

## Culture *in vitro* et multiplication rapide de plantes à tubercules et racines au Cameroun

Simon Zok, Anne E. Sama, Léopold Nyochembeng, James Tabi Tambong, Xavier Ndzana, Joseph-Gabriel Wutoh

Les plantes à tubercules et à racines (manioc, ignames, macabo et patate douce) constituent la base de l'alimentation des populations du Cameroun. Consommées sous diverses formes, elles constituent la principale source de calories dans plusieurs régions du pays. Les contraintes majeures à l'expansion de ces cultures sont les parasites et la rareté du matériel de plantation de bonne qualité. Le Cameroun ne dispose pas d'institutions spécialisées dans la multiplication des semences de plantes à tubercules en suffisance pour répondre aux besoins des paysans qui, dans le système traditionnel, produisent eux-mêmes un matériel de plantation de qualité médiocre et en quantité insuffisante. Le mode de propagation végétative favorise par ailleurs la transmission des maladies et des ravageurs d'une culture à une autre [1].

Dans le cas de l'igname (*Dioscorea* spp.), le paysan plante de petits tubercules entiers ou des fragments de gros tubercules, pesant de 100 à 600 grammes, ce qui représente environ 20 à 30 % du poids de la récolte [2] et plus de 30 à 50 % des coûts de production. Pour le macabo (*Xanthosoma sagittifolium*), cultivé dans toute la partie sud du Cameroun, la propagation se fait par les rejets prélevés sur le pied-mère ou par les tubercules, entiers ou découpés, méthode

lente et onéreuse. La pourriture racinaire, due à *Pythium myriotylum* [3], constitue aussi un réel obstacle à l'expansion de la culture du macabo, dont la production nationale est passée de 1,8 million de tonnes à 800 000 tonnes entre 1975 et 1984 [4]. Certaines pratiques culturales réduisent les effets de la maladie, mais la solution à long terme réside dans la création d'un hybride résistant à multiplier afin d'être distribué aux paysans. Le manioc (*Manihot esculenta*) fait face aux mêmes contraintes de production. Les variétés locales sont peu productives et très sensibles aux maladies, dont la plus importante est la mosaïque africaine du manioc, responsable de pertes pouvant parfois atteindre 90 % de la récolte. La production de boutures est très faible (dans les conditions traditionnelles, un pied de manioc produit environ 10 à 15 boutures), d'où la rareté du matériel de plantation pour une production à grande échelle. Face à l'inefficacité des méthodes traditionnelles, les techniques de culture *in vitro* peuvent améliorer l'état phytosanitaire tout en assurant une diffusion accélérée du matériel végétal [5]. Cet article présente les principaux résultats d'assainissement et de multiplication rapide de semences (rejets, boutures, tubercules-semences) d'igname, de macabo et de manioc.

1,5 centimètre d'igname prélevées sur la tige, qui constituaient un handicap dans la culture *in vitro*, ont été réduits de 80 à 4 % par une double désinfection à l'hypochlorite de calcium (8 %, puis 6 %). Un taux de régénération de plantes d'ignames atteignant 80 % est obtenu sur les milieux de base MBI enrichis en cytokinine (2 mg/l kinétine) et en auxine (2 mg/l acide indolylacétique) (tableau 1). L'induction de pousses multiples nécessite l'apport au milieu de base de cytokinines, la plus efficace étant la kinétine (5-10 mg/l), associée ou non à une auxine (tableau 1). Dans ces conditions, une seule bouture nodale produit en deux mois plus de 10 pousses secondaires qui, après élongation, peuvent être découpées chacune en 4 microboutures, 6 à 8 semaines plus tard (soit un coefficient de multiplication de l'ordre de 40, largement supérieur à celui de 3 microboutures par mois obtenu antérieurement chez la même espèce) [6]. L'enracinement des jeunes pousses et le sevrage des vitroplants d'igname ne posent pas de problèmes particuliers : avec des substrats horticoles ordinaires (terre fine ou mélange 1 : 1 terre fine et sable fin), des taux de reprise supérieurs à 95 % ont été obtenus après sevrage des vitroplants. Les essais préliminaires au champ montrent que le poids et la taille du tubercule récolté sont fortement influencés par le poids et la taille du microtubercule semence. Par culture *in vitro* (tableau 2), il est théoriquement possible de produire, à partir d'un seul tubercule de *Dioscorea rotundata*, plus de 96 000 vitroplantules au bout d'un an. D'autres auteurs obtiennent 109 000 vitroplan-

S. Zok, A.E. Sama, L. Nyochembeng, J.T. Tambong, X. Ndzana, J.G. Wutoh ; Jay P. Johnson Biotechnology Laboratory, Institut de la Recherche Agronomique, PMB 25 Buea, Cameroun.

