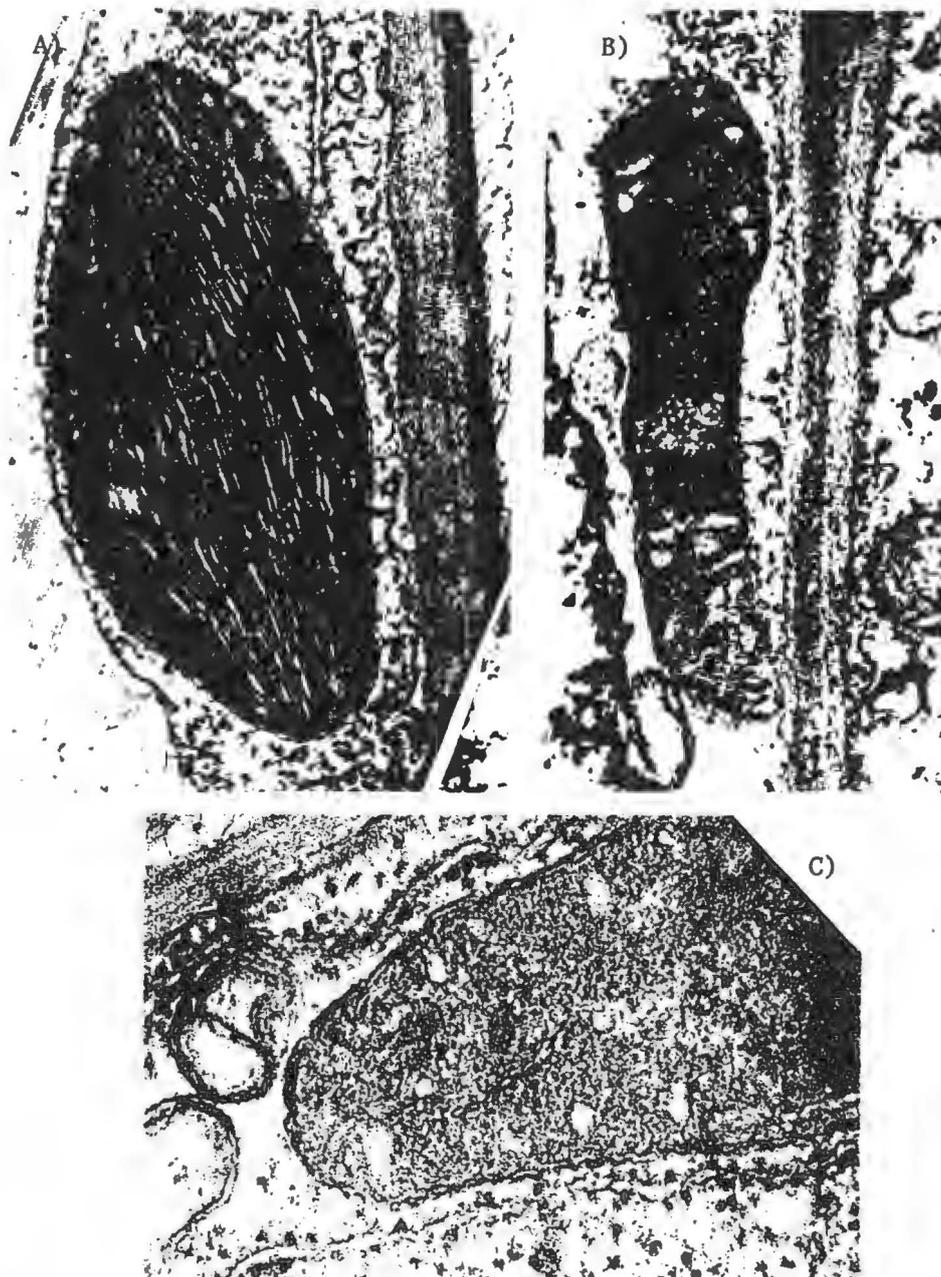
A = vert intense (Manihot esculenta)

B = brun (M. glaziovii)

C = blanchâtre ou légèrement vert (hybride)

Fig. 94: Rhizogénèse sur un cal hybride après 4 mois de culture sur milieu gélosé.

Fig. 94 bis Chloroplastes des différents types de cal observés dans nos expériences.
 Planche construite à l'aide des photographies fournies par le laboratoire de Physiologie Végétale de Madame le Professeur PARIS-PIREYRE.



- A) : Chloroplaste fonctionnel du cal chlorophyllien âgé de 2 mois et développé à partir de protoplaste de *M. esculenta* Crantz.
 B) : Proplaste du cal brun âgé de 2 mois et initié à partir du protoplaste de *M. glaziovii* Muell.
 C) : Proplaste en début de différenciation observé sur le cal hybride légèrement chlorophyllien et âgé de 2 mois.

4 - 4.2.7. Discussion sur l'évolution des protoplastes
après l'opération de fusion

La sélection éventuelle des cellules hybrides après une opération de fusion est toujours délicate. Les contrôles des pourcentages de fusions, réalisés ci-dessus semblent indiquer que les capacités d'allofusion intragénérique (*Manihot esculenta* X *Manihot glaziovii* : fig. 74, 77, 80) et intergénérique avec des genres éloignés (*Manihot* x *Dioscorea* : fig. 81) sont grandes en ce qui concerne les protoplastes de manioc.

Il paraît difficile d'affirmer que les cellules fusionnées obtenues au cours de nos expériences prolifèrent par bourgeonnement, car 2 jours après la fusion, toutes les cellules (hybrides ou non) paraissent identiques dans le milieu de culture. Mais, étant donné que les clivages observés commencent après l'arrêt des bourgeoisements (fig. 82, 85 et 86), on peut donc considérer que les cellules fusionnées bourgeoisent également.

Dans le cas des cellules hybrides, le bourgeoisement conduit à des situations diverses :

- formation des poches de bourgeoisements sans noyaux, quand la cytodièrese s'effectue avant la caryocinèse sans ascension totale d'un noyau dans une poche de bourgeoisement. Ceci conduirait donc dans le cas des cellules hybrides à la formation d'un côté de cytoplaste à cytoplasme hybride et de l'autre à la formation d'une cellule à 2 noyaux allotetraploïdes.

- Un partage dissymétrique des chromosomes des 2 espèces peut se produire alors ; et si les 2 cellules filles bourgeoisées se séparent, elles seront aneuploïdes.

- Chaque stock chromosomique de chaque parent est restauré dans chaque poche de bourgeonnement, ce qui conduirait à la formation des cybrides.

L'apparition chez certains cals hybrides de cellules à contours irréguliers (fig. 89) dénote la possibilité d'incidents cytologiques au niveau de la culture des cellules hybrides dans le milieu M. Signalons à ce sujet que MAGOON et al (1966) avaient rapporté que chez les allodiploïdes issus des croisements sexués entre les 2 espèces, l'appariement des chromosomes était parfois défectueux chez certains bivalents et que certains parmi eux présentaient une séparation précoce par rapport à d'autres. Ces incidents n'altèrent pas dans notre cas la viabilité des cals formés et peuvent être à l'origine de la diversité des cals hybrides observée après leur développement sur milieu gélosé (fig. 92).

Remarquons pour terminer que la fusion des protoplastes donne généralement naissance à des cellules allotétraploïdes plus ou moins stables, base de la grande variabilité observée dans une population de plantes régénérées à partir de la fusion de protoplastes, lorsqu'on la compare à celle issue de la reproduction sexuée.

L'observation d'une diversité de cals hybrides développés dans nos cultures peut donc être le reflet d'une variabilité intervenue au sein de nos cultures.

4 - 4.3. Conclusion sur le système d'obtention d'une variation orientée dans le sens de la résistance du manioc à la bactériose

La manihocine, même non totalement purifiée, a un effet décelable vis à vis de la survie des protoplastes

de *Manihot esculenta* Crantz. Cet effet qui se manifeste par la mort des cellules n'affecte pas la survie des protoplastes de *Manihot glaziovii* Muell, espèce résistante à la bactériose pour les quantités inférieures (1/15) à celles contenues dans le filtrat de culture (1/10) de *Xanthomonas manihotis*. Ce type d'effet est pour EARLE (1982), une première caractéristique importante et nécessaire pour l'utilisation des toxines produites par des agents phytopathogènes. Nous avons montré (MABANZA 1982) qu'une souche de *Xanthomonas manihotis* gardée dans de l'eau distillée à 4° C pendant 9 mois ne produisait plus un filtrat de culture aux effets toxiques décelables.

Or, nous avons signalé que si la manihocine induit une toxicité dans le milieu de culture à la dilution 1/15, 16 % de cellules restent encore en survie au 4e jour de la culture. Ces cellules survivantes, viables, commencent à proliférer par bourgeonnement dès le 4e jour, en augmentant la population cellulaire dans nos cultures. Beaucoup de cellules résistantes à la manihocine vont former leurs parois et se diviser par clivages successifs, en conduisant à la formation des cals viables qui sont capables de se développer sur un milieu gélosé.

En ce qui concerne la fusion des protoplastes, nous remarquons que :

- cette fusion est possible entre protoplastes de manioc dans nos conditions expérimentales.

- Le protoplaste de manioc possède une grande aptitude à l'allofusion, soit avec des protoplastes des espèces proches comme le *Manihot glaziovii* Muell, soit avec ceux des espèces de genres très éloignés, appartenant aux monocotylédones (*Diocorea alata*).

- L'évolution des cellules après fusion correspond à celle observée dans la culture ordinaire de protoplastes de *Manihot esculenta* Crantz et de *Manihot glaziovii* Muell (MABANZA et JONARD 1983 a et 1984). Au cours de cette évolution, nous pouvons définir une "voie diversifiante", le bourgeonnement qui intervient dans les premiers moments de la culture, et une "voie conservatrice" la division par clivage qui permet l'obtention de cals viables. La première voie permet l'augmentation du nombre de cellules et l'obtention d'une diversité cellulaire et la seconde voie participe à l'entretien de cette diversité en formant les cals viables. Ceci est une caractéristique importante de notre dispositif expérimental qui permet de disposer d'un grand nombre de cals susceptibles de variabilités.

- La sélection des cellules ou des cals hybrides reste jusqu'à ce jour en général fort délicate. Même, lorsque des plantes hybrides sont régénérées, ces produits de fusions restent difficiles à caractériser. Les critères couramment utilisés (critères morphologiques, cytologiques et biochimiques) ne sont pas toujours adaptés, surtout pour des espèces assez proches (TABAEIZADEH 1983). TABAEIZADEH (1983), en faisant la caractérisation des plantes obtenues par fusion somatique entre les protoplastes de *Lycopersicon* et ceux de *Petunia*, pense que le critère biochimique reste sans doute le meilleur, si l'on prend soin de sélectionner de bons marqueurs biochimiques.

La difficulté d'une caractérisation caryologique des produits de fusion tient au fait qu'après l'opération de fusion, beaucoup d'incidents peuvent se produire à l'étape cellulaire de la culture et en particulier l'élimination des chromosomes d'un des parents, ce qui conduira à la formation des cybrides. Alors, l'analyse de ce produit ne peut s'effectuer par le comptage des chromosomes, le cybride

ne comportant que le stock de l'un des parents. BELLIARD et PELLETIER (1978) caractérisent des produits de fusion de ce type par l'analyse des ADN cytoplasmiques.

Les cals issus du développement des cellules fusionnées aux caractéristiques intermédiaires (coloration, développement, état des chloroplastes) entre celles des 2 parents sont organogènes et peuvent initier de nombreuses racines. Cependant, il nous reste à réaliser la régénération de la plante entière de manioc à partir de protoplastes.

4 - 5. LES ESSAIS DE REGENERATION DE PLANTES A PARTIR DE PROTOPLASTES

En dehors de certaines espèces végétales, telles que le tabac, chez lesquelles la technique de régénération de plantes à partir de protoplastes est pratiquement maîtrisée, cette régénération est souvent difficile à réaliser. Ainsi, TABAEIZADEH (1983) a rapporté la difficulté de régénérer une plante de tomate à partir de protoplastes, bien qu'elle ait obtenu la régénération de *L. peruvianum* et de l'hybride somatique entre les 2 espèces. SHANIN et SHEPARD (1980) n'ont pu régénérer la plante chez le manioc qu'à partir d'un cultivar sur les 4 utilisés. Les difficultés de régénération sont liées à la nature du cultivar utilisé, même au sein d'une espèce chez laquelle de nombreux cas de régénération peuvent être signalés (TABAEIZADEH 1983, SHAHIN et SHEPARD 1980).

Nous avons pour notre part essayé 2 voies de régénération : la voie organogène par les inductions caulogènes et rhizogène et la voie embryogène par la formation des embryoides.

4 - 5.1. La voie organogène

Lorsqu'après 20 jours, les protoplastes de *Manihot esculenta* Crantz ont formé des cals de 0,2 à 0,3 mm de diamètre, nous pouvons les récupérer avec une pipette stérile et les transférer sur un milieu gélosé sur lequel ils vont proliférer activement. Ces cals deviennent rapidement verts et atteignent un diamètre de 15 mm en 1 mois. Les milieux utilisés renferment diverses combinaisons en phytohormones (ANA, BAP et AG₃). Dans la majorité des milieux pauvres en BAP (0,5 mg/l) et riches en ANA, les cals ont formé rapidement des racines dès le second mois après le transfert sur milieu gélosé.

Les mêmes observations ont été enregistrées en ce qui concerne les cals issus du milieu sélectif à manihocine ou les cals hybrides au niveau desquels les racines apparaissent après 4 mois. Les cals de *Manihot glaziovii* ont un développement très lent ; après 4 mois, ils peuvent cependant atteindre 20 mm de diamètre; après 8 mois certains de ces cals ont initié des racines.

