

**Dossier de candidature à l'inscription sur la Liste d'Aptitude aux
Fonctions de Maître Assistant (LAFMA) du Conseil Africain et
Malgache pour l'Enseignement Supérieur (C.A.M.E.S.)**

01 BP 134 Ouagadougou 01, Burkina Faso – Tél. : (+226) 50 36 81 46 – Fax : (226) 50 36 85 73

E-mail : comes@bf.refer.org Site web : www.lecomes.org

CTS SCIENCES NATURELLES-AGRONOMIE

Publication N° 5

Titre : Etude du comportement de deux variétés de manioc en culture *in vitro* et comparaison de la qualité d'ADN des vitroplants à celle des plantes-mères

Année de publication : 2013

Auteurs : CACAI G.H.T., KUMULUGUI B. S., AHANHANZO C., MAKITA L., SOUZA A. P. DOSSOUKPEVI R., AGBANGLA C.

Nom de la revue scientifique : Journal de la Recherche Scientifique de l'Université de Lomé (Togo)

Série A, Volume : 15, Numéro : 2, Pages 57- 66

ISSN (print): 1727-8651, ISSN 2413-354X (online)



Lien: <http://www.ajol.info/index.php/jrsul/issue/archive>

INDEXATION: AJOL, Google scholar, ResearchBib

ETUDE DU COMPORTEMENT DE DEUX VARIETES DE MANIOC EN CULTURE *IN VITRO* ET COMPARAISON DE LA QUALITE D'ADN DES VITROPLANTS A CELLE DES PLANTES-MERES

CACAI G.H.T.^{1*}, KUMULUGUI B. S.², AHANHANZO C.¹, MAKITA L.²,
SOUZA A. P.², DOSSOUKPEVI R.¹, AGBANGLA C.¹

1- Laboratoire de Génétique et des Biotechnologies, Faculté des Sciences et Techniques (FAST),
Université d'Abomey-Calavi (UAC), 01BP 526 Cotonou, Bénin.

2- Institut Supérieur d'Agronomie et des Biotechnologies(INSAB) Université des Sciences et
Techniques Masuku (USTM, Franceville, Gabon)

* Auteur correspondant, Tel : 00229 95-79-13-83

E-mail : caghat@yahoo.fr

(Reçu le 22 Mars 2013 ; Révisé le 12 Octobre 2013 ; Accepté le 25 Octobre 2013)

RESUME

Les techniques de multiplication peu améliorées du manioc associées aux problèmes de maladies bactériennes et virales participent à la régression de son rendement. Le but de cette étude est d'analyser le comportement de deux variétés de manioc en culture *in vitro* puis l'impact de cette technique sur la qualité de l'ADN des vitroplants. Les explants sont donc cultivés sur quatre milieux ayant pour base le milieu de Murashige et Skoog additionnés d'ANA (Acide α -Naphthalène Acétique) et de la BAP (Benzylaminopurine) suivi de l'extraction de leur ADN. Des deux variétés utilisées, la TMS 30572 a été celle qui répond le mieux aux différents paramètres de croissance. L'analyse moléculaire des ADN totaux des plantes-mères et des vitroplants révèle que la culture *in vitro* n'influence pas le génome du manioc.

Mots clés : Culture *in vitro* ; Biologie moléculaire *Manihot esculenta* ; ANA ; BAP ; ADN.

ABSTRACT

The techniques of multiplication little improved and associated the problems of bacterial and viral diseases take part in the regression of its output. The aim of this study is to analyze the behavior of two varieties of cassava *in vitro* culture then the impact of this technique on the vitroplants DNA quality. The explants are thus cultivated on four media having for base Murashige and Skoog combined with NAA (Naphthalene Acetic Acid) and BAP (Benzylaminopurine) follow-up with the extraction of their DNA. Of the two varieties used, the TMS 30572 was that which answers best the various parameters of growth. The molecular analysis of the DNA totals of the plant-mothers and the vitroplants reveals us that *the in vitro* culture did not influence the genome of *Manihot esculenta*.

Keywords: *In vitro* culture, molecular biology, *Manihot esculenta*, ANA, BAP, DNA,

1- INTRODUCTION

Le manioc (*Manihot esculenta* Crantz), est une plante herbacée à racines tubéreuses, amylacées et à tige noueuse. Il est adopté à l'origine comme une nourriture de réserve pour les temps de famine car il constituait une source alimentaire plus fiable pendant les

périodes de sécheresse et de famine, s'est récemment avéré être à la fois un aliment de base et une culture rentable à l'échelle industrielle dans l'économie mondiale (AERNI, 2006). Culture de subsistance à l'origine, le manioc tend à devenir une culture commerciale comme le coton, le café, le palmier à huile, etc., et procure des revenus

substantiels aux producteurs. Plus de 72% de la production des ménages est vendue contre 67% pour le maïs (NWEKE, 1996).