Tirés à part : S. Zok

### L'igname (*Dioscorea rotundata*)

Les taux de contaminations bactériennes et fongiques des boutures nodales de 1 à



tules en un an [7] et 65 000 vitroplantules en six mois [8] chez la même espèce. Après sevrage et acclimatation sur un substrat horticole, les vitroplantules peuvent produire autant de microtubercules de 50 grammes à la fin de la deuxième année, lesquels plantés en champ produiront environ 96 000 semenceaux de 300 à 500 grammes permettant de planter 96 hectares d'igname un an plus tard. Dans le même temps, on obtiendrait 256 semences par la méthode traditionnelle et 900 par la technique des mini-fragments. La méthode mise au point chez *Dioscorea rotundata* a été appliquée avec succès chez *D. esculenta* et *D. alata*.

## Le macabo (*Xanthosoma sagittifolium*)

Pour la micropropagation du macabo, le milieu de base liquide MB2 est constitué des macro et micro-éléments B5 [9] dépourvus d'hormone végétale (tableau 1). Ce milieu fournit un taux de régénération des vitroplantules de 80 à 90 % à partir de culture *in vitro* de méristèmes et d'apex (terminal ou axillaire). L'induction de pousses secondaires à partir du bourgeon initial s'effectue sur le milieu MI2 (tableau 1). Avec une moyenne de 50 pousses secondaires par apex initial au bout de 2 mois de culture, on obtient théoriquement 6 000 000 de pousses après 4 cycles de repiquage *in vitro* (tableau 3). L'enracinement des jeunes pousses se produit sur milieu sans hormone.

La culture *in vitro* des bourgeons axillaires (qui restent dormants et inutilisés en conditions traditionnelles sur un rhizome de macabo) présente un taux de multiplication très élevé (un seul de ces rhizomes porte environ 800 à 1 000 bourgeons). Après prélèvement, traitement à l'hypochlorite de calcium à 10 % pendant 10 minutes et mise en culture sur le milieu B5, ces bourgeons débourent et produisent autant de vitroplants. Les repiquages successifs, effectués à intervalles réguliers sur milieu d'induction de pousses multiples, fourniraient, théoriquement, plusieurs milliers de plantules dans des délais courts. Toutefois, la technique de désinfection des bourgeons du rhizome devrait être améliorée, les taux de contaminations bacté-

Tableau 1

### Milieux de culture utilisés pour la culture *in vitro* d'igname, de macabo et de manioc

Espèces	Milieux de culture
Igname	<b>1) Milieu de base (MB1)</b> : macro et micro-éléments MS ; 30 g/l de saccharose ; 0,1 mg/l de thiamine-HCl ; 8 g/l d'agar <b>2) Milieu d'induction de pousses (MI1)</b> : MB1 ; 5 ou 10 mg/l de kinétine ; 2 mg/l d'acide indolacétique (AIA)
Macabo	<b>1) Milieu de base (MB2)</b> : macro et micro-éléments B5 ; 30 g/l de saccharose <b>2) Milieu d'induction de pousses (MI2)</b> : MB2 + 0,1 mg/l de benzylaminopurine (BAP) ou MB2 + 1-1,5 mg/l de kinétine
Manioc	<b>Milieu M3</b> : macro et micro-éléments MS ; 30 g/l de saccharose ; vitamine B5 ; 0,05 mg/l d'acide naphthalène acétique ; 0,5 mg/l de BAP ; 8 g/l d'agar

### Media used for *in vitro* culture of yam, cocoyam and cassava

Tableau 2

### Rendement théorique de la multiplication *in vitro* de l'igname

Durée	Milieu de culture	Matériel obtenu
1 <sup>er</sup> mois	Substrat : sciure de bois	1 tubercule d'igname germe et donne 15 boutures nodales (explants) de 1 à 1,5 cm chacune
2 <sup>e</sup> mois	MI1	15 boutures produisant chacune 10 pousses donnent 150 pousses feuillées qui, après élongation, portent chacune 4 nœuds en moyenne, soit 600 microboutures
4 <sup>e</sup> au 12 <sup>e</sup> mois, avec repiquage tous les 2 mois	MB1 + 2 mg/l AIA + 2 mg/l kinétine	600 microboutures donnent finalement 153 600 microboutures
12 <sup>e</sup> mois		153 600 microboutures donnent 153 600 pousses à raciner et acclimater en serre avec 37 % de pertes, soit un total de 96 768 vitroplantules à partir d'un tubercule initial

### Theoretical yield for yam *in vitro* multiplication

Tableau 3

### Rendement théorique de la multiplication *in vitro* du macabo à partir de bourgeons axillaires

Cycles	Milieu de culture	Matériel obtenu
1 <sup>er</sup> au 2 <sup>e</sup> mois	Milieu de base MB2, puis milieu d'induction de pousses MI2	1 apex donne 50 pousses secondaires
2 <sup>e</sup> au 10 <sup>e</sup> mois, avec repiquage tous les 2 mois	MI2	50 pousses secondaires donnent 50 pousses chacune, soit 2 500 pousses fournissant finalement 6 250 000 pousses à raciner et acclimater, avec 5 % de pertes, soit un total théorique de 5 937 500 microplantules à partir d'un apex initial

### Theoretical yield for cocoyam *in vitro* multiplication from axillary buds



riennes et fongiques (20 à 30 %) demeurant très supérieurs à ceux des bourgeons axillaires.