Les milieux plus riches en cytokinines (BAP de 0,5 à 2 mg/l) ont également, en présence de faibles quantités d'auxines (ANA = 0,2 mg/l) initié un bon développement des cals très compacts d'un vert intense avec le *Manihot esculenta* Crantz. Le transfert de ces derniers sur des milieux pauvres en phytohormones ou sans phytohormone, n'a favorisé que l'induction rhizogène après 5 mois.

La rhizogénèse est donc la seule forme d'organogénèse apparue sur les cals issus de protoplastes. Certaines formations caulogènes ont cependant été obtenues (fig. 95) sur des milieux renfermant très peu de phytohormones, avec un rapport BAP/ANA variant entre 2 et 5. Ces formations caulogènes sont restées peu nombreuses et ne

se sont jamais développées en pousses feuillées.

Une autre voie a été tentée et s'est révélée plus efficace. Sur les cals enracinés quelques formations racinaires sont prélevées avec une partie du cal, puis repiquées dans un milieu pauvre en phytohormones. En moins de 10 jours, des formations caulogènes sont apparues sur un grand nombre de ces formations racinaires repiquées. Cette caulogénèse a cependant été bloquée après une semaine. L'obtention facile de cette caulogénèse sur des formations racinaires aisément développées sur des cals issus de protoplastes est donc une voie de régénération possible.

Nous avons par la suite orienté nos efforts vers des essais d'induction embryogène.

4 - 5.2. Essais d'obtention des embryoïdes

Les figures 96 et 97 montrent qu'il est possible d'obtenir des embryoïdes dans le milieu de culture des protoplastes de manioc. Ces embryoïdes apparaissent lorsqu'on crée un choc auxinique dans une culture âgée de 7 à 15 jours. Un mois après, nous pouvons observer la formation des embryoïdes. Mais, comme pour la caulogénèse, ces embryoïdes ont été bloqués et ne se sont pas développés en embryons viables, capables d'évoluer en plantes entières.

Cette possibilité d'embryogénèse confirme les résultats déjà obtenus sur la régénération des plantes entières à partir des organes juvéniles de *Manihot esculenta* tels que les cotylédons.

En effet, sur cette espèce, récemment, STAMP et HENSHAW (1982) ont obtenu l'embryogénèse somatique et la formation de plantes entières à partir de cotylédon.

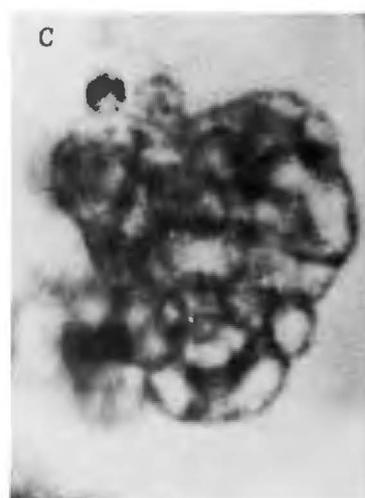
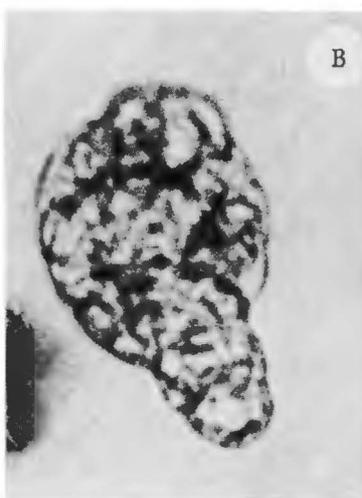
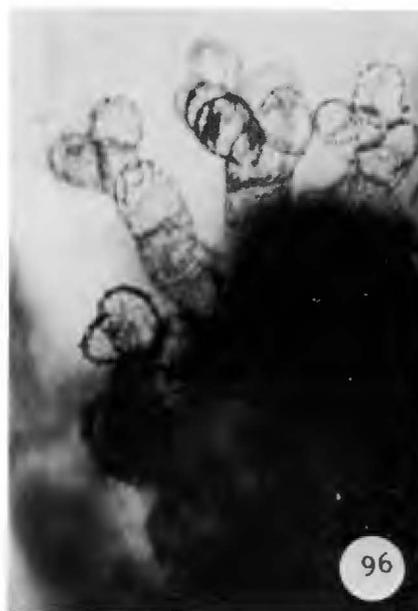


Fig. 95: Formation caulogène obtenue sur des cals issus de protoplastes. La caulogénèse a été souvent bloquée à ce stade après une semaine.

Fig. 96: Proembryons développés après un choc auxinique en milieu liquide.

Fig. 97: Développement des embryoïdes dans le milieu liquide:

- A = embryoïde globulaire
- B = embryoïde en torpille
- C = embryoïde en coeur

Nous mêmes (MABANZA 1982, MABANZA et JONARD 1983), avons obtenu la formation de plantes entières à partir de néoformation de bourgeons sur des explants de cotylédon, mais également à partir des cals développés au niveau des apex (MABANZA 1982, MABANZA et JONARD 1981). L'organogénèse et la formation de plantes entières obtenues antérieurement par SHAHIN et SHEPARD (1980) à partir de protoplastes de manioc, la caulogénèse et l'embryogénèse que nous avons initiées au cours de nos travaux, cet ensemble de résultats montre que les deux voies de régénération (embryogénèse somatique et organogénèse) sont possibles chez les protoplastes de manioc.

4 - 5.3. Discussion

La régénération de plantes entières sur des cals formés à partir des protoplastes dans le milieu de culture par organogénèse ou par embryogénèse est donc possible chez nos cultivars de manioc. Il convient maintenant de mettre au point, comme nous l'avons fait antérieurement pour le microbouturage, la culture des cotylédons ou de l'apex, un milieu de culture capable d'induire le développement des plantes entières.

V - CONCLUSIONS GENERALES

A la fin de ce mémoire, il convient d'en dégager les principaux résultats.

1 - La mise en collection du matériel végétal local Congolais a permis de caractériser un certain nombre de cultivars. Au cours de nos recherches antérieures, effectuées pendant les années 1976 à 1979 ; nous avons observé une grande diversité chez les cultivars locaux au niveau de leur souplesse d'adaptation à différentes zones écologiques (zones forestières, argileuses, argilo-sableuses, zones de savanes, zones de faible pluviométrie avec moins de 1500 mm d'eau et zones de forte pluviométrie avec plus de 1500 mm d'eau) et de leur sensibilité à différents fléaux tels que l'antrachnose, les mosaïques, la cochenille et la bactériose. Notre objectif devint alors l'obtention de plantes résistantes à la bactériose due au *Xanthomonas manihotis*. Le travail de terrain réalisé au Congo a constitué le support de notre future expérimentation. Nous avons ainsi choisi pour nos expériences *in vitro* quelques uns des cultivars en collections.

2 - Ainsi, certains cultivars locaux, même attaqués par la bactériose, présentaient une capacité de production supérieure à celle des clones introduits. Cette observation nous conduisit donc à chercher une amélioration du niveau de résistance à la bactériose due au *Xanthomonas manihotis* parmi le matériel végétal local.

Or, l'hybridation sexuée entre *Manihot esculenta* Crantz et *Manihot glaziovii* Muell, bien que pouvant donner de bons résultats (HAHN et al. 1973), se révèle assez longue à réaliser. Les techniques nouvelles, telles que la culture *in vitro* des protoplastes nous parurent plus inté-

ressantes, en offrant de plus une possibilité plus grande de variabilité au niveau de la descendance. Mais cette technique n'est exploitable que dans la mesure où les cals obtenus *in vitro* sont capables de régénérer des plantes viables.

3 - FEREOL (1978) et TILQUIN (1978) avaient signalé antérieurement que le bouturage du manioc était réalisable *in vitro*.

Nous avons cependant remarqué que tous les cultivars ne manifestent pas un bon comportement lorsque les explants sont isolés sur un milieu nutritif simple sans phytohormones. Nous avons observé en effet que les boutures du cultivar MM 78, sur milieu de KNOP, ne forment une plante entière qu'après 1 mois, la plante ne pouvant être utilisée pour l'isolement des protoplastes que 2 mois après.

L'emploi du milieu de MURASHIGE et SKOOG, enrichi en phytohormones a favorisé la formation de plantes entières chez tous nos cultivars de *Manihot esculenta* en moins de 15 jours et a permis d'étendre la technique au cultivar de l'espèce arbustive *Manihot glaziovii* Muell et au clône MA 255, hybride sexuée entre les 2 espèces.

Le bouturage en 2 temps, utilisant un premier milieu riche en cytokinine pour le développement des pousses et un second milieu enrichi en auxine, favorable à la rhizogénèse, permettra une multiplication encore plus rapide en favorisant la régénération de plantes entières en moins de 15 jours, ou en permettant la formation accélérée de plusieurs plantes (3 à 5). Remarquons ici que des résultats analogues ont été obtenus en appliquant la même technique sur les Citrus (MAMPOUYA 1983) et sur les rosiers (AVRAMIS 1982).

La mise au point d'une technique de microbouturage permettant une multiplication intense et conforme

des plantes issues de nos divers cultivars (cultivars de *Manihot esculenta* Crantz, cultivars de *Manihot glaziovii* Muell et leur hybride), constituait un bon départ pour nos futures expérimentations. En moins d'un mois, nous disposions donc dans des conditions d'homogénéité excellentes de grandes quantités de matériel végétal conforme. Les plantes obtenues sont, après leur transfert en pot, entretenues normalement en serre sur un substrat renfermant 3/5 de puzzolane et 2/5 de tourbe.

4 - Les autres possibilités de multiplication végétative que pouvaient nous offrir divers explants de manioc en culture in vitro ont été ensuite analysées (MABANZA 1982, MABANZA et JONARD 1981, 1983 b). Contrairement à TILQUIN (1978) qui a obtenu la néoformation de plantes entières à partir de fragment de limbe ou de pétiole, nos diverses expériences n'ont pas confirmé ces premiers résultats ; cette observation est en accord avec celles de NAIR et al. (1979) qui n'obtenaient aucune caulogénèse avec ce type d'explant, bien que la régénération de plantes entières soit facilement obtenue à partir des limbes foliaires chez beaucoup d'espèces, par organogénèse sur BEGONIA (KHODER et al. 1982) mais encore par embryogénèse somatique sur le café par exemple (DUBLIN 1980).

Par contre, les potentialités organogènes des organes juvéniles de manioc, tels que le cotylédon ou l'apex sont marquées. Elles permettront l'obtention de plusieurs plantes entières en moins d'un mois, à partir d'un seul méristème (MABANZA 1982, MABANZA et JONARD 1981). Les plantes obtenues à partir de ces explants de méristème caulinaire se développent normalement en serre, et sans manifester de variabilité apparente ni présenter les symptômes de mosaïques observables sur celles multipliées par simple microbouturage

in vitro, même après 6 mois de culture en serre. Ainsi donc, la culture du méristème caulinaire nous offre la possibilité d'obtenir des plantes saines. Nos observations sont conformes à celles de KARTHA et GAMBORG (1975, 1978) qui obtenaient par isolement des apex 60 % de plantes indemnes de virus chez le manioc et de ADEJARE et COUTTS (1981) qui ont également enregistré des résultats semblables sur la culture *in vitro* des apex de manioc. Ainsi, une plante saine issue de la culture du méristème caulinaire peut être sélectionnée, puis par des microbouturages accélérés *in vitro*, multipliée en moins d'un mois pour fournir le matériel nécessaire aux expérimentations sur les protoplastes.

De nombreuses plantes entières peuvent également être régénérées en moins d'un mois à partir de fragments de cotylédon. Le fait que STAMP et HENSHAW (1982) aient de leur côté obtenu une embryogénèse somatique au niveau des explants de cotylédon isolés *in vitro*, nous laisse penser que suivant les conditions de culture, les deux formes de régénération somatique de plantes, embryogénèse et organogénèse, sont possibles chez le manioc.

5 - IKOTUM (1976) notait que les symptômes de bactériose observés sur le manioc attaqué, pouvaient être dûs à l'action d'une toxine. Récemment, PERREAUX et al. (1982) ont isolé un composé, l'acide 3-méthylthiopropionique, capable d'initier certains symptômes de la maladie. Nous avons, pour notre part, montré que *Xanthomonas manihotis* était capable de produire en culture un filtrat toxique, capable d'induire un flétrissement notable sur les lobes foliaires détachés des plantes sensibles à la bactériose et cultivées en serre ou sur des pousses des plantes sensibles, cultivées *in vitro*. Cet effet toxique n'est pas décelable sur les organes du cultivar de l'espèce *Manihot*

glaziovii résistante à la bactériose provoquée par *Xanthomonas manihotis*.

Nous avons trouvé d'autre part, que le filtrat de culture purifié, la manihocine, permettait de déceler une différence de sensibilité à l'effet toxique chez les différents cultivars de *Manihot esculenta* Crantz sélectionnés dans nos expériences (MABANZA 1982).

La manihocine pourrait donc servir comme agent de criblage de cultivar vis à vis de la résistance à la bactériose, et par conséquent être utilisée comme un test de résistance des cultivars à la bactériose.

La mise au point de l'isolement de la manihocine a permis de confectionner des milieux sélectifs pour nos expérimentations sur l'accoutumance des protoplastes aux toxines du *Xanthomonas manihotis*.

6 - En ce qui concerne maintenant l'isolement et le développement *in vitro* des protoplastes végétaux, les spécialistes indiquent la nécessité d'une bonne technique d'isolement des protoplastes, permettant d'obtenir des protoplastes isolés, viables, en grande quantité. Mais, il convient encore que les protoplastes dans un milieu nutritif convenable, soient capables de reformer leurs parois, puis proliférer activement pour former des cals viables. Enfin, il faut mettre au point un milieu favorable au développement futur des cals, puis à l'induction organogène ou à la formation des embryons. Certains chercheurs notent l'importance du conditionnement préalable des plantes (SHAHIN et SHEPARD 1980) et celle du génotype (TABAEI-ZADEH 1983), utilisé.