Malgré cette importance, le manioc reste l'une des rares cultures dont les techniques culturales ont connu très peu d'amélioration. Le manioc est une culture à propagation végétative se caractérisant par un faible taux de multiplication. Ainsi, une bouture (25 à 30 cm de longueur) mise en terre donnera quelques dix boutures après douze mois, ce qui correspond à un taux de multiplication de dix. Cette valeur est d'autant plus faible si on la compare à celle du maïs où un épi peut porter environ 300 grains (OTOO, 1990). Dans la plupart des régions, quelques efforts sont entrepris pour préserver les segments de tiges de manioc après la récolte des racines (EKEOKORO et al., 2005). La culture du manioc se trouve-t-elle confrontée à d'autres séries de contraintes telles les maladies virales et bactériennes, les attaques par les ravageurs, les facteurs agronomiques, édaphiques et socio-économiques qui conduisent à une insuffisance de matériels de propagation. Une étude menée par DICKSON (2003) au Nigeria a montré qu'un manque de boutures saines était de loin le problème le plus important des systèmes de production de manioc, suivi des faibles rendements en racines fraîches. Le recours aux techniques de culture *in vitro* pour la production en grande quantité s'avère indispensable pour une régénération normale en plein champ. La propagation des plantes identiques à celle du départ permet de constituer des collections de plantes-mères, des variétés nouvellement introduites, programmer des cultures tout au long de l'année. Elle a fait l'objet de plusieurs publications sur le manioc, l'ocimum, l'igname (AHANHANZO et al., 2008; 2009; 2010) et le bananier (GANDONOU et al., 2012). Cependant quelques inquiétudes se posent quant à la conservation de la quantité et la qualité de l'ADN des plants après culture *in vitro*. Pour les techniques d'initiation (CACAI et al., 2012) de micropropagation (AHNAHANZO et al., 2008); de conservation (MABANZA, 1981) et de sanitation (WASSWA et al., 2010) le milieu de base de MURASHIGE et SKOOG (1962) a

été utilisé. De même les régulateurs de croissance tels que l'ANA; le 2,4-D, la kinétine et la BAP ont été testés aussi bien sur le débourrement que sur l'organogénèse des variétés. Cependant, peu de travaux ont pris en compte les gammes de concentration d'ANA et de BAP. S'appuyant sur les résultats de ces chercheurs, nos travaux visent à optimiser les effets de différentes concentrations d'ANA et de BAP sur la culture *in vitro* de deux variétés de manioc puis identifier l'impact de cette technique sur la qualité de l'ADN sur les dites variétés.

2. MATERIEL ET METHODES

Le matériel végétal utilisé est constitué de deux variétés améliorées de manioc telles que la 92B/0057 et la TMS 30572 dont les boutures sont collectées au Centre de Recherche Agricole Sud basé à Niaouli qui est une structure de l'Institut National de Recherche Agricole du Bénin (INRAB). Les boutures collectées sont désinfectées à l'aide du méthylthiophanate 70% avant d'être mises en pots. Des plantes mères obtenues après la culture dans la serre sont prélevées des microboutures (explants) portant. Les explants sont immergés à l'éthanol 70 pendant 5 minutes puis dans une solution de chlorure mercurique (0,01%) à laquelle on a ajouté quelques gouttes de tween 20 à 10 minutes. Ils sont ensuite soumis à trois rinçages successifs à l'eau distillée stérile sous une hotte à flux laminaire horizontal. Les explants sont ensemencés et mis en culture dans une salle de culture, à une température de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, une photopériode de 12 heures d'éclairage par jour sous une intensité lumineuse de 6000 lux. L'humidité relative de la salle est de 80%.

Les milieux de culture utilisés ont pour base le milieu de Murashige et Skoog noté MS, auquel est ajoutée une combinaison de régulateurs de croissance. Quatre milieux de culture variant par leur concentration en ANA et en BAP sont testés. Le milieu M1 étant un milieu témoin, il est sans régulateur de croissance. Le milieu M2 : MS + $0,01\text{mg l}^{-1}$ (ANA) + $0,05\text{ mg l}^{-1}$ (BAP); le milieu M3 : MS + $0,02\text{ mg l}^{-1}$ (ANA) + $0,1\text{ mg l}^{-1}$ (BAP); M4 : MS + $0,075\text{ mg l}^{-1}$

Etude du comportement de deux variétés de manioc en culture *in vitro* et comparaison de la qualité d'ADN des vitroplants à celle des plantes-mères.

(ANA) + 0,375 mgI⁻¹ (BAP).