La transplantation en serre des vitroplants de macabo se fait dans des pots ou des sachets en plastique préalablement remplis d'un substrat horticole. Des taux de reprise de 100 % ont été obtenus en utilisant la parche de café, plus efficace que tous les autres substrats testés. Plus de 30 000 vitroplants ont été produits au laboratoire et transplantés dans différents sites pour les besoins de l'expérimentation. Au stade actuel, on note chez les vitroplants une tendance à la tubérisation précoce ainsi qu'une production élevée de rejets secondaires constituant une importante source de matériel de plantation.

## Le manioc (*Manihot esculenta*)

Pour le manioc, l'accent a été mis sur la régénération des plants indemnes de maladies à virus et sur le microbouturage des vitroplants. Le milieu M3, composé des éléments minéraux MS enrichis en auxine et cytokinine (tableau 1), a donné les meilleurs résultats, tant lors de l'établissement des cultures initiales de méristèmes, que lors du repiquage des microboutures issues des plantules provenant de la culture de méristèmes. L'indexage virologique est réalisé en serre par inoculation de *Nicotiana benthamiana*. La production en masse du manioc (notamment les clones 8017, 8034 et 8061) a été réalisée avec des taux de multiplication de l'ordre de 80, largement supérieurs à ceux obtenus traditionnellement (10 à 15) (tableau 4). Les plants des clones 8034 et 8061, issus de culture de tissus, ont été plantés au champ à côté de boutures ordinaires de ces clones. Les vitroplants se sont montrés aussi robustes que les pieds-mères dont ils étaient issus, avec un rendement comparable en tubercules et une production moyenne de 40 boutures par plant. Les champs créés avec ce matériel ont fourni environ 400 000 boutures qui ont été distribuées les trois dernières années à des agriculteurs à travers le Cameroun. Quelques cas de réinfections virales ont été observés au champ, mais avec des pertes de rendement réduites par rapport à l'utilisation de matériel infecté [10]. Le risque de recontamination par le virus de la mosaïque peut être limité si le champ

## Summary

### Rapid multiplication of root and tuber crops through tissue culture in Cameroon

S. Zok, A.E. Sama, L. Nyochembeng, J.T. Tambong, X. Ndzana, J.G. Wutoh

*In Cameroon, yam (Dioscorea spp.), cocoyam (Xanthosoma sagittifolium) and cassava (Manihot esculenta) are the most important staple foods. The scarcity and high cost of good quality planting materials and field susceptibility to viral and fungal diseases are major constraints for increased production of these crops. At the Jay P. Johnson Biotechnology Laboratory at Ekona (Cameroon), 8 years of research led to successful mass production of plantlets and field testing of the three crops after acclimatization. Microbial contaminations in yam cultures were drastically reduced from 80% to 4% through double-surface sterilization, using calcium hypochlorite at 8% and 6%, respectively. The establishment medium, made of MS minor and major elements, supplemented with kinetin (2 mg/l) and indolyacetic acid, IAA (2 mg/l), was successfully used to regenerate yam plantlets (Table 1). Multiple shoot formation was induced in all media containing kinetin; a high number of shoots was obtained with concentrations ranging from 5 to 10 mg/l, associated or not with IAA (Table 2). Acclimatization of tissue culture derived plantlets was achieved in various substrates. For yams, about one hundred thousand planting sets can theoretically be produced per year from one tuber. With cocoyam (Table 3), B5 basal medium devoid of growth hormones was the most suitable medium for plantlet regeneration, with success rates ranging from 80 to 90%. With regards to axillary bud proliferation, media containing BAP (0.1 to 1 mg/l) or kinetin (1 to 1.5 mg/l) were the most effective. More than 50 secondary shoots were formed in 2 months from each initial bud, indicating that a combination of this procedure with efficient bud subculturing could theoretically produce about 6,000,000 shoots per year. Through tissue culture, secondary dormant buds on cocoyam rhizomes were used directly as a source of explants, thus enhancing mass multiplication since each rhizome produced 800 to 1,000 buds depending on the age. By aseptic subculturing of multiple buds, a single rhizome can produce thousands of plantlets in 1 year. Acclimatization of developed plantlets was successfully done using inexpensive, locally-available substrates. A combination of topsoil and coffee parchment gave the best plant survival rate, and field transplantation was not problematic. Tissue culture-derived cocoyam plants performed better (in terms of growth and earliness in tuberization), compared to normally propagated plants. Trials with improved cassava clones 8017, 8034 and 8061 (Table 3), were aimed at achieving shoot formation, elongation, and rapid clonal propagation of plantlets from subcultured nodes. Subculturing cassava plantlets developed in MS mineral medium supplemented with 0.05 mg/l naphthalene acetic acid (NAA) and 0.5 mg/l BAP provided a reliable means for rapid multiplication of cassava. This method is routinely used for mass culture of available clones, giving a high multiplication rate of 80, as compared to 10-15 using traditional cassava propagation methods. Field-adapted tissue culture derived cassava showed robust growth, similar to their normal counterparts, and over 400,000 cuttings from tissue culture-derived plants have been distributed yearly to farmers over the past 3 years.*