Pour notre part, nous remarquons que les protoplastes de manioc, *Manihot esculenta* Crantz, sont facilement

isolés à partir des limbes foliaires des plantes cultivées en serre, ou mieux encore à partir des plantes cultivées *in vitro*. Notre technique d'isolement permet l'obtention d'environ 1.10^7 protoplastes par gramme de limbe, lorsque nous pratiquons une seule macération ; mais l'utilisation de deux macérations dans notre expérimentation a permis de disposer pour chaque expérience d'au moins 2.10^7 protoplastes par gramme de limbe.

Divers milieux de culture pour l'isolement des protoplastes de différentes espèces végétales ont été préparés par NAGATA et TAKEBE (1971) sur le tabac, KARTHA et al. (1975) sur le *Brassica napus*, UPADHYA (1975) sur la pomme de terre, BOURGIN et al. (1976) sur le tabac et SHEPARD et TOTTEEN (1977) sur la pomme de terre. En effet, la composition du milieu de culture a une très grande influence sur le développement des protoplastes (VASIL et VASIL 1980, MABANZA et JONARD 1983).

Nous avons mis au point pour le manioc le milieu M qui permet d'isoler des protoplastes viables, capables de reformer leurs parois et de proliférer. La mise au point de ce milieu M a permis, en particulier, la prolifération par clivage de la presque totalité des protoplastes viables.

Au cours de nos nombreuses expérimentations sur les protoplastes de manioc, deux phénomènes ont été observés au niveau cellulaire : la prolifération par bourgeonnement et la division par clivage (MABANZA 1982, MABANZA et JONARD 1983, MABANZA et MEYER 1984).

Le bourgeonnement est un phénomène qui avait déjà été observé par plusieurs auteurs. NAGATA et TAKEBE (1970) le décrivent comme étant une éjection du cytoplasme qui favorise la formation des subprotoplastes. DUTUIT (1981) qui l'a étudié en fonction de l'âge des organes (feuilles)

servant à l'isolement, se refuse à le considérer comme un phénomène pathologique. Pour MEYER (1981), le bourgeonnement chez les protoplastes de tabac mis en culture dans les milieux WO 6 et RO 6 est une prolifération cellulaire qui s'accompagne d'une caryocinèse classique, conduisant à la formation des deux noyaux fils. Dans nos cultures, nous avons observé que les cellules filles, issues des bourgeonnements peuvent ou non se séparer. Ce sont des cellules viables qui peuvent ultérieurement reconstituer leurs parois et entrer alors en division par clivage. En effet, dans nos expériences réussies, toutes les cellules issues des bourgeonnements se sont divisées par la suite par clivage pour former des cals viables.

La division par bourgeonnement peut se dérouler d'une manière dissymétrique. NAGATA et TAKEBE, 1970 notaient que beaucoup de subprotoplastes formés à l'issue des bourgeonnements, contenaient très peu ou presque pas de chloroplastes. Dans nos cultures, le bourgeonnement a conduit à la formation de véritables cellules filles ; toutefois, la répartition entre cellules filles du cytoplasme et des chloroplastes a été souvent dissymétrique. Le fait que nous assistons dans nos cultures à une séparation massive des cellules filles issues des bourgeonnements, nous permet de dire que ce mode de divisions permet une augmentation du nombre de cellules uniques dans nos cultures, mais, peut être aussi à la base de la création d'une diversité cellulaire. Cette prolifération par bourgeonnement apparaît alors dans nos cultures comme une voie diversifiante de la division cellulaire.

La division par clivage se produira dès le 4e jour de culture, peu fréquente au cours des premiers jours où elle sera le plus souvent précédée par le bourgeonnement. Mais, après 2 semaines, l'ensemble de la population cellulaire va entrer en clivage, même dans les amas des cellules

bourgeonnées. Cette division qui n'intervient qu'après la formation des parois, réclame des conditions particulières : un milieu de culture convenable, le milieu M, une température supérieure à 25° C, une densité de culture située entre 2.10^5 et $3,5.10^5$ protoplastes/ml, un apport exogène de phytohormones etc... Le fait que nous ayons sur les milieux sans phytohormones, observé des bourgeonnements avant que les cellules ne meurent 6 jours après la mise en culture, montre qu'au moment de l'isolement des protoplastes, les noyaux des cellules conservent toutes leurs capacités de divisions, mais la vie cellulaire ne peut être entretenue que par un apport exogène d'auxine et de cytokinine.

En effet, dans nos expériences, l'apport de phytohormones favorisait la formation des parois et la division par clivage, deux phénomènes étroitement liés aux teneurs en auxines (ANA) du milieu. Ainsi, les quantités d'ANA inférieures à 4 mg/l n'ont pas fourni des résultats satisfaisants. Si la caryocinèse, la formation des parois et la cytokinèse sont apparues dans nos cultures comme des phénomènes indépendants, l'obtention de cals à croissance indéfinie a nécessité par contre, une coordination entre ces 3 mécanismes.

L'obtention de cals viables est précoce dans le milieu liquide M. Après 21 jours de culture, ces cals visibles à l'oeil nu ont de 0,2 à 0,4 mm de diamètre et peuvent facilement proliférer ensuite après transfert sur un milieu gélosé.

La division par clivage, décrite pour la première fois dans une culture des protoplastes de tabac par NAGATA et TAKEBE en 1970, permet un partage d'une cellule mère en 2 cellules filles, approximativement égales. Ces cellules filles ne se séparent pas ; elles sont reliées entre elles par la lamelle moyenne formée au niveau de

l'ancienne plaque métaphasique. Elles s'assembleront en colonie. Il s'agit là donc d'une prolifération "conservatrice", car contrairement au bourgeonnement qui sépare les cellules filles, le clivage contribue à conserver dans une seule colonie, tout le potentiel génétique de la cellule mère. Par contre, l'apparition des clivages chez les cellules issues des bourgeonnements, va participer à l'entretien et à la conservation, par la formation des colonies à croissance indéfinie, de cette diversité cellulaire créée au moment des bourgeonnements.

L'entretien favorable de la vie cellulaire dans le milieu M jusqu'à la formation de nombreux cals à croissance indéfinie, nous permettra donc de conserver et entretenir une variation transmissible intervenue au niveau cellulaire.

Sur ce même milieu M, la formation des cals à croissance indéfinie est possible à partir des protoplastes de *Manihot glaziovii* Muell. Entretenus sur ce même milieu M, les cals des 2 espèces manifestent des différences significatives : les cals issus de *Manihot esculenta* Crantz manifestent une prolifération rapide, sont colorés en vert intense et sont capables d'initier des racines après 2 mois de culture sur milieu gélosé ; les cals de *Manihot glaziovii* Muell, par contre, présentent une croissance beaucoup plus lente, leur coloration brune au départ devient vert pâle après 3 mois de culture. Ils n'induisent des racines qu'après 8 mois.

Les essais de régénération de plantes entières que nous avons conduits récemment, indiquent que l'induction caulogène peut être obtenue à partir des colonies issues des cals. Elle est cependant très faible et souvent bloquée dès les premiers stades. La régénération de la plante entière nécessitera probablement la mise au point

d'un milieu convenable différent de ceux couramment utilisés pour les autres espèces. La formation d'embryoïdes obtenue après un choc auxinique, très tôt, est un résultat également encourageant.

7 - Nos expériences réalisées sur un milieu sélectif montrent qu'il existe une différence significative au seuil de 1 % entre les protoplastes de *Manihot esculenta* Crantz et ceux de *Manihot glaziovii* Muell en ce qui concerne leur sensibilité vis à vis des effets toxiques de la manihocine. En effet, les protoplastes de *Manihot glaziovii* Muell, espèce résistante aux attaques de *Xanthomonas manihotis*, ne sont pas tués par la manihocine, contrairement à ceux de *Manihot esculenta* Crantz dont la viabilité est voisine de 16 % seulement au 4e jour de culture. Nous avons confirmé ainsi les résultats enregistrés au niveau des tests réalisés sur des lobes foliaires ou sur les pousses des deux espèces (MABANZA 1982), isolés *in vitro*.

Et, les protoplastes des cultivars sensibles qui survivent dans le milieu à manihocine restent viables. Ils se divisent pour former des cals capables de se développer sur milieu gélosé. La formation de nombreux cals viables montre que le système manihocine - protoplastes de cultivars sensibles à la bactériose est un système utilisable dans notre dispositif expérimental.

8 - L'hybridation somatique peut également créer l'induction d'une résistance à la maladie chez une espèce sensible. Cette hybridation permet la fusion entre protoplastes des 2 espèces, l'une sensible, l'autre résistante à la maladie. Il semble que les protoplastes de manioc aient une grande capacité d'allofusion interspécifique ou intergénérique comme l'indiquent nos expériences de fusions, réalisées avec une autre espèce végétale, l'igname (*Dioscorea*

alata). Cette capacité d'allofusion peut être appréciée en comptabilisant le nombre de protoplastes libres (non fusionnés ou non agrégés) dans les expériences de fusions entre les protoplastes des 2 espèces de *Manihot*. Ce nombre est relativement faible, moins de 30 % de la totalité des protoplastes. Pour augmenter le taux d'allofusion et réduire celui d'autofusion, il conviendrait de mieux mélanger les protoplastes des 2 espèces au moment de l'opération de fusion, ce qui est aisément réalisable sur manioc, les deux espèces possédant des protoplastes de mêmes calibres et étant traités de la même façon tout le long de leur culture.

Les cals obtenus après une expérience de fusion sont relativement nombreux et permettent donc une étude des produits de fusion. Une méthode de sélection de cals hybrides a été essayée.

Cette méthode s'appuie sur quatre caractéristiques principales liées à la culture des protoplastes des deux espèces de *Manihot* :

(1) les protoplastes parentaux évoluent difficilement avec les densités de culture inférieures à $0,5 \cdot 10^5$ Prot./ml ;

(2) Les protoplastes de *Manihot esculenta* Crantz forment des cals précoces qui dépérissent après un long séjour (1 mois) dans le milieu liquide M ;

(3) Les cals développés à partir des protoplastes des 2 espèces portent des colorations bien distinctes, durant toute la culture sur le milieu gélosé ;

(4) L'analyse faite sur les cals âgés de 2 mois montre que le *Manihot glaziovii* Muell ne comporte que des proplastes tandis que le *Manihot esculenta* Crantz dispose déjà des chloroplastes fonctionnels.

Dans nos expériences de fusion, le long séjour (60 jours) imposé par la culture n'a pas favorisé la survie des cals de *Manihot esculenta* Crantz, les quelques cals survivants de *Manihot glaziovii* Muell sont par contre identifiables par leur développement très lent et leur coloration brune caractéristique. Par ailleurs, les cals hybrides obtenus ont une coloration intermédiaire entre ceux de *Manihot esculenta* Crantz, vert intense et ceux de *Manihot glaziovii* Muell, bruns au premier moment, puis légèrement verts après 3 à 4 mois de culture.

Ces analyses sont actuellement les seuls critères utilisés pour la reconnaissance des cals hybrides. Il convient de noter ici que ces cals à coloration intermédiaire n'avaient jamais été observés au cours des multiples expériences ordinaires, opérées soit sur *Manihot esculenta* Crantz, soit sur *Manihot glaziovii* Muell, mais sont toujours apparus à la suite des expériences de fusion entre les deux espèces.

L'analyse cytologique par comptage des chromosomes, même si elle a été utilisée avec succès par certains chercheurs (GLEBA et HOFFMAN 1980, GLEBA et al. 1982, SCHENK et ROBBELEN 1982) peut parfois ne pas être satisfaisante en raison des variations du nombre de chromosomes observés parfois au niveau des plantes régénérées en culture *in vitro* en général (SKIRVIN 1977, NIIZEKI 1974) et en particulier sur les plantes régénérées à partir des protoplastes (KARP et al. 1982), ou en raison de la possibilité d'élimination des chromosomes d'un des parents. Compte tenu des modes de divisions observés dans nos expériences, ce type d'analyse ne peut être retenu comme un critère de sélection de cals hybrides. L'analyse biochimique suppose une bonne connaissance valable des marqueurs biochimiques des 2 espèces, marqueurs qui dans notre cas doivent alors s'exprimer dans le produit de fusion.

Si certaines autofusions sont conservées dans nos cultures, le comportement de nos cultivars des deux espèces, vis à vis de la manihocine, permettrait après régénération de plantes entières, de mieux les étudier. Des travaux récents ont montré en effet, qu'une étude solide des produits de fusion ne peut souvent se réaliser qu'après régénération de plantes et l'étude de leur comportement naturel sur le terrain (TABAEIZADEH 1983).