Les extractions d'ADN des deux (2) variétés de manioc (plantes-mères et vitroplants de chaque variété) ont été faites. Le protocole utilisé est celui décrit par GAWEL et JARRET (1991) et modifié par AGBANGLA *et al*, (2002) utilisant comme tampon de lyse le MATAB (Mixed Alkyl Trimethyl Ammonium Bromide). 0,2 g de jeunes feuilles de chaque échantillon sont broyées dans 2 mL du tampon Tris-EDTA-Sorbitol dans un mortier. Le broyat recueilli dans un eppendorf est centrifugé à 10.000 tours/min pendant 10 min à 4°C. L'excès du tampon constituant le surnageant est éliminé après centrifugation. Au culot est additionné 750 µL du tampon de lyse MATAB à 4% préchauffé à 65°C. Ce mélange est maintenu au bain marie à la même température (65°C) pendant 1H 30min avec agitation douce par retournement inversion-réversion toutes les 10 minutes. Les échantillons sont après refroidis à la température ambiante et additionné chacun de 750 µL de Chloroforme Iso-Amyle Alcool (CIAA) 24 : 1. Une centrifugation à 10.000 tours/min (photo 15) pendant 15 min à 4°C permet de séparer le mélange contenu dans chaque tube en trois phases. La phase supérieure aqueuse contenant

l'ADN est recueillie dans de nouveaux eppendorfs. A volume égal, l'ADN est précipité avec de l'isopropanol froid (-20°C) et la pelote d'ADN est séchée à l'air libre. La pelote sèche est reprise dans le Tris EDTA (TE). La vérification de la quantité et de la qualité de l'ADN extrait est faite par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%.

L'ADN est amplifiée dans une solution de 25µl constitué de 2,5 µl de tampon ; 3 µl d'ADN ; 1,25 µl de chlorure mercurique (MgCl₂) ; 0,75 µl de dNTP (dinucléotide triphosphate) ; 2,5 µl d'amorces (F, R) et 11,75 µl d'eau ultra pure. L'amplification s'effectue dans un thermocycler (PTC- 100TM Programmable Thermal Controller, MJ Research, Inc). Le thermocycler fait un premier cycle à 92°C pendant 4 min, 34°C pendant 1 min et 72°C pendant 2 min pour la dénaturation, le circuit et la fixation des amorces. Il est ensuite programmé pour 44 cycles à 94°C pendant 1 min, 35°C pendant 1 min et 72°C pendant 2 min. Il est suivi d'une étape finale de 10 min à 72°C. Les produits PCR ainsi obtenus subissent une électrophorèse sur gel d'agarose 2%. Dans notre étude, deux (2) amorces ont été utilisés. La séquence de chaque amorce est consignée dans le tableau I.

Tableau I : Séquence des amorces microsatellites utilisées.

PRIMERS	SEQUENCES	MOTIF
EME 489	F:CAATTGCTACAATGAAGAACG R:CATCGCGTGATTTGGTACAA	TTTC4 + AT5
EME 708	F:AAGACACAAGAAGGGCAATG R:GATCACACTGAACTAAGGCA	(TC)3(AT)3

Les paramètres tels que le nombre de feuilles et le nombre de racines sont relevés chaque semaine de culture et ce, jusqu'à la septième semaine. Par contre, la longueur moyenne de la pousse, est évaluée à la fin de la septième semaine.

Pour les analyses statistiques, le logiciel STATISTICA 6.0 a été utilisé. Une analyse de variance factorielle a été réalisée avec un intervalle de confiance de 95%. Elle a permis de déterminer les moyennes, les probabilités

ainsi que les interactions entre les différents paramètres.

3. RESULTATS

Les résultats relatifs à la phyllogénèse sont présentés sur le graphe de la figure 1. Ces résultats montrent que le nombre de feuilles augmente progressivement de la première semaine (S1) à la septième (S7) indépendamment du milieu et la variété. Ainsi,

sur le milieu témoin (M0), les moyennes les plus élevées de phyllogenèse des variétés 92B/0057 et TMS 30572 sont respectivement (4,9) et (5,5) ; au niveau du milieu M1, elles sont respectivement (2,8) et (4,8) ; pour le milieu M2, (1) et (5,3) et enfin pour le milieu M3, (1,2) et (5). Des deux variétés, la variété TMS 305072 est celle qui présente la moyenne la plus élevée de feuilles et ceci quel que soit le milieu de culture testé.

L'analyse de variance révèle que les facteurs

variété et temps sont très hautement significatifs ($p < 0,001$) et le facteur milieu est très significatif ($p < 0,001$). Par ailleurs, l'effet combiné de la variété et du milieu sur le nombre de feuilles est très hautement significatif ($p < 0,001$), tandis que l'interaction entre la variété et le temps influence moins ($p < 0,001$). Par contre, l'effet combiné des trois variables (variété, milieu et temps) n'influence pas le nombre de feuilles ($p = 0,9$).