Cahiers Agricultures 1998 ; 7 : 63-6.

établi avec les plants sains est isolé de tout autre champ et si une inspection régulière est réalisée, afin d'éliminer systématiquement les plants infectés [11].

## Conclusion

Les extrapolations théoriques des résultats obtenus indiquent que la technique

de culture *in vitro* pourrait contribuer à améliorer la productivité des plantes à tubercules et racines dans un pays comme le Cameroun, où la production alimentaire constitue une des priorités essentielles. L'assainissement et la multiplication rapide des plantes à tubercules et racines peuvent être appliqués immédiatement et sont actuellement exploités en vue de la mise au point de prototypes d'unités de production de maté-



**Tableau 4**

**Rendement théorique de la multiplication *in vitro* du manioc sur milieu M3**

Durée	Matériel obtenu
1 <sup>er</sup> au 3 <sup>e</sup> mois	1 méristème donne 1 pousse qui, après élongation, produit une tige à 5 nœuds
3 <sup>e</sup> au 12 <sup>e</sup> mois, avec repiquage tous les 3 mois	5 nœuds donnent 5 pousses portant 5 nœuds chacune, soit 125 nœuds
12 <sup>e</sup> mois	125 nœuds donnent 125 pousses à raciner et acclimater en serre, avec 36 % de pertes, soit 80 vitroplantules à partir d'un méristème initial

**Theoretical yield for cassava *in vitro* multiplication on M3 medium**

riel de plantation (semences de base) pour l'igname, le macabo et le manioc. Néanmoins, certains aspects devraient faire l'objet d'études complémentaires, notamment la conformité variétale des produits et l'absence de dérives génétiques ou phénotypiques, susceptibles d'apparaître au cours des repiquages successifs ■

**Références**

1. Purseglove JW. *Tropical Crops : Monocotyledons*. Vol. I. London : Longmans, 1972 ; 607 p.

2. Onwueme IC. *The tropical tuber crops yams, cassava, sweet potato, cocoyams*. Chichester : John Wiley and Sons Ltd, 1978 ; 234 p.

3. Nzietchueng S. *Le point sur le genre Xanthosoma (macabo) : systématique botanique et ethnobotanique. Proceedings of the 7th Symposium of the International Society of Tropical Root Crops (ISTRC)*. Gosier (Guadeloupe) : 1985 : 85-104.

4. Cameroon National Root Crops Improvement Program. Annual Report, 1988.

5. Murashige T. Plant Propagation through tissue culture. *Ann Rev Plant Physiol* 1974 ; 25 : 135-65.

6. Ng SYC. Virus-free seedyam for international distribution. *Tropical Root and Tuber Crops Bulletin* 1992, IITA Ibadan ; 6 : 6.

7. Cortés-Monllor A, Liu LJ. Tissue culture propagation of yam in Puerto Rico. *J Agriculture Univ Puerto Rico* 1982 ; 65 : 419-28.

8. Chandler FL, Haque SQ. The use of tissue culture in the production of improved yam and sweet potato planting material. In : *Micropropagation of selected root crops, palms, citrus, and ornamental species. Proc. of the FAO/NORWAY Symp. on Plant Tissue Culture Techniques and Utilization*. Rome : FAO Plant Production and Protection Paper, n° 59, 1984 : 69-87.

9. Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 1968 ; 50 : 151-8.

10. Zok S, Sama AE. Comparative study of different generations of tissue culture and non tissue culture derived planting material in relation to African mosaic virus disease. In : *Roots and tubers research project (ROTREP). Technical Report*. Ekona (Buea), Cameroon : Institute of Agronomic Research, 1993 ; 151p.

11. Gnahoua G. La mosaïque africaine du manioc et son contrôle. *La lettre du Réseau manioc de la CORAF* 1989 ; 1 : 6-7.