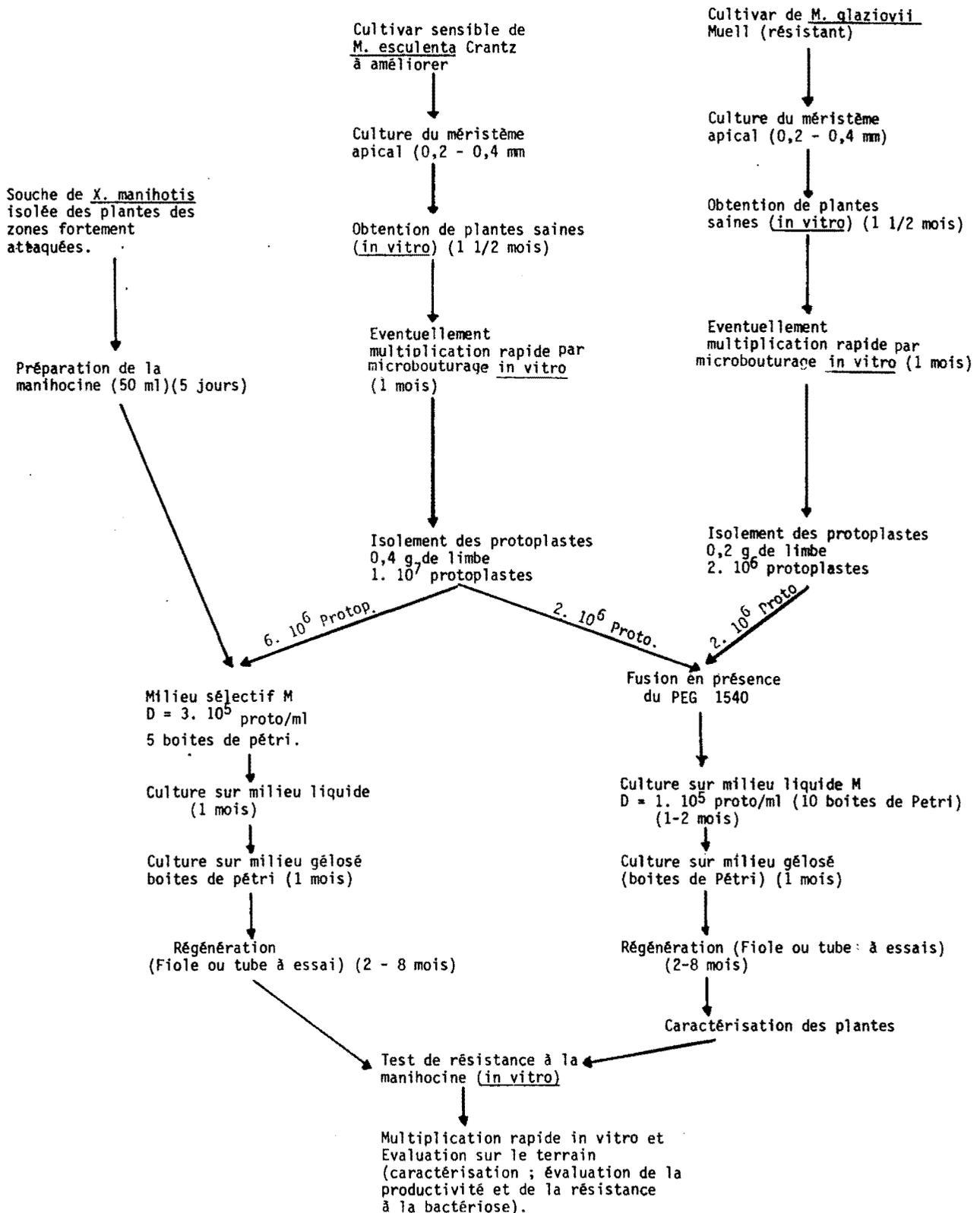
Malgré cette analyse critique, nous restons convaincus que l'hybridation somatique entre les 2 espèces de manioc est réalisable, sinon réalisée comme l'indiquaient l'obtention de fusions entre protoplastes des deux espèces et le développement de nombreux cals nouveaux, intermédiaires entre ceux issus des deux types parentaux.

9 - La régénération de plantes entières de manioc à partir de protoplastes peut être envisagée, puisque SHAHIN et SHEPARD l'ont déjà réalisée en 1980, bien que les plantes qu'ils ont obtenues, peu nombreuses et régénérées à partir d'un cal volumineux, soient développées à partir d'un seul génotype parmi les 4 utilisés dans leurs travaux.

La formation de nombreux embryoides obtenus dans nos expériences montre que la régénération de plantes en grand nombre est possible. Cette technique devra être poursuivie.

Pour conclure, nous proposerons le plan de travail résumé dans la figure 98 qui résume nos principaux résultats et ouvre la voie aux expérimentations futures.

Figure 98 : Schéma applicable à l'induction chez le manioc, par la culture in vitro, de protoplastes, d'une résistance à la bactériose provoquée par le *Xanthomonas manihotis*.



Les cultures témoins (autofusions ou témoins-toxine) peuvent être réalisées avec le reste des protoplastes non utilisé.

VI - BIBLIOGRAPHIE

- ADEJARE G.O., COUTTS R.H.A. :
1981 : Eradication of cassava mosaic disease from Nigerian cassava clones by meristem tip culture.
Plant Cell Tissue Organ Culture, 1 : 25-32.

- AMARAL J. Franco do :
1912 : Estudo do organismo causador da bacteriose da mandioca. (Brazil).
Arquivos do Instituto Biologico, 13 : 119-126.

- AVRAMIS T. :
1982 : Contribution à l'analyse des bases physiologiques et techniques de la multiplication végétative in vitro du rosier cultivé : porte greffé, rosa indica major et rosa manetti, cultivar rosa hybrida lusamb.
Thèse de 3e cycle d'Agronomie, USTL, 1982, 207 page.

- AYENOR G.S. :
1978 : Miscellaneous uses for starch : "what starch can do cassava starch does it best".
IITA, 1978, 8 p.

- BAJAJ Y.P.S., SAETTLER A.W. :
1970 : Effect of halotoxin containing filtrates of Pseudomonas phaseolicola on the growth of bean callus tissue.
Phytopathology, 60 (7), 1065-1067.

- BANTSIMBA J. et MABANZA J. :
1976 : Une nouvelle maladie du manioc en République Populaire du Congo, la bactériose du manioc.
In Cassava Bacterial Blight : workshop held at IITA Ibadan, Nigeria, 1-4 nov. 1976 pp, 32-34.

- BEHNKE M. :
1976 : Kulturen isolierter zellen von einigen dihaploiden Solanum tuberosum - kloten and ihre regeneration.
Z. Pflanzenphysiol. 78 : 77-81.

- BEHNKE M. :
1979 : Selection of potato callus for resistance to culture filtrates of Phytophthora infestans and regeneration of resistant plants.
Theor. and Appl. Genet. 55 : 69-71.

- BELLIARD G., PELLETIER G. :
1978 : Hybridation cytoplasmique par fusion de protoplastes chez *Nicotiana Tabacum*.
Physiolo. Veg. 16 (3), 441-448.

- BELLIARD G., PELLETIER G. et FERAULT M. :
1977 : Fusion de protoplastes de *Nicotiana Tabacum* à cytoplastes différents : étude des hybrides cytoplasmiques néoformés.
C.R. Acad. Sci. Paris, 284 : 749-752.

- BELLIARD G., PELLETIER G., BEDEL F., QUETIER F. :
1978 : Morphological characteristics and chloroplast DNA distribution in different cytoplasmic parasexual hybrids of *Nicotiana tabacum*.
Mol. Gen. Genet., 165 : 231-237.

- BELLIARD G., VEDEL F. et PELLETIER G. :
1979 : Mitochondrial recombination in cytoplasmic hybrids of *Nicotiana tabacum* by protoplast fusion.
Nature, 281 : 401-403.

- BERGOUNIOUX C., BUNISSET C., PERENNES C. :
1980 : Transfert de facteurs cytoplasmiques de la fertilité mâle entre 2 lignées de *Petunia hybrida* par fusion de protoplastes.
Plant. Sci. Letters, 19 : 143-149.

- BIDNEY D.L. and SHEPARD J.F. :
1980 : Colony development from sweet potato petiole protoplasts and mesophyll cells.
Plant. Sciences Letters, 18 : 335-342.

- BIGOT C. :
1976 : Quelques aspects de la néoformation de bourgeons en relation avec la nature des tissus mis en culture.
Actes du 101e Congrès National des Sociétés Savantes, Lille, 1976, Sciences Fasc. 1, pp. 371-382.

- BIGOT C. :
1978 : Multiplication végétative in vitro par néoformation de bourgeons et d'embryons somatiques.
Service de Physiologie Végétale ENSH, Versailles, 1978, 41 p.

- BINDING H., NEHLS R. :
1978 : Somatic cell hybridization of *Vicia faba* + *Petunia hybrida*.
Mol. Gen. Gent., 164 : 137-143.

- BINDING H., NEHLS R., JORGENSEN J. :
1982 : Protoplast regeneration in higher plants.
Proc. 5th Intl Cong. Tissue and cell culture, Edit.
by Fujiwara, Japon, 1982, pp. 575-576.

- BLASCHEK W., HASS D., KHOLER H., FRANZ G. :
1981 : Cell wall regeneration by *Nicotiana tabacum* proto-
plasts : chemical and biochemical aspects.
Plant. Science Letters, 22 : 47-57.

- BOLHUIS G.G. :
1949 : Enkele voorlopige resultaten van een behandeling
van cassave stekken met colchicine.
Buitenzorg. Java. General Agri. Research Stat. Comm.
n° 93, 9 p.

- BOLHUIS G.G. :
1969 : Intra and Interspecific crosses in the genus *Mani-
hot*.
Proc. 5th Augustine University of the West Indies.

- BONNETT H.T. :
1976 : On the mechanism of the uptake of vaucheria chloro-
plasts by carrot protoplasts treated with polyethy-
lene glycol.
Planta, 131 : 229-233.

- BONNETT H.T. and ERIKSON T. :
1974 : Transfer of algal chloroplasts into protoplasts of
Higher plants.
Planta, 120 : 71-79.

- BOOTH R.H., WHOLEY D.W. :
1978 : Cassava processing in South east Asia. In Cassava
Harvesting and processing proceedings of a workshop
held at CIAT, Cali Colombia, 24-28 avril, pp. 7-11.

- BOURGIN J.P., MISSONNIER C., CHUPEAU Y. :
1976 : Culture de protoplastes de mesophylle de *Nicotiana
sylvestris* haploïde et diploïdes.
C.R. Acad. Sci. Paris, 282 : 1853-1856.

- BOURGIN J.P., CHUPEAU Y., MISSONNIER C. :
1979 : Plant regeneration from mesophyll protoplasts of several *Nicotiana* species.
Physiol. Plant. 45 : 288-292.

- BRADBURY J.F. :
1978 : Identifications et caractéristiques du *Xanthomonas manihotis*.
In *La Bacteriose du manioc en Afrique : le présent, le passé, l'avenir*. Compte-rendu du Séminaire Interdisciplinaire tenu à l'IITA Ibadan, Nigeria, 26-30 juin 1978, pp. 1-4.

- BRAUN A.C. :
1955 : A study on the mode of action of the wild fire toxin.
Physiopath. 45 : 659-664.

- BROWN W. :
1955 : Studies in the physiology of parasitism : the action of *Botrytis cinerea*.
Ann. Botany, 29 : 343-348.

- CABOCHE M. :
1980 : Nutritional requirement of protoplasts derived haploid tobacco call grown at low cell densities in liquid medium.
Planta, 149 : 7-18.

- CARLSON P.S. :
1970 : Induction and isolation of auxotrophic mutants in somatic cell cultures of *N. tabacum*.
Science, 168 : 487-489.

- CARLSON P.S., SMITH H.H., DEARING R.D. :
1972 : Parasexual interspecific plant hybridization.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69 : 2292-2294.

- CARLSON P.S. :
1973a: The use of protoplasts for genetic research.
Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 70 : 598-602.

- CARLSON P.S. :
1973b: Methionine sulfoximine resistant mutants of tobacco.
Science, 180 (4093), 1366-1368.

- CARLSON P.S., SMITH H.H., DEARING R.D. :
1972 : Parasexual interspecific plant hybridization.
Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 69 : 2292-2294.

- CARLSON P.S. and POLACCO J.C. :
1975 : Plant cell culture : genetic aspects of crop
improvement.
Science, 188 : 622-625.

- CHALEF R.S. and CARLSON P.S. :
1974 : Somatic cell genetic of higher plants.
Ann. Rev. Genet. 1974, 8 : 267-278.

- CHILTON M.D. :
1983 : L'introduction de gènes étrangers dans la plante.
Pour la Science, août 1983, pp. 89-99.

- CHUPEAU Y. et MOREL G. :
1970 : Obtention de protoplastes de plantes supérieures
à partir de tissus cultivés in vitro.
C.R. Acad. Sci. (Paris), série D 270 : 2659-2662.

- CHUPEAU Y. et BOURGIN J.P. :
1980 : Les protoplastes de cellules végétales.
In Multiplication végétative des plantes supérieures
par CHAUSSAT et BIGOT, Ed. Gauthier Villard, pp.
191-221.

- COCK J.H., WHOLEY D., LOZANO J.C. :
1976 : A rapid propagation system for cassava.
Cali, CIAT, 1976, 10 p.

- COCKING E.C. :
1960 : A method for the isolation of plant protoplasts
and vacuols.
Nature, 187 : 962-963.

- COCKING E.C. :
1961 : Properties of isolated plant protoplasts.
Nature, 191 : 780-782.

- COCKING E.C. :
1973 : Plant cell modification : problems and perspectives
in collq. Intern. CNRS (Versailles), Ed. de l'Ins-
titut Nat. de la Recherche Agronomique, Paris,
1973, pp. 327-337.

- COCKING E.C. :
1977 : Genetic modification of plant cell : a reappraisal.
Nature, 266 : 13-14.

- COMSTOCK J.C. and SCHEFFER R.P. :
1972 : Production and relative host specificity of a toxin
from helminthosporium maydis.
Plant. Dis. Report 56 : 247-251.

- COMSTOCK J.C., MARTINSON C.A. and GENGENBACH B.G. :
1972 : Characteristics of a host specific toxin produced
by phyllosticta maydis.
Phytopath. 62 : 1107.

- COMSTOCK J.C., MARTINSON C.A. and GENGENBACH B.G. :
1973 : Host specificity of a toxin from phyllosticta maydis
for Texas cytoplasmically male sterile maize.
Phytopath. 63 : 1357-1361.

- COOKE R. and MEYER Y. :
1981 : Hormonal control of tobacco protoplast nucleic acid
metabolism during in vitro culture.
Planta, 152 : 1-7.

- DAHLBERG B. :
1978 : Large scale cassava starch extraction processes.
In Cassava harvesting and processing. Proceedings
of a workshop held at CIAT. Cali, Colombia, 24-28,
April 1978, pp. 33-36.

- DALE P.J. :
1983 : Protoplasts culture and plant regeneration of cereals
and other recalcitrant crops.
Proceedings of 6th Intl. Protoplast Symp. Basel,
1983, Edit. by POTRYKUS, HARMS, HINNEN, MUTTER,
KING and SHILLITO, pp. 31-41.