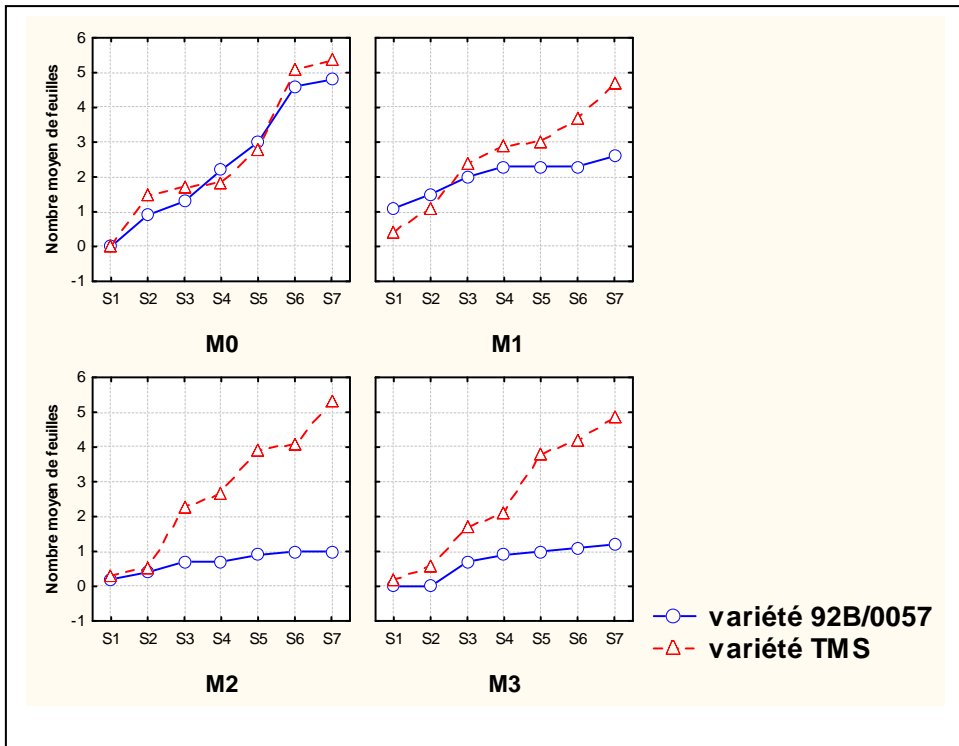


Figure 1 : Effet combiné de variété, milieu et temps sur la phyllogenèse

Les résultats relatifs à la formation des racines sont présentés dans le graphe de la figure 2. Ces résultats montrent que le nombre de racines varie en fonction des différents milieux testés. Ainsi, pour le milieu M0, les moyennes racinaires les plus élevées enregistrées pour les variétés 92B/0057 et TMS 30572 sont respectivement 3,7 et 2,3. Sur le milieu M1, seule la variété TMS 30572 a donné de racines et ce, à partir de la cinquième semaine avec une

moyenne maximale de 1,2 obtenue à la septième semaine. Le milieu M2 présente des résultats peu similaires au milieu M1, où on note également que seule la variété TMS 30572 a donné de racines avec la moyenne la plus élevée (0,3) plus faible que celle du milieu précédent. Par contre, au niveau du milieu M3, aucune des deux variétés n'a donné de racines, leur moyenne est donc nulle.

Etude du comportement de deux variétés de manioc en culture *in vitro* et comparaison de la qualité d'ADN des vitroplants à celle des plantes-mères.

L'analyse de variance révèle que les facteurs milieux et temps sont très hautement significatifs ($p < 0,001$), ainsi que leur interaction ; alors que le facteur variété ne l'est pas ($p = 0,66$). Aussi, l'effet combiné entre la variété et le milieu influence significativement

la rhizogenèse ($p = 0,1$) ; ainsi que celle des trois facteurs (variétés, milieux et temps) ($p = 0,02$). Par contre, l'interaction des variables variétés et temps n'influence pas la rhizogenèse ($p = 0,97$).