- DALY J.M. :
1977 : The early biochemical and cytological events in plant
disease : a perspective in biochemistry and cytology
of plant parasite interaction. Ed. by TOMIYAMA K.
DALY J.M., URITANI I., OKU H. and OUCHI S., 1977,
pp. 2-9.

- DANIEL J.F., BOHER B., MABANZA J., MAKAMBILA C.
1978 : La bactériose du manioc au Congo : étiologie, épidémiologie et lutte.
In La bactériose du manioc en Afrique : le passé, le présent, l'avenir.
Compte-rendu du Séminaire interdisciplinaire qui s'est tenu à l'IITA, Ibadan, Nigeria, 26-30 juin 1978, pp. 50-55.

- DAVEY M.R. and COCKING E.G. :
1972 : Uptake of bacteria by isolated higher plant protoplasts.
Nature, 239 : 455-456.

- DAVEY M.R., FREARSON E.M. and POWER J.B. :
1976 : Polyethylene glycol induced transplantation of chloroplasts into protoplasts : an ultrastructural assessment.
Plant. Science Letters, 7 : 7-16.

- DAVEY M.R., CLOTHIER R.H., BALLS M. and COCKING E.G. :
1978 : An ultrastructural study of the fusion of cultured amphibian cells with higher plant protoplasts.
Protoplasma 96 : 157-172.

- DAVEY M.R., COCKING E.G., FREEMAN J., PEARCE N. and TUDOR I
1980 : Transformation of Petunia protoplasts by isolated agrobacterium plasmids.
Plant. Science Letter, 18 : 307-313.

- DAVEY M.R. :
1983 : Recent developments in culture and regeneration of plant protoplast.
Proceedings of 6th Intl. Protoplast. Symp. Basel 1983, Edit. by POTRYKUS, HARMS, HINNEN, HUTTER, KING and SHILLITO, pp. 19-29.

- DEMARLY Y. :
1972 : Régulation et hétéroosis.
Ann. Amelio. Plant. 22 (2), 143-166.

- DEMARLY Y. :
1973 : Les effets cytoplasmiques et l'amélioration des plantes.
Le Selectionneur Fr., 61-68.

- DEMARLY Y. :
1976 : La notion de programme génétique chez les végétaux supérieurs. I. Aspects théoriques.
An. Amel. Plantes, 26 : 117-138.

- DEMARLY Y. :
1977a: Relations hôte-pathogène et stratégie des multili-
gnées.
Ann. Phytopathol. 9 (1), 21-31.

- DEMARLY Y. :
1977b: Génétique et amélioration des plantes.
Ed. Masson, Paris, 1977, 287 p.

- DESHAYES A. :
1978 : Induction de l'aptitude à la variation somatique
par la multiplication végétative in vitro et modi-
fication de son expression in vivo selon l'état
physiologique des cellules.
Physiol. Végét. 16 (2), 215-229.

- DIMMOND A.E. and WAGGONER P.E. :
1953 : On the nature and role of vivotoxins in plant
diseases.
Phytopathology 43 : 229-235.

- DOUGLAS G.C., WETTER L.R., NAKAMURA C., KELLER W.A.,
SETTERFIELD G. :
1981 : Somatic hybridization between *Nicotiana rustica*
and *Nicotiana tabacum*. III. Biochemical, morpholo-
gical and cytological analysis of somatic hybrid.
Can. J. Bot. 59 : 228-237.

- DUBLIN P. :
1980 : Induction de bourgeons néoformés et embryogénèse
somatique. Deux voies de multiplications végétatives
in vitro des cafeiers cultivés.
Café, cacao, thé, 24 (2) : 121-130.

- DUDITS D., HADLACZKY G.T., BAJSZAR G.Y., KONCZ C.S., LARAZ
G., HORVATH G. :
1979 : Plant regeneration from intergeneric cell hybrid.
Plant Sci. Lett. 15 : 101-112.

- DURAND J. :
1979 : High and reproducible plating efficiencies of protoplasts isolated from in vitro grown haploid *Nicotiana glauca* and *Nicotiana glauca* and *Nicotiana glauca*.
Z. Pflanzenphysiol. 93 (4), 283-295.

- DURBIN R.D. :
1972 : Bacterial phytotoxins : a survey of occurrence, mode of action and composition. In phytotoxins in plant diseases. Proceedings of NATO advance study Institute.
Pugnochiuso, Italy, June 1970, pp. 18-31.

- DUTUIT P. :
1981 : Le bourgeonnement des protoplastes issus de mésophylle chez le pétunia hybrida. Effet du niveau d'insertion des feuilles et de leur âge.
C.R. Acad. Sci. Paris t. 292, série D 907-910.

- EARLE E.D. :
1978 : Phytotoxin studies with plant cells and protoplasts. in *Frontiers of tissue culture*.
Edit. by T.A. THORPE. Proceeding of the 4th Intern. Cong. of Plant Tissue and Cell Culture, Canada, 1978, pp. 363-372.

- EARLE E.D., GRACEN V.E. :
1982 : Effects of *Helminthosporium* phytotoxins on cereal leaf protoplasts.
Proceedings 5th Intl. Cong. Plant. Tissue and Cell Culture, Edit. by FUJIWARA, Tokyo 1982, pp. 663-664.

- ERICKSON T. :
1971 : Isolation and fusion of plant protoplasts. In *Les Cultures de tissus de plantes*.
CNRS Paris, 1971, pp. 297-301.

- EVANS M.L. :
1974 : Rapid responses to plant hormones.
Ann. Rev. Plant. Physiol. 25 : 195-223.

- EVANS B.A. :
1981a: Genetic variability of somatic hybrid plants.
Newsletter, 33 : 6-11.

- EVANS D.A. :
1981b: Disease resistance : incorporation into sexually incompatible somatic Hybrid of the genus nicotiana Science, 213 : 907-909.

- EVANS D.A. :
1982 : Genetic analysis of somatic hybrid plants. Proceedings 5th Intl. Cong. Plant. Tissue and cell Culture, Edit. by FUJIWARA, Tokyo, 1982, pp. 635-636.

- EVANS D.A., FLICK C.E., JENSEN R.A. :
1981 : Disease resistance : Incorporation into sexually incompatible somatic hybrid of the genus Nicotiana. Science 213 : 907-909.

- FABRES G., MATILE-FERRERO D. :
1980 : Les entomophages inféodés à la cochenille du manioc Phenacoccus manihoti (Hom. Coccoïdea pseudococcidae) en République Populaire du Congo. 1. Les composantes de l'entomocoenose et leurs inter-relations. An. Soc. Ent. Fr. (N.S.), 16 (4), 509-515.

- FABRES G., BOUSSIENGUE J. :
1981 : Bioecologie de la cochenille du manioc (Phenacoccus manihoti Hom. pseudococcidae) en République Populaire du Congo, 1. Cycle évolutif. Agron. Trop. XXXVI, 1, 82-89.

- FEDER W.A. et ARK P.A. :
1951 : Wilting inducing polysaccharides derived from crown gall bean blight and soft rot bacteria. Phytopathology, 41 : 804-808.

- FERREOL L. :
1978 : Multiplication végétative et élimination de la mosaïque du manioc par thermothérapie sur les plantes cultivées in vitro. In Diseases of tropical crops. Proceedings of an International Symposium, Louvain La Neuve, Belgium, 1978, pp. 285-295.

- FLIC E.C., EVANS D.A. :
1982 : Evaluation of cytoplasmic segregation in somatic hybrids of Nicotiana : tentoxin sensitivity. J. Hered. 73 : 264-266.

- FOWKE L.C., RENNIE P.J., KIRKPATRICK J.W., CONSTABLE F. :
1975 : Ultrastructural characteristics of intergenetic protoplast fusion.
Can. J. Bot. 53 : 272-278.

- FREY K.J., BROWNING J.A. and SIMONS M.D. :
1977 : Management systems for host genes to control diseases loss.
Ann. of the N.Y. Academy of Sci., 287 : 255-261.

- FUKUNAGA Y., NAGATA T., MATSUI C., TAKEBE I. :
1982 : Liposome mediated delivery of foreign nucleic acids into plant protoplasts.
Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture
Edit. by FUJIWARA, Tokyo, 1982, pp. 667-668.

- GALBRAITH D., HARKINS K. :
1982 : Cell sorting as a means for isolating somatic hybrids.
Proc. 5th Intl. Cong. Plant. Tissue and Cell culture
Edit. by FUJIWARA, Tokyo, 1982, pp. 617-618.

- GALUN E., BLEICHMAN S., AVIV D. :
1982 : Development of an organelle-genetic system by unilateral transfer of organelles through protoplast fusion and cybrid formation.
Proc. 5th Intl. Cong. Plant. Tissue and Cell Culture. Edit. by FUJIWARA, Tokyo, 1982, pp. 645-646.

- GARIBALDI A; et BATEMAN D.F. :
1971 : Pectic enzymes produced by *Erwinia chrysanthemi* and their effects on plant tissue.
Physiol. Plant. Patho. 1 : 25-40.

- GAUTHERET R.J. :
1959 : La culture des tissus végétaux. Techniques et réalisation.
Edition Masson et Cie, Paris, 1959, 863 pages.

- GENGENBACH B.G. et GREEN C.E. :
1975 : Selection of T. cytoplasm maize callus culture resistant to *helminthosporium maydis* race T pathotoxin.
Crop Science, 15 : 645-649.

- GENGENBACH B.G., GREEN C.E. and DOOVAN C.M. :
1977 : Inheritance of selected pathotoxin resistance in maize plants regenerated from cell cultures.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74 (11), 5113-5117.

- GILES K.L. :
1978 : The uptake of organelles and microorganisms by plant protoplasts : old ideas but new horizons. In *Frontiers of tissue culture*. Edit. by T.A. THORPE Proceedings of the 4th International Congress of plant tissue and cell culture, Canada, 1978, pp. 67-73.

- GLEBA Y.Y., HOFFMAN F. :
1980 : Arabido brassica : a novel plant obtained by protoplast fusion.
Planta, 149 : 112-117.

- GLEDDIE S., KELLER W.A., SETTERFIELD G., WETTER L.R. :
1983 : Somatic hybridization between *Nicotiana rustica* and *N. glauca*.
Plant. Cell Tissue Organ Culture 2 : 269-283.

- GLIMELIUS K. :
1982 : Studies of the cytoplasmic inheritance in hybrids and cybrids obtained after protoplast fusion.
Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture
Edit. by FUJIWARA, Tokyo, 1982, pp. 651-652.

- GLIMELIUS K., BONNETT H.T. :
1981 : Somatic hybridization in *Nicotiana glauca*. Restoration of photoautotrophy to an albino mutant with defective plastids.
Planta, 153 : 497-503.

- GLIMELIUS K., CHEN K., BONNETT H.T. :
1981 : Somatic hybridization in *Nicotiana glauca*. Segregation of organellar traits among hybrid and cybrid plants.
Planta, 153 : 504-510.

- GONZALES J.J.D., LOPEZ R.C.I. :
1973 : Estudio cromosómico en yuca (*M. esculenta* Crantz).
Thesis Agr. Eng. Medellin. Univ. Nac. de Colombia
Facul. de Ciencias Agrícolas, 1973, 50 p.

- GOODMAN R.N., HUANG J.S. and HUANG P.Y. :
1974 : Host specific phytotoxin polysaccharide from apple tissue infected by *Erwinia amylovora*.
Science, 183 : 1081-1082.

- GOODMAN R.N., PI-YU HUANG J.S. and THAI-PANICH V; :
1977 : Induced resistance to bacterial infection. In
Biochemistry and cytology of plant parasite
interaction.
Edit. by TOMIYAMA K., DALY J.M., URITANI I.,
OKU H. et OUCHI S., 1977, pp. 35-42.

- GOSCH G., BAJAJ Y.P.S. and REINERT J. :
1975a: Isolation, culture and fusion studies protoplast
from different species.
Protoplasma 85 : 327-336.

- GOSCH G., BAJAJ Y.P.S. and REINERT J. :
1975b: Isolation, culture and induction of embryogenesis
in protoplasts from cell suspensions of *Atropa
belladonna*.
Protoplasma, 86 (4), 405-410.

- GRACE M.A. :
1978 : Traitement du manioc.
FAO, Rome, 1978, 163 pages.

- GRACEN V.E., FORSTER M.J., SAYRE K.D., GROGAN C.O. :
1971 : Rapid method for selecting resistant plants for
control of southern corn leaf blight.
Plant. Dis. Reporter, 55 (6), 649-670.

- GRANITI A. :
1972 : The evolution of the toxin concept in plant patho-
logy. In Phytotoxins in plant disease. Proceedings
of NATO advanced study institute. Puguchiuso,
Italy, june 1970, pp. 272-288.

- GRAMBOW H.J., KAO K.N., MILLER R.A. and GAMBORG O.L. :
1972 : Cell division and plant development from proto-
plasts of carrot cell suspension culture.
Planta, 103 : 348-355.

- GREEN C.E. :
1977 : Prospects for crop improvment in the field of cell
culture.
Hort. Sci. 12 : 131-134.

- GRUN P. and CHU L.J. :
1978 : Development of plants from protoplasts of *solanum
(solanaceae)*.
Amer. J. Bot. 65 (5), 538-543.

- GUNN R. and SHEPARD J.F. :
1981 : Regeneration of plant from mesophyll derived protoplasts of british potato (*solanum tuberosum* L) cultivars.
Plant Science Letters, 22 : 97-101.

- HAHN S.K. :
1978 : Selection du manioc pour la résistance à la bactériose. In la bactériose du manioc en Afrique : le passé, le présent, l'avenir.
Compte-rendu du Séminaire Interdisciplinaire tenu à l'IITA Ibadan, Nigéria, 1978, pp. 36-39.

- HAHN S.K., HOWLAND A.K., TERRY E.R. :
1973 : Cassava breeding at IITA.
Ibadan, Nigéria, IITA, 1973, 46 p.

- HALPERIN W. :
1966 : Alternative morphogenetic events in cell suspensions.
Am. J. Botany 53 (5), 443-453.

- HEDRICK P.W. :
1978 : Genetic variation in a heterogeneous environment. VI. A possible experimental system.
The Journal of Heredity, 69 : 135-136.

- HEINSTEN P. :
1982 : Effect of *Verticillium dabbiliae* on *Gossypium arboreum* cell suspension culture.
Proc. 5th Intl. Cong. Plant. Tissue and cell culture. Edit. by FUJIWARA, Tokyo, 1982, pp. 675-676.

- HEITEFUSS R. :
1981 : Basic research on host parasite interaction - a way for future control measures of plant diseases ?
Communication présentée au Coll. Intern. sur la Protection des Cultures Tropicales, Lyon (France), 1981, 9 pages.

- HERRERA-ESTRELLA L.;, DEPICKER A., MONTAGU M.V., SCHELL J. :
1983 : Expression of chimaeric gene tranfered into plant cell using a Ti-plasmid vector.
Nature, 309 : 209-213.

- HO W.J., VASIL I.K. :
1983 : Somatic embryogenesis in Sugar cane (*Saccharum officinarum* L) : growth and plant regeneration from embryogenic cell suspension culture.
Ann. Bot. 51 : 719-726.

- HODGSON R., PETERSON W.H., RIKER A.J. :
1949 : The toxicity of polysaccharides and other large molecules to tomato cuttings.
Phytopathology, 39 : 47-62.

- HOFFMAN F., ADACHI T. :
1981 : Arabido brassica : chromosomal recombination and morphogenesis in assymetric intergeneric hybrid cells.
Planta, 153 : 586-593.

- HONNET B. :
1980 : Isolated plant protoplasts in genetics and plant breeding.
Theor. Appli. Genet., 56 : 90.

- HORINO O. :
1977 : Induction of bacterial leaf blight resistance by incompatible strain of xanthomonas orizae in rice.
in Biochemistry and cytology of plant parasite interaction.
Edit. by TOMIYAMA K., DALY J.M., URITANI I., OKU H. and OUCHI S., Tokyo, 1977, pp. 43-55.

- HSU S.T., GOODMAN R.N. :
1978 : Production of a host specific wilt inducing toxin in apple cell suspension cultures inoculated with *Erwinia amylovora*.
Phytopath. 68 (3), 351-354.

- HUANG P.Y., HUANG J.S. and GOODMAN R.N. :
1975 : Resistance, mechanisms of apple shoots to an avirulent strain of *Erwinia amylovora*.
Physiol. Plant. Pathol. 6 : 286-287.

- IMANISHI S., HIURA J. :
1982 : Culture of leaf protoplast in the genus of *Lycopersicum*.
Proc. 5th Intl. Cong. Plant. Tissue and cell culture
Edit. by FUJIWARA, Tokyo, 1982, pp. 589-590.

- IKOTUM T. :
1976 : Survival of xanthomonas manihotis, the cassava bacterial blight pathogen.
In Cassava bacterial blight. Report of a interdisciplinary workshop held at IITA Ibadan, Nigeria, 1-4 november 1976, 24-27.

- IZHAR S., POWER J.B. :
1979 : Somatic hybridization in Petunia : a male sterile cytoplasmic hybrid.
Plant Science Letters, 14 : 49-55.

- JENNINGS D.L. :
1972 : Breeding for resistance to cassava viruses in East Africa, Nigeria IITA, 1972, PP. 40-42.

- JIA J.F., POTRYKUS I. :
1981 : Mesophyll protoplasts from Solanum melongena var depressum Bailey regenerate to fertile plants.
Plant Cell Reports, 1 : 71-72.

- KAISER W.J. and TEEMBA L.R. :
1979 : Use of tissue culture and thermotherapy to free East African cassava cultivars of African cassava mosaic and cassava brown streak disease.
Plant Diseases Reporter 63 (9), 780-784.

- KAMEYA T. :
1982 : The method for fusion with dextran.
Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture
Edit. by FUJIWARA, Tokyo, 1982, pp. 613-614.

- KAMEYA T., UCHIMIYA H. :
1972 : Embryoïds derived from isolated protoplasts of carrots.
Planta, 103 : 356-360.

- KAMEYA T., HORN M.E., WIDHOLM J.M. :
1982 : Hybrid shoot formation from fused Daucus carota and Daucus capillifolius protoplasts.
Z. Pflangenphysiol., Bd 104 : 459-466.

- KAO K.N. :
1977 : Chromosomal behaviour in somatic hybrids of soybean. Nicotiana glauca.
Mol. Gen. Genet., 150 : 225-230.

- KAO K.N., CONSTABEL F., MICHAYLUK and GAMBORG O.L. :
1974 : Plant protoplast fusion and growth of intergeneric hybrid cells.
Planta, 120 (3), 215-227.

- KAO K.N. and MICHAYLUK M.R. :
1974 : A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplast.
Planta, 115 : 355-367.

- KAO K.N. and MICHAYLUK M.R. :
1975 : Nutritional requirement for growth of Vicia Hajas-tana cells and protoplasts at a very low population density in liquid media.
Planta, 126 : 105-110.

- KARTHA K.K., GAMBORG O.L., CONSTABEL F. and SHYLUK J.P. :
1974 : Regeneration of cassava plants from apical meristem.
Plant Science Letters, 2 : 107-113.

- KARTHA K.K., MICHAYLUK M.R., KAO K.N., GAMBORG O.L. and CONSTABLE F. :
1974 : Callus formation and plant regeneration from mesophyll protoplasts of rape plants (Brassica napus Lov zephyr).
Plant. Science Letters, 3 : 265-271.

- KARTHA K.K. and GAMBORG O.L. :
1975 : Elimination of cassava mosaic disease by meristem.
Physiopathology, 65 : 826-828.

- KARTHA K.K. and GAMBORG O.L. :
1978 : Meristem culture technique in production of disease free plant and freeze preservation of germ plasm of tropical tuber crops and grain legum.
In Diseases of tropical crops. Proceedings of an International symposium, Louvain la Neuve, Belgium 1978, pp. 267-283.

- KELLER W.A., MELCHERS G. :
1973 : The effects of high pH and calcium on tobacco leaf protoplast fusion.
Z. Naturforsch 28 : 737-741.

- KELLER W.A., HARVEY B.L., KAD K.N., MILLER R.A. and GAMBORG O.L. :
1973 : Determination of the frequency of interspecific protoplast fusion by differential staining.
In Protoplastes et fusion de cellules somatiques végétales, CNRS Paris, 1973, pp. 456-463.

- KHODER M., VILLEMUR P. et JONARD R. :
1981 : La multiplication végétale de l'espèce florale *Begonia elatior* (cv Rieger) à partir de différents organes cultivés in vitro.
C.R. Acad. Sci. Paris, t. 293, série III, pp. 403-408.

- KOCH L. :
1954 : Cassaveselectie.
Wagessingen H. Veeneman and zonen, 1954, 71 p.

- KOHOMOTO H., KHAN I.D., RENBUTSU Y., TANIUCHI T., NISHIMURA S. :
1976 : Multiple host-specific toxins of *Alternaria mali* and their effect on the permeability of host cells.
Physiol. Plant. Pathol., 8 : 141-143.

- KOOL A.J., BOVEMBERG W.A., KUMAR A.;, COCKING E.C. :
1982 : Analysis of chloroplasts segregation in interspecific somatic hybrids of *Petunia*.
Proc. 5th Intl. Cong. Plant. Tissue and Cell Cultur
Edit. by FUJIWARA, 1982, pp. 653-654.

- KRUMBIEL G. et SCHIEDER O. :
1979 : Selection of somatic hybrids after fusion of protoplast from *Datura innoxia* Mill and *Atropa belladonna* L.
Planta, 145 : 371-375.

- LIU M.C. :
1975 : The in vitro induction of callus and regeneration of cassava plant from shoot apical meristem.
Taiwan sugar, 1975, pp. 171-177.

- LIU M.C. and CHEN W.H. :
1977 : Genetic modification of sugar cane and cassava cells through protoplast and other culture.
Taiwan sugar, 1977, 24 (2), 304-311.

- LIU M.C. and CHEN W.H. :
1978 : Organogenesis and chromosome number in callus derived from cassava anthers.
Taiwan sugar Res. Inst. Taiwan 700, Taiwan Can. J. Botany, 1978, 56 (10), 1287-1290.

- LORZ H., LARKIN P.J., THOMSON J., SCOWCROFT W.R. :
1983 : Improved protoplast culture and agarose media.
Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2 : 217-226.

- LOUSBERG J.J.Ch., SALEMINK C.A. :
1970 : The chemistry of polysaccharide and glycopeptide phytotoxin.
In Phytotoxins in plant diseases. Proceedings of NATO advanced study Institute Pugnochiuso, Italy June 1970, 127-137.

- LOZANO J.C. and WHOLEY D.C.W. :
1974 : The production of bacteria free planting stock of cassava world crops, 1974, 26 (3), 115-117.

- LU C.Y., VASIL I.K. :
1982 : Somatic embryogenesis and plant regeneration from freely suspended cells and cell groups of *Panicum maximum* Jacq.
Ann. Bot. 48 : 543-548.

- LU C.Y., DAVEY M.R., PENTAL D., COCKING E.C. :
1982 : Forage legume protoplasts : somatic embryogenesis from protoplasts of seedling cotyledons and root of *Medicago sativa*.
Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell culture. Edit. by FUJIWARA, Tokyo, 1982, pp. 597-598.

- LU C.Y., DAVEY M.R., COCKING E.C. :
1982 : Somatic embryogenesis from mesophyll protoplasts of *Trigonella corniculata* (Leguminosae).
Plant Cell Reports, 1 : 278-280.

- LUKE H.H. and WHEELER H.E. :
1955 : Toxin production by *Helminthosporium victoriae*.
Physiopathology, 45 : 453-458.

- LUTZ A. :
1976 : Etude des aptitudes morphogénétiques des cultures de tissus. Analyse par la méthode des clones d'origine uni cellulaire.
Revue Générale, 1976, 19 (9), 309-319.

- MABANZA J. :
1979a: La sélection et l'amélioration du manioc au cours des années 1976, 77 et 78.
Centre de Recherches Agronomiques de Loudima (CRAL) 1979, 16 pages.

- MABANZA J. :
1979b: Performances du manioc du Nigeria (IITA) introduit sous forme de semences.
Centre de Recherches Agronomiques de Loudima, 1979, 11 p.

- MABANZA J. :
1980a: La sélection du manioc pour la résistance à la bactériose au Congo.
In Plantes, racines tropicales : stratégie de recherches pour les années 80. C. R. du 1er Symposium Trien. SIPRT Direction Afrique, Ibadan 1980, pp. 43-44.

- MABANZA J. :
1980b: Essai d'isolement des clones de manioc (*Manihot esculenta* Crantz) en vue d'isoler ultérieurement des clones résistants à la bactériose.
DEA Agronomie Phytotechnie - USTL Montpellier, 1980, 61 pages.

- MABANZA J., JONARD R. :
1981 : La multiplication des clones du manioc (*Manihot esculenta* Crantz) à partir d'apex isolés in vitro.
C.R. Acad. Sci. Paris t. 292, série III, pp. 839-842.

- MABANZA J. :
1982 : Essai d'isolement à partir de protoplastes de clones de manioc (*Manihot esculenta* Crantz) en vue d'induire une résistance à la bactériose.
Thèse de Docteur-ingénieur présentée à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, déc. 1982.

- MABANZA J., JONARD R. :
1983a: L'isolement et le développement in vitro des protoplastes de manioc (*Manihot esculenta* Crantz).
C.R. Soc. Biol. 1983, 177 : 638-645.

- MABANZA J., JONARD R. :
1983b: La régénération des plantes de manioc (*Manihot esculenta* Crantz) par néoformation de bourgeons à partir de cotylédons extraits de semences mûres et immatures.
Soc. Bot. de France, sous presse.

- MABANZA J., JONARD R. :
1984 : Sur l'isolement et le développement in vitro des protoplastes de *Manihot glaziovii* Muell.
C.R. Acad. Sci. sous presse.

- MABANZA J., MEYER Y. :
1984 : La division par bourgeonnement et la division par clivage chez les protoplastes de manioc.
En préparation.

- MADJIDI E.H. :
1980 : Contribution à l'étude des enzymes pectinolytiques produits par des bactéries appartenant aux genres *Pseudomonas* et *Erwinia*.
Mémoire pour l'obtention du diplôme de l'ORSTOM, Laboratoire de la Chaire de Pathologie Végétale de l'INA, P.G., 1980, 20 pages.

- MAGOON M.L. :
1970 : Problems and prospects in the genetic improvement of cassava in India.
Trop. Root and Tub. Crops Tomorrow Honolulu University of Hawaiï, 1970, 1 : 58-61.

- MAGOON M., JOS J.S., APPAN S.G. :
1966 : Cytomorphology of the interspecific hybrid between cassava and ceara rubber.
Chromosome Information service, 7 : 8-9.

- MAGOON M., KRISHNAN R., BAI V.K. :
1971 : Chromosomal differentiations between cassava and ceara rubber.
Tropical Root and Tuber Crops Newsletter, 4 : 23-25.

- MAMPOUYA P.C. :
1983 : Analyse à l'aide des techniques de microgreffage in vitro des mécanismes de l'incomptabilité au greffage, induite par un viroïde, l'exocortis chez les espèces fruitières du genre citrus.
Thèse de 3e cycle Sciences Agronomiques Opt. Phyto-technie, USTL, 1983, 112 p.

- MEEKS J.C., MALMBERG R.L., WOLK C.P. :
1978 : Uptake of Auxotrophic cells of a heterocyst forming cyanobacterium by tobacco protoplasts and the fate of their association.
Planta, 139 : 55-60.

- MELCHERS G., SACRISTAN M.D., HOLDER A.A. :
1978 : Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts.
Carlsberg Res. Commun. 43 : 203-218.