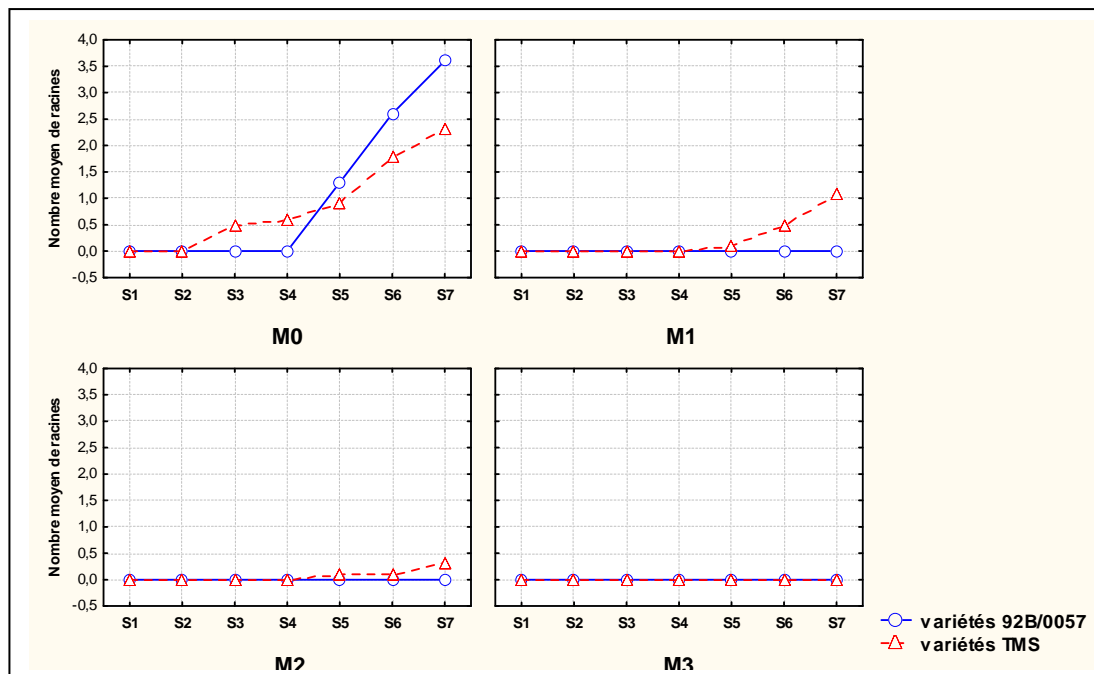


Figure 2 : Effet combiné de variété, milieu et temps sur la Rhizogenèse

3.2 Influence de la culture *in vitro* sur le génome du manioc

Après le broyage du matériel végétal, il a été constaté que les échantillons des vitroplants cultivés sans régulateur de croissance ont présenté par leur coloration vert foncé, beaucoup plus de chlorophylle que les quatre

autres échantillons. Par ailleurs, la pelote d'ADN des plantes-mères est largement beaucoup plus importante que celle des vitroplants. La vérification de l'ADN à travers la migration des différents échantillons sur gel d'agarose à 1% est présentée dans la figure 3.

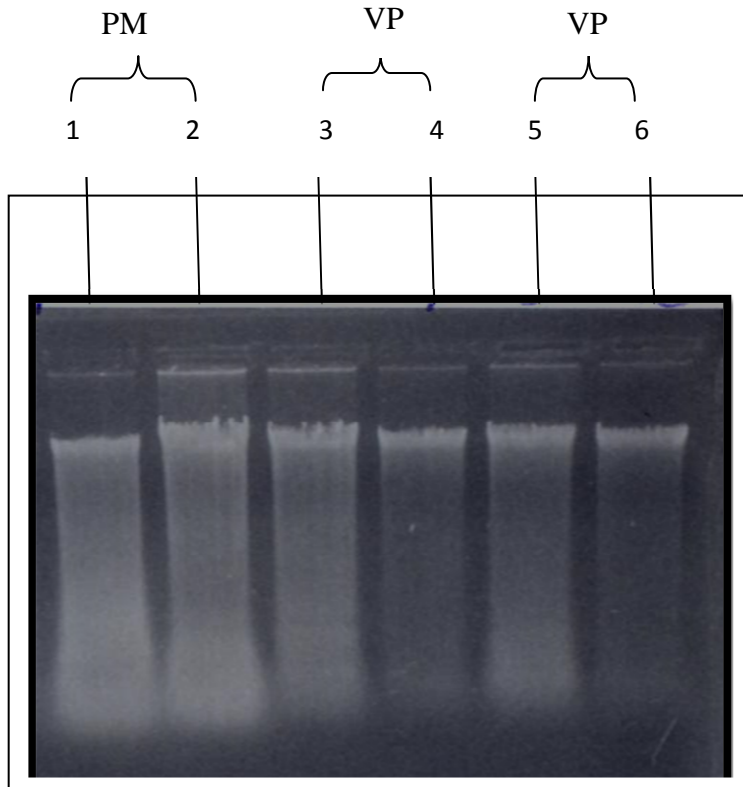


Figure 3: Electrophorégramme montrant la migration de l'ADN total

PM : ADN de Plante-mère (1 : TMS ; 2 : 92B/0057), VP : ADN de Vitroplants (3 et 5 : TMS ; 4 et 6 : 92B/0057)

L'électrophorégramme de la figure 3 montre qu'aussi bien les plantes-mères que les vitroplants ont permis l'extraction d'une bonne quantité et d'une meilleure qualité d'ADN. La concentration en ADN des échantillons est grossièrement évaluée par l'intensité des bandes obtenue. Plus la bande est intense plus l'extrait est concentré en ADN. A l'observation, les échantillons 1 et 2 de la plante-mère des variétés TMS 30572 et 92B/0057 apparaissent plus concentrés que les autres échantillons issus de leur vitroplants respectifs.

L'amplification PCR de l'ADN des différents échantillons (1, 2, 3, 4, 5, 6) de manioc (*Manihot esculenta*. Crantz) par deux

marqueurs microsatellites (SSRs) EME 708 et EME 489 a permis de comparer le génome des vitroplants à celui des plantes-mères. La migration des produits d'amplification sur gel d'agarose à 2%, est présentée par la figure 4. Les bandes obtenues après l'utilisation des deux marqueurs (EME 708) et (EME 489) sont restées identiques aussi bien chez les plantes-mères que le vitroplants. Les résultats obtenus à travers cette amplification montrent que les échantillons ayant migré en présence du marqueur EME 489 ont une taille beaucoup plus petite que ceux du marqueur EME 708, car la distance D2 est grande que la D1. Toutefois, la qualité d'ADN de ces échantillons ne présente aucune différence.

Etude du comportement de deux variétés de manioc en culture *in vitro* et comparaison de la qualité d'ADN des vitroplants à celle des plantes-mères.

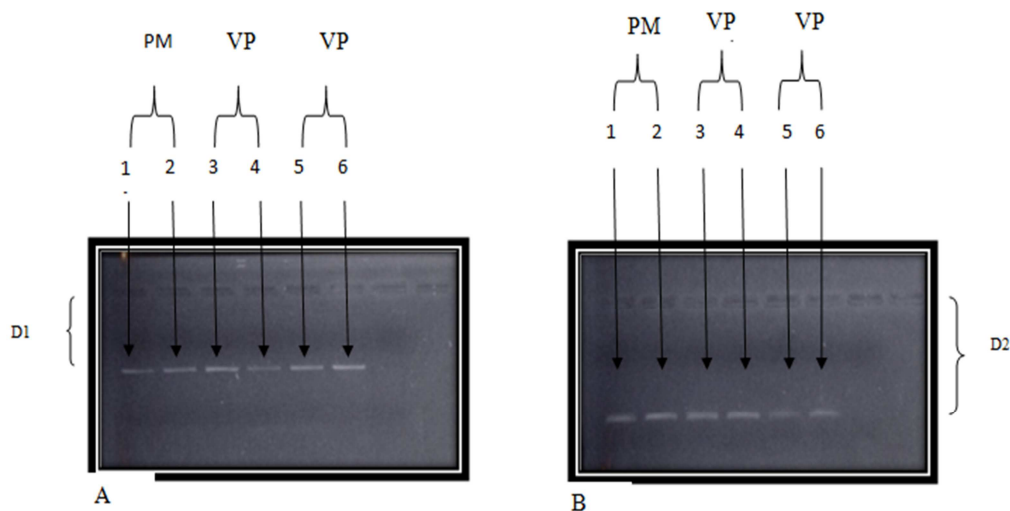


Figure 4 : Electrophorogramme des produits d'amplification avec EME708 (A) et EME489(B)

4. DISCUSSION

Les régulateurs de croissance (BAP et ANA) utilisés dans les différents milieux de culture ont une action significative ($p < 0,001$) sur la formation de feuilles chez les deux variétés testées. Cependant, la comparaison entre les variétés 92B/0057 et TMS 30572 montre que la variété 92B/0057 est la plus sensible à l'action d'auxine et de la cytokinine. Ces résultats confirment ceux obtenus par AHANHANZO *et al.*, (2010) qui ont montré que la BAP a provoqué une augmentation significative du nombre de feuilles chez deux variétés d'ignames. La différence du nombre de feuilles observée entre les deux variétés 92B/0057 et TMS 30572 est similaire à celle observée par MABANZA *et al.*, (1990) qui ont montré que le phyllogénèse et la croissance d'un clone de manioc étaient plus rapide dans le milieu M15 que le milieu M1. Par contre, les résultats présentés par KBIACH *et al.*, (2002) ont montré que la BA (Benzyl-Adénine) appliquée à une dose de $10 \mu\text{M}$ stimule l'induction de plusieurs bourgeons par nœuds avec de petites feuilles alors qu'à plus faible dose de BA, il y a induction d'un bourgeon à un seul nœud avec des feuilles de morphologie normale. De même, les travaux de BENDERRADJI *et al.*,

(2007) ont montré que les combinaisons (Kinétine (3mg l^{-1}); AIB (3mg l^{-1}) et (Kinétine (1mg l^{-1}); AIB (5mg l^{-1})) favorisent nettement l'expression du feuillage sur milieu MS.

Les résultats obtenus au cours de l'étude ont aussi montré que la prolifération des racines et leur développement sont très prononcés dans le milieu M0 (milieu témoin). En effet, ces résultats montrent que le nombre élevé de racines serait lié à l'absence de régulateurs de croissance. Ainsi, un milieu sans régulateur de croissance est avantageux pour la rhizogénèse chez ces variétés de manioc. Les travaux présentés par BENDERRADJI *et al.*, (2007) et AHANHANZO *et al.*, (2009) confirment ces résultats. En effet, selon eux la dilution de moitié du milieu MS dépourvu de régulateurs de croissance est souvent avantageuse pour induire la formation des racines. Aussi, selon KULCHETSCHI *et al.*, (1995) une faible concentration ionique du milieu de base stimule mieux la formation des racines. Cette faible prolifération racinaire peut avoir comme origine l'explant ou la présence dans le milieu de base, des substances chimiques inhibitrices de la morphogénèse. La production de telles substances a été montrée dans la culture *in vitro* de *Allium* spp. et *Daucus* par GRANT *et*

al., (1990). Ces substances chimiques seraient plus excrétées par l'explant en présence d'une forte dose de régulateurs de croissance. Cependant, PELACHO et al., (1991) ont expliqué que l'augmentation de la rhizogenèse pourrait perturber ou retarder la microtubérisation, et que le faible poids des racines favorise la microtubérisation. Notre étude a révélé qu'en absence de régulateurs de croissance, la longueur moyenne de la racine est plus élevée pour la variété 92B/0057, tandis que celle de TMS 30572 est obtenue sur le milieu M1. Ces résultats confirment ceux obtenus par CACAI et al., (2012) sur différentes variétés de manioc qui ont montré que l'allongement de la racine est fonction des différentes combinaisons hormonales et de la variété mise en culture.