- MENZEL L, NAGY F., KISS Z.R., MALIGA P. :
1981 : Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrid of *Nicotiana tabacum* + *Nicotiana glauca* : correlation of resistance to *Nicotiana glauca* plastid.
Theor. Appl. Genet. 59 : 194-195.

- MEYER Y. :
1981 : Le premier cycle mitotique des protoplastes de mésophylle de feuille de tabac : ses relations avec la régénération de la paroi et sa régulation hormonale.
Thèse de Doctorat d'Etat, présentée à l'Université de Perpignan, pour obtenir le grade de Docteur es-sciences naturelles., déc. 1981, 139 pages.

- MEYER Y. and COOKE R. :
1979 : Time course of hormonal control of the first mitosis in tobacco mesophyll protoplast cultivated in vitro.
Planta, 147 : 181-185.

- MEYER Y. and CHARTIER Y. :
1981 : Hormonal control of mitotic development in tobacco protoplasts.
Plant. Physiol. 68 : 1273-1278.

- MILFONT Jr W.N. :
1978 : Prospects of cassava fuel alcohol in Brazil.
In Cassava Harvesting and processing proceedings of a workshop held at CIAT Cali, Columbia, 24-28 april 1978, pp. 46-48.

- MIURA L., TAKATSU A., TERNES M. :
1980 : Resistance of cassava to *Xanthomonas manihotis*, inoculated at the stem tips with toothpicks in Itagai low valley, Santa Catarina.
Review of plant pathology, 59 : 7.

- MOGILNER I., ORIOLI C.A. and PROTUGUEZ A.J.P. :
1967 : Influence de la intensidad luminica en el crecimiento "in vitro" de apices radicales de manioca.
Bonplandia, 1967, 2 (6), 107-112.

- MOH C.L. :
1975 : Induction of anther callus in cassava tropical root and tuber crops.
Newsletter, 8 : 5-7.

- MORGAN A., COCKING E.C. :
1982 : Plant regeneration from protoplasts of *Lycopersicon esculenta* Mill.
Z. Pflanzenphysiol. Bd 106 : 97-104.

- MOUNT M.S., BATEMAN D.E. and BASHAM H.G. :
1970 : Induction of electrolyte loss, tissue maceration and cellular death of potato tissue by an endopolygalacturonate trans eliminase.
Phytopathology, 60 : 924-931.

- MULHBACH J.P., AKAMACHO HENRIQUE et SANGER J.L. :
1977 : Isolation and properties of protoplastes from leaves of healthy and viroid infected tomato plant.
Plant Science Letters, 8 : 183-189.

- MUIR S.M. :
1970 : The control of growth by the synthesis of I.A.A. and its conjugation.
Proceedings of the 7th International Conference on Plant growth substances Canberra, Australie, 1970, pp. 96-101.

- MULLEN J.M. and BATEMAN D.F. :
1971 : Production of an endopolygalacturonate transeliminase by potato dry rot pathogen *Fusarium roseum*, *Avenaceum* in culture an diseased tissue.
Physiol. Plant. Pathol. 1 : 363-373.

- MULLER J.F., MISSONNIER C., CABOCHE M. :
1983 : Low density growth of cell derived from *Nicotiana* and *Petunia* protoplasts : influence of the source of protoplasts and comparison of the growth promoting activity of various auxins.
Physiol. Plant., 57 : 35-41.

- MURASHIGE T. :
1974 : Plant propagation through tissue cultures.
Ann. Rev. Plant. Physiol. 25 : 135-166.

- MURASHIGE T. and SKOOG F. :
1962 : A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue culture.
Physiol. Plant. 15 : 473-497.

- MUSSEL U.H.W. :
1973 : Endopolygalacturonase evidence for involvement in verticillium wilt of cotton.
Phytopathology, 63 : 62-70.

- NAEF-ROTH S. :
1970 : Production and bioassay of phytotoxins in Phytotoxins in plant diseases.
Proceedings of the NATO advanced study Institute Pugnochiuso, Italy, june 1970, pp. 48-69.

- NAGATA T. and TAKEBE I. :
1970 : Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyll protoplasts.
Planta, 92 : 301-308.

- NAGATA T. and TAKEBE I. :
1971 : Plating of isolated tobacco mesophyll protoplast on agar medium.
Planta, 99 : 12-20.

- NAGY F., TOROK J., MALIGA P. :
1981 : Extensive rearrangements in mitochondrial DNA in somatic hybrids of *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana glauca*.
Mol. Gen. Genet. 183 : 437-439.

- NAIR N.G., KARTHA K.K. and GAMBORG O.L. :
1979 : Effect of growth regulators on plant regeneration from shoot apical meristem of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and on the culture of internode in vitro.
Z. Pflanzenphysiol. 95 (5), 51-56.

- NAKATA K., OSHIMA H. :
1982 : Cytoplasmic chimaericity in the somatic hybrids of tobacco.
Proc. 5th Intl Cong. Plant Tissue and Cell culture, Edit. by FUJIWARA, Tokyo, 1982, pp.641-642.

- NARAYANASWAMY :
1977 : Regeneration of plants from tissue culture. In Applied and fundamental aspects of plant cell tissue and organ culture.
Ed. by Reinert (J) and Bajaj (YPS), Berlin, 1977, pp. 179-204.

- NEGRUTIU I and MULLER J.F. :
1981 : Culture condition of protoplasts derived cells of *Nicotiana glauca* for mutant selection.
Plant Cell Reports, 1 : 14-17.

- NICHOLS R.F.W. :
1947 : Breeding cassava for virus resistance.
East African Agricultural Journal, 12 (3), 184-194.

- NICKELL L.G. et TORREY J.G. :
1969 : Crop improvement through plant cell and tissue culture.
Science, 166 : 1068-1069.

- NIIZEKI M. :
1974 : Studies on plant cell and tissue culture. Effect of different kinds of media on the variations of chromosome number in tobacco callus and regenerated plant.
Reprinted from the Journal of the Faculty of Agriculture Hokkaido University, 54 (4), 356-367.

- NORTH COTE :
1963 : The biology and chemistry of cell walls of higher plant algae and fungi.
Intern. Rev. Cytol. 14 : 223-263.

- NOVAK F.J. :
1979 : Phenotype and cytological status of plant regenerated from callus cultures of allium sativum L.
Z. Pflanzenphysiol. 84 : 250-260.

- NOZERON R. et BANCILHON L. :
1972 : Les cultures in vitro en tant que technique pour l'approche de problèmes posés par l'amélioration des plantes.
Ann. Amel. des Plantes, 22 (2), 167-185.

- O'HARA J.F., HENSHAW G.G. :
1982 : The preparation of protoplasts from potato and related solanum species.
Proc. 5th Intl. Cong. Plant. Tissue and Cell Culture. Ed. by FUJIWARA, Tokyo, 1982, pp. 591-592.

- PARKE D. :
1978 : Tissue culture of cassava on chemically defined media.
Physiol. Plant. 42 : 195-201.

- PATIL S.S., TAM L.Q., KOLATTUKUDI P.E. :
1970 : Isolation and mode of action of the toxin from Pseudomonas phaseolicola.
In Phytotoxins in plant diseases. Proceedings of the NATO advanced study Institute, Pugnochiuso, Italy, june 1970, pp. 365-372.

- PENTAL D., HAMILL J.D., COOPER-BLAND S., COCKING E.C.,
MULLER A.J. :
1982 : Somatic hybridization studies with initiate reduc-
tase deficient *Nicotiana tabacum* mutant.
Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture
Edit. by FUJIWARA, Tokyo, 1982, pp. 649-650.

- PERREAUX D., MARAITE H., MEYER J.A. :
1982 : Identification of 3-methylthiopropionic acid as
a blight-inducing toxin produced by *Xanthomonas*
campestris pathovar *manihotis* in vitro.
Physiol. Plant. Pathol. 20 : 313-319.

- PERSLEY G.J. :
1978 : Etudes sur l'épidémiologie et l'écologie de la
bactériose du manioc.
In La bactériose du manioc en Afrique, IITA, Ibadan,
Nigeria, juin 1978, pp. 5-8.

- PERSON C., GROTH J.V. and MYLYK O.M. :
1976 : Genetic change in host parasite population.
Ann. Rev. Phytopath. pp. 177-188.

- POTRYKUS I. :
1971 : Intra and interspecific fusion of protoplasts from
petal of *Toreinia bailloni* and *Torenia fournieri*.
Nature New Biology, 231 : 51-58.

- POTRYKUS I. :
1973 : Transplantation of chloroplasts into protoplasts
of petunia.
Z. Pflanzenphysiol. 70 : 364-366.

- POTRYKUS I., POWER J.B., FREARSON E.M., MAYWARD C.,
GEORGE D., EVANS P.K., BERRY S.F. and COCKING E.C. :
1976 : Somatic hybridation of *Petunia hybrida* and *P.*
parodii.
Nature, 263 : 500-502.

- PRABUDESAI V.R. and NARAYANASWAMY :
1975 : A tissue culture from tapioca.
Plant Science Letters, 4 (4), 237-241.

- PRINGLE R.B., and BRAUN A.C. :
1957 : The isolation of the toxin of *Helminthosporium vic-*
toriae.
Phytopathology, 7 : 369-371.

- PRINGLE R.B. and SCHEFFER R.P. :
1963 : Purification of the selective toxin of *Pericornia circinata*.
Phytopathology, 53 : 785-787.

- PRINGLE R.B. and SCHEFFER R.P. :
1967 : Multiple host specific toxins from *Pericornia circinata*.
Phytopathology, 55 : 530-532.

- PRINGLE R.B. and SCHEFFER R.P. :
1967 : Isolation of the host specific toxin and related substance with non specific toxicity from *Helminthosporium carbonum*.
Phytopathology, 57 : 1169-1172.

- PURSEGLOVE J.W. :
1977 : *Tropical crops : Dicotyledon*.
Longman - London, 1977, 719 pages.

- PYNNAERT L. :
1951 : *Maladies et ennemis du manioc*.
In *Le Manioc*, Bruxelles, Direction de l'Agriculture
Ministère des Colonies, Royaume de Belgique, pp.
61-79.

- RAI P.V. :
1978 : Toxins produced by a virulent and a weakly virulent strain of *Xanthomonas orizae*.
Indian Phytopathology, 31 (1), 60-64.

- RAI P.V. et STROBEL G.A. :
1969 : Phytotoxic glycopeptide produced by *corynebacterium michiganense* - I. Methods of preparation, physical and chemical characterization.
Phytopathology, 59 : 47-52.

- RAI P.V. et STROBEL G.A. :
1969 : Phytotoxic glycopeptides produced by *corynebacterium michiganense*. II. Biological properties.
Phytopathology, 59 : 53-57.

- RAMANUJA RAO J.V., MEHTA U., MAHAN RAM M.Y. :
1982 : Whole plant regeneration from cotyledonary protoplasts of *Crotalaria Juncea*.
Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture
Edit. by FUJIWARA, Tokyo, 1982, pp. 595-596.

- REINERT J. :
1973 : Aspects of nuclear division and cell wall formation in protoplasts of different origin.
In Colloq. Intern. CNRS Versailles, Ed. de l'INRA Paris, 1973, pp. 273-279.

- ROGERS D.J.A. et MILNER M. :
1963 : Amino acid profile of manioc leaf protein in relation to nutritive value.
Economic Botany, 17 : 211-216.

- RUDOLPH K., WARICK R.P. :
1968 : The effect of toxin of *Pseudomonas phaseolicola* on tissue cultures of bean (*Phaseolus vulgaris*).
Phytopathology, 58 : 106 .

- SAKAI F., SHOHARA Y. :
1982 : Transfection of turnip protoplasts by cauliflower mosaic virus DNA.
Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture. Edit. by FUJIWARA, Tokyo, 1982, pp. 669-670.

- SAXENA P.K., GILL R., RASHID A., MAHESHWARI S.C. :
1982 : Plant Cell Report, 1 : 219-220.

- SCHAEFFER G.W. :
1981 : Mutation and cell selections : increased protein from regenerated rice tissue cultures.
Env. Exp. Bot. 21 (34), 333-345.

- SCHEFFER R.P., NELSON R.R. and PRINGLE R.B. :
1964 : Toxin production and pathogenicity in *Helminthosporium victoriae*.
Phytopathology, 54 : 602-603.

- SCHEFFER R.P., ULLSTRUP A.J. :
1965 : A host specific toxic metabolite from *Helminthosporium carbonum*.
Phytopathology, 55 : 1037-1038.

- SCHENK R.U. and HILDEBRANDT A.C. :
1968 : Somatic hybridization : a new approach to genetic change.
American J. Botany, 55 : 731.

- SHEPARD J.F. and TOTTON R.E. :
1977 : Mesophyll cell protoplasts of potato. Isolation, proliferation and plant regeneration.
Plant Physiol. 60 : 313-316.

- SHEPARD J.F., BIDNEY D., SHAHIN E. :
1980 : Potato protoplasts in crop improvement.
Science, 208 : 17-24.

- SHEPARD J.F., BIDNEY D., BARSBY J., KEMBLE R. :
1983 : Genetic transfert in plant through interspecific protoplasts fusion.
Science, 219 : 683-688.

- SHU S.T., GOODMAN R.N. :
1978 : Production of a host-specific, wilt inducing toxin in Apple cell suspension cultures inoculated with *Erwinia amylovora*.
Phytopath. 68 : 351-354.

- SIBI M., BRANCHARD M. :
1982 : Les variants peuvent-ils être orientés ?
In : les cultures végétales in vitro : réalités, agricoles et industrielles. Edit. A. PRIA, coll. Paris, 1982, pp. 27-52.

- SILVESTRE P., ARRAUDEAU M. :
1983 : Le manioc.
Ed. Maisonneuve et Larose et ACCT, 264 pages.

- SINK K.C. and POWER J.B. :
1977 : The isolation, culture and regeneration of leaf protoplasts of *petunia parviflora juss.*
Plant Science Letters, 10 : 335-340.