La longueur de la pousse s'est beaucoup plus exprimée chez la variété 92B/0057 et sur le milieu M2. Ceci montre que la longueur de la pousse est fonction du milieu de culture et donc des régulateurs de croissance. Ces résultats confirment ceux obtenus par NDOUMOU et al., (2003) sur *Irvingia gabonensis* chez qui on note un accroissement de 3,1 cm à 3,5 cm à partir de 2 ou 3 mg/l de Kinétine.

Par contre, CACAI et al., (2012) ont montré dans ses résultats que les variétés de manioc (Ibadan et Ahouandjan) ont eu une meilleure croissance sur le milieu contenant l'ANA seul. Aussi, selon BRHADDA et al., (2003), le milieu de culture a aussi affecté significativement la longueur des pousses et ceci après deux subcultures successives. KONE et al.,

(2010), quant à eux ont montré que les plantules de grande tailles ont été observées sur les milieux enrichis avec les vitamines MS quel que soit le cultivar et le mode d'éclaircissement.

Par ailleurs, AMMINATO (1984) a fait remarquer que les auxines (AIA, ANA, AIB) utilisées à concentration élevée répriment la croissance de la pousse chez *D. bulbifera*. Les résultats des travaux de MONTCHO (2004) ont montré que la BAP comparée à la Kinétine a donné de meilleurs développements des pousses chez des variétés d'ignames du Bénin.

Selon SALEIL et al., (1990), la composition minérale du milieu joue un rôle non négligeable sur le développement et la multiplication des pousses.

Les résultats relatifs à la conformité du matériel régénéré *in vitro* montrent que le profil électrophorétique des ADN totaux des plantes-mères comparativement à ceux des vitroplants sur gel d'agarose ne montre aucune différence. De même, la migration des produits d'amplification PCR obtenus après l'utilisation de deux marqueurs moléculaires (EME 708 et 489) ne révèle aucun polymorphisme au sein des plantes-mères d'une part et ceux des vitroplants d'autre part. Ainsi, on pourrait affirmer donc que les manipulations *in vitro* n'ont pas une incidence sur leur génome des vitroplants. Ces résultats sont similaires aux résultats des travaux obtenus par AHANHANZO et al., (2009) chez *Ocimum gratissimum*.

REFERENCES

1. AERNI P., 2006. Mobilizing science and technology for development: the case of the Cassava Biotechnology Network. *Ag. Bio. Forum*, 9 (1), 1-14.
2. NWEKE F., 1996. Processing Potential for Cassava Production Growth in Sub-Saharan Africa. Collaborative Study of Cassava in Africa. IITA Ibadan, Nigeria. *COSCA Working Paper No. 11*.
3. AHANHANZO C., AGBANGLA C., AGASSOUNON D.T.M., CACAI G., DRAMANE K., 2008. Etude comparative de l'influence des régulateurs de croissance sur la morphogénèse (in vitro) de quelques variétés de *Manihot esculenta* Crantz. (manioc-euphorbiaceae) du Bénin. *Rev. CAMES, Série A.*, 07, 47-52.