- SINK K.C., NIEDZ R.P. :
1982 : Factors controlling plating efficiency in tomato.
Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture
Edit. by FUJIWARA, Tokyo, 1982, pp. 583-584.

- SKIRVIN R.M. :
1977 : Natural and induced variation in tissue culture.
Euphytica 27 : 241-266.

- SONDAHL M.R. and SHARP W.R. :
1977 : High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of coffee arabica L.
Pflanzenphysiol. 81 : 391-408.

- STAMP J.A., HENSHAW G.G. :
1981 : Somatic embryogenesis in cassava.
Pflanzenphysiol. 105 (2), 183-187.

- STEINER G.W. and BYTHER R.S. :
1971 : Partial characterization and use of host specific toxin from helminthosporium sacchari in sugar cane
Phytopathology, 61 : 691-695.

- STEPHENS G.J., WOOD R.K.B.) :
1975 : Killing of protoplasts by soft rot bacteria.
Physiol. Plant. Pathol. 5 : 165-181.

- STERN H. :
1966 : The regulation of cell division.
Ann. Rev. Plant. Physiol. 17 : 345-378.

- STOREY H.H., DOUGHTY L.R. :
1951 : Virus diseases of cassava.
In East African Agriculture and Forestry Research Organisation, annual report; 1952, pp. 26-28.

- STROBEL G.A. :
1974 : Phytotoxins produced by plant parasites.
Ann. Rev. Plant. Physiology, 25 : 541-566.

- TABAEIZADEH Z. :
1983 : Etude d'accroissement de la variabilité nucléaire et cytoplasmique chez Lycopersicum Mill par hybridation somatique intergénérique et interspécifique. Thèse de Docteur-Ingénieur, soutenue à l'Université de Paris-Sud, Orsay, 1983, 119 p.

- TERRY E.R. :
1978 : Lutte intégrée contre la bactériose du manioc en Afrique. In la bactériose du manioc en Afrique : le passé, le présent, l'avenir.
Compte-rendu du Séminaire Interdisciplinaire IITA, Ibadan, Nigeria, 1978, pp. 36-39.

- THOMAS E. :
1981 : Plant regeneration from shoot culture derived protoplasts of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* CV Marii Bard).
Plant Science Letters, 23 : 81-88.

- TILQUIN J.P. :
1978 : Regeneration et multiplication du manioc par culture d'entre-nœuds et de calcs.
In Diseases of tropical crops. Proceedings of an International Symposium. Louvain La Neuve, Belgique 1978, pp. 297-306.

- UMANAH E.E., HARTMANN R.W. :
1973 : Chromosome numbers and Karyotypes of some *Manihot* species.
Journal of the American Society for Horticultural Sciences 98, (3), 272-273.

- UPADHYA M.D. :
1975 : Isolation and culture of mesophyll protoplasts of potato (*Solanum tuberosum* M).
Potato Research, 18 : 438-445.

- VARDI A., SPIEGEL-ROY P., BEN AYYIM G., GALUN E. :
1982 : Protoplast derived plants and fusion experiments in different citrus species.
Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture. Edit. by FUJIWARA, Tokyo, 1982, pp. 619-620.

- VASIL V., VASIL I.K. :
1980 : Isolation and culture of cereal protoplasts.
Theor. Appl. Genet. 56 : 97-99.

- VASIL V., VASIL I.K. :
1981 : Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension culture of pearl millet (*Pennisetum americanum*).
Ann. Bot. 47 : 669-678.

- VASIL V., VASIL I.K. :
1982 : Characterization of embryogenic cell suspension cultures derived from cultured inflorescences of *Pennisetum americanum* (pearl millet).
Amer. J. Bot. 69, 1441-1449.

- VASIL V.;, WANG D.Y., VASIL I.K. :
1983 : Plant regeneration from protoplasts of napier grass
(Pennisetum purpureum schum).
Z. Pflanzenphysiol. 111 : 233-239.

- VERHOEK-KOHLER B., HAMPP R., ZIEGLER H., ZIMMERMANN U :
1983 : Electrofusion of mesophyll protoplasts of *Avena sativa*.
Planta, 158 : 199-204.

- WALLIN A., GLIMELIUS K, ERIKSON J. :
1979 : Formation of hybrid by transfert of nuclei via
fusion of miniprotoplasts from cell lines of
nitrate reductase deficient tobacco.
Z. Pflanzenphysiol., 91 : 89-94.

- WALLIN A., SAVAGE R. :
1982 : A method for selection of heterokaryons from pro-
ducts of induced plant protoplasts fusions.
Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Cul-
ture. Edit. by FUJIWARA, Tokyo, 1982, pp. 621-622.

- WALSH J. :
1981 : Germplasm ressources are losing ground.
Science, 214 : 421-423.

- WAREING P.F.;, PHILLIPS ID.J. :
1975 : The control of growth and differenciation in plants
Pergamon International Library, 1975, 303 pages.

- WENZEL C.;, SCHIEDER O., PRZEWOZNY T.;, SOPORY S.K.,
MELCHERS G. :
1979 : Comparison of single cell culture derived solanum
tuberosum L. plants and a model for their applica-
tion in breeding programm.
Theor. and Appl. Genetics 55 : 49-55.

- WHEELER H. :
1976 : The role of phytotoxins in specificity.
In Specificity in Plant diseases, Edit. by WOOD
and GRANITY, New York, 1976, pp. 217-235.

- WHEELER H. and LUKE H.H. :
1963 : Microbial toxins in plant disease.
Ann. Rev. Microbiol. 17 : 223-242.

- WIDHOLM J.M. :
1974 : Cultured carrot cell mutants : 5-methyltryptophan-resistance trait carried from cell to plants and back.
Plant Science Letters 3 : 323-330.

- WIDHOLM J.M. .
1982 : Selection of protoplast fusion hybrids.
Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture
Edit. by FUJIWARA, Tokyo, 1982, pp. 609-610.

- WIEHE P.O. and DOWSON W.J. :
1953 : A bacterial disease of cassava (*Manihot utilissima*) in Nyasaland.
Empire Journal of Experimental Agriculture, 21 (82) 141-143.

- WULLENS G.J., MOLENDIJK L., SCHILPERORT R.A. :
1980 : The expression of tumor markers in intraspecific somatic hybride of normal and crown Gall cells from *Nicotiana tabacum*.
Theor. Appl. Genet. 56 : 203-208.

- YODER O.C. :
1973 : A selective toxin produced by *Phyllosticta maydis*
Physiopathology, 63 : 1361-1366.

- ZELCER A. et GALUN E. :
1976 : Culture of newly isolated tobacco protoplast : precursor incorporation into RNA and DNA.
Plant Science Letters, 7 : 331-336.

- ZELCER A;, AVIv D., GALUN E. :
1978 : Interspecific transfer of cytoplasmic male sterility by fusion between protoplasts normal *Nicotiana sylvestris* and X Ray irradiated protoplasts of male sterile *N. tabacum*.
flanzenphysiol. 90 (5), 397-407.

VII - ANNEXES

ANNEXE 1

Criblage des cultivars locaux vis-à-vis de la bactériose provoquée par *Xanthomonas manihotis*, année agricole 1976-77.

TABLEAU XIII : Collection de Loudima : zone à très faible pression de maladie ; nombre total de cultivars : 65

NOTE	NOMBRE DE CULTIVARS	%
0	22	33
1	14	21
2	15	23
3	7	11
4	7	11
5	0	0

Les appréciations sont effectuées sur une échelle construite de 0 à 5 (0 = attaque nulle ou négligeable, 1 = attaque très faible ; 2 = attaque faible ; 3 = attaque moyenne ; 4 = attaque forte ; 5 = attaque sévère).

TABLEAU XIV : Collection de Mbé : zone à très forte pression de maladie

NOTE	NOMBRE DE CULTIVARS	%
0	0	0
1	2	5
2	3	7
3	18	44
4	18	44
5	0	0

Le tableau XIII indique que la zone de Loudima n'a pas subi une forte pression de maladie en 1976. 33 % de cultivars n'ont montré aucun symptôme de bactériose.

Le tableau XIV montre que tous les cultivars de cette collection portent des signes de bactériose ; cependant, 12 % d'entre eux ne sont que légèrement attaqués. Au niveau de cette collection, ces notes ne vont pas évoluer au cours des 3 années successives. On peut donc constater que les cultivars locaux présentent une différence de sensibilité aux attaques de *Xanthomonas manihotis* : 12 % sont faiblement attaqués, seuls 44 % ont subi des attaques fortes.

ANNEXE 2

TABLEAU X.V : Production de quelques cultivars de manioc
à Loudima, année 1976-77

DESIGNATION DU CULTIVAR	RENDEMENT en t/ha	POIDS MOYEN DES TUBERCULES (en kg)	% MS DE LA PULPE	ATTAQUE BACTERIOSE
Dzibi	63,3	0,82	28,84	3
Pierre Bambi	58,6	0,55	32,22	2
Invoutoulou 2	52,0	0,88	25,81	1
Ngoubou-Ngoubou 2	51,8	0,58	39,74	1
Mamamba 3	49,5	0,73	35,10	0
Kindoundou	49,3	0,48	36,50	0
Moupioro	47,8	0,68	41,70	0
Ngono 2	46,9	0,60	37,71	2
Ngono 2	46,0	0,59	35,66	2
Muzanga	45,7	0,54	36,13	0
Kinsidi 2	43,6	0,72	41,75	2
Invoutoulou 1	42,0	0,51	38,90	0
Zanaga 1	41,5	0,63	33,11	1
Mussiele	38,8	0,71	33,66	2
Kissantou	37,3	0,78	35,16	2
Kinsangoula	36,0	0,48	34,18	4
Mamamba 1	35,6	0,51	34,09	3
Mamamba 4	34,1	0,51	8,63	0
MM 78	34,0	0,57	30,65	0
Kinsidi 1	32,4	0,51	34,00	3
Komono 2	32,3	0,52	30,59	2
Yama	32	0,33	36,89	0
Invoutoulou 4	32	0,58	34,14	1
Kinsidi des Bembes	31,6	0,79	31,69	4
Biembama	31,2	0,15	35,00	0
Mundele Maakou 74	30,7	0,37	28,34	4
Loboyo	30,7	0,54	31,71	1

Chaque cultivar est multiplié sur une parcelle de 3 m x 15 m. Les pieds sont espacés de 1 m les uns des autres (10 000 pieds/ha). La récolte est réalisée à 12 mois sur 10 pieds de la ligne du milieu en éliminant les pieds de tête. Le pourcentage de matière sèche (M.S.) a été calculé à cette date. L'attaque de bactériose a été appréciée 8 mois après la plantation. Notons que le cycle normal de récolte à Loudima est de 18 mois.

ANNEXE 3

TABLEAU XVI : Production de quelques cultivars locaux de manioc à Mbé, année 76-77 ; zone de forte pression de maladie

DESIGNATION DU CULTIVAR	RENDEMENT EN t/ha	POIDS MOYEN DES TUBERCULES	ATTAQUE DE BACTERIOSE
Poumako	82,8	1,32	3
MM 78	44,0	0,67	3
Impfouba	43,5	0,97	2
Ntsilou	34,4	0,54	3
Zanaga 2	30,5	0,64	3
Kopana	30,3	0,35	3
Ontsaon	30,1	0,94	3

Les récoltes sont effectuées à 12 mois alors que le cycle normal de récolte est situé à 14 mois dans cette zone. L'attaque de bactériose est appréciée 6 mois après plantation.

Sur 41 cultivars que comptait la collection de Mbé, 17 % ont fourni un rendement de plus de 30 t/ha, malgré une attaque de bactériose notée à 3 en général.

ANNEXE 4

Production de manioc au Congo

Tableau XVII : Production du matériel végétal local et du matériel végétal introduit, année 1978-79 à la collection de Loudima.

DESIGNATION DU CULTIVAR	ORIGINE	RENDEMENT EN T/ Ha
Ngono 2	Congo	41,1
Invoutoulou 2	Congo	39,8
H 54 684	Madagascar	38,7
Moudoumou	Congo	36,4
Kataoli	Togo	36,2
Ma 255	Semence IITA	35,0
Dzibi	Congo	34,5
Ma 86	Semence IITA	33,5
Biembama	Congo	33,2
Sete	Congo	32,7
Bayene	Congo	30,4
Ma 575	Semence IITA	30,2
Ma 34	Semence IITA	30,0

En 1978-79, la collection de Loudima est composée de 70 % de cultivars locaux, de 23 % du matériel introduit de l'IITA (sous forme de semences) et de 7 % d'origines diverses.

Cette année, 13 clônes ont produit plus de 30 t/ha.

Ainsi, bien qu'attaqués par la bactériose, les cultivars locaux sont bien adaptés et peuvent encore fournir une production non négligeable, si on les compare au matériel végétal introduit.

SUD COPIE
SARL

37 bis. av. de la Justice - 34100 Montpellier - Tél. (67) 41.23.63

RESUME :

A partir des cultivars de manioc sélectionnés au Congo, on étudie par la culture *in vitro* des protoplastes des différentes possibilités d'induction d'une résistance à la bactériose provoquée par *Xanthomonas manihotis* en utilisant deux techniques : l'accoutumance des protoplastes à la toxine de *Xanthomonas manihotis*, la manihocine, et la fusion des protoplastes entre deux espèces, *Manihot esculenta* Crantz sensible et *Manihot glaziovii* Muell. résistante à la maladie. En analysant les mécanismes de prolifération des protoplastes, bourgeonnement et clivage, on étudie également les possibilités de régénération de plantes entières de manioc à partir de leurs protoplastes isolés *in vitro*.

MOTS CLES : *Manihot esculenta* Crantz, *Manihot glaziovii* Muell, culture *in vitro*, protoplastes, prolifération par bourgeonnement et clivage, *Xanthomonas manihotis* manihocine, milieu sélectif, hybridation somatique, régénération de plantes