4. AHANHANZO C., DOSSOUKPEVI R., AGASSOUNON DJIKPO TCHIBOZO M., AGBANGLA C., DRAMANE K., 2009. Contribution à l'optimisation des conditions de culture *in vitro* de deux espèces d'*Ocimum spp.* (*Lamiaceae*) et étude de l'influence des manipulations *in vitro* sur la teneur et la qualité de leur acide désoxyribonucléique (ADN). *Rev. CAMES, Série A, Vol 09*.
5. AHANHANZO C., GANDONOU CH., AGBIDINOUCOUN A., DANSI A., AGBANGLA C., 2010. Effects of two cytokinins in combination with acetic acid α -naphthalene on yams (*Discorea spp.*) genotypes response to *in vitro* morphogenesis. *African Journal of Biotechnol.*, 9(51), 8837-8843.
6. AMMIRATO P.V., 1984. Yams. In *Handbook of Plant Cell Culture (vol. 3)*.
7. AMMIRATO PV, EVANS DA, SHARP WR, YAMADA Y. (eds.), *Crop Species Macmillan: New York*, 327-354
8. BENDERRADJI I., BOUZERZOUR H., YKHLEF DJEKOUN A., KELLOU-REPOSE K, 2007. La culture *in vitro* de trois variétés de l'olivier (*olea europaea l.*), 27-32.
9. BRHADDA N., ABOUSALIM A., WALALI L.D.M., 2003. Effets du milieu de culture et de la lumière sur l'embryogenèse somatique de l'olivier (*Olea europaea L.*) cv Picholine marocaine. *Fruit*, 85 (3), 1-14.
10. CACAI G., H., T, AHANHANZO C, DANGOU J., S, HOUEJISSIN S., S, AGBANGLA C., 2012. Effets de différentes combinaisons hormonales sur l'organogenèse *in vitro* de quelques cultivars locaux et variétés améliorées de *Manihot esculenta* Crantz (manioc-*Euphorbiaceae*) cultivées au Bénin. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, 6(4), 1593-1607.
11. DICKSON D., 2003. As part of their joint efforts to form a new trading bloc, Brazil, South Africa and India are increasing their collaboration in science and technology. The potential benefits are significant - provided that other developing countries are not excluded. South-South collaboration picks up steam. *Editorial Science and Development Network*. 17 novembre.
12. EKE-OKORO O.N, EKWE K.C, NWOSU K.I., 2005. Cassava Stem and Root Production: A Practical Manual. *National Root Crops Research Institute (NRCRI) Press, Umudike, Nigeria*, 54 p.
13. GANDONOU C.B., AHANHANZO C., AGBANGLA C., AGBIDINOUCOUN A., DOUSSOH A., CACAI G., DOSSOUKPEVI R., 2012. Micropropagation *in vitro* de la variété « Aloga » du bananier « plantain » (*Musa x paradisiaca L.*) au Bénin. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, 6 (3), 1102-1111.
14. GAWEL NJ, JARRET RL., 1991. A modified CTAB in MATAB: DNA extraction procedure for *Musa* and *Ipomoea*. *Plant. Mol. Rep.*, 9, 262-266.
15. AGBANGLA C., AHANHANZO C., TOSTIN S., DANSI A., DAINOU O., 2002. Evaluation de la diversité génétique par RAPD d'un échantillon de *Dioscorea alta* d'une région du Bénin, la sous préfecture de Savè. *J. Rech. Sci. Uni. Lomé (Togo)*, 6 (1), 197-202.
16. GRANT N.J., HAMMATT H., 1999. "Increasing root and shoot production during micropropagation of cherry and apple root stocks: Effect of subculture frequency". *Tree physiology.*, 19, 899-903.
17. KBIACH M.L., LAMARTI A., ABDALI A., BADOUC A., 2002. Culture *in vitro* des bourgeons axillaires de chêne-liège (*Quercus robur L.*). *Bull. Soe. Pharm. Bordeaux.*, 141, 73-88.
18. KONE T., KONE M., KONE D., KOUAKOU T.H., TRAORE S., KOUADIO Y.J., 2010. Effet de la photopériode et des vitamines sur la micropropagation du bananier plantain (*Musa AAB*) à partir de rejets écailles

- de rang 1. *Journal of Applied Biosciences* 26, 1675-1686
19. KULCHETSCHI L., HARRY L.S., YEUNG E.C., THORPE T.A., 1995. "In vitro regeneration of pacific silver fir (*Abies amabilis*) plantlets and histological analysis of shoot formation". *Tree physiology*, 15, 727-739.
20. MABANZA J. 1990. *Rapport scientifique sur le projet "amélioration des cultivars Africains de manioc". Contrat CEE-DGRST, Brazzaville. CERAG., 2 1-24.*
21. MABANZA J., JONARD R., 1981. La multiplication des clones de manioc (*Manihot esculenta* Crantz) à partir d'apex isolés *in vitro*. *C.R. Acad. Sci. Paris.*, 292, 839-842.
22. MANTELL S.H., HUGO S.A., 1989. effects of photoperiod, mineral medium strength, inorganic ammonium, sucrose and cytokinin on root, shoot and microtuber development in shoot cultures of *Dioscorea alata* L. And *D. bulbifera* L. yams. *Plant cell, tissue and organ culture*, 23-37.
23. MONTCHO D., 2004. Impact des facteurs chimiques sur la multiplication *in vitro* de quelques génotypes d'igname du Bénin. *DEA biotechnologies.*, 42p.
24. MURASHIGE T., SKOOG F. A., 1962. revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. - *Physiol. Plant*, 15(3), 473-497.
25. NDOUMOU D.O., FOSTO OUMAR DUCLAIRE M., 2003. Propagation d'*Irvingia gabonensis* par microbouturage *in vitro*. *Fruits.*, 59(1), 31-38.
26. NG SY., 1990. Culture des tissus. Dans Le manioc en Afrique tropical : un manuel de référence. *IITA & UNICEF*, 51-61.
27. TOKLO M., 2000. Contribution à la micropropagation, la vitromycorhisation et la bactérisation du bananier (*Musa* sp) et de l'igname (*Dioscorea* sp). *Thèse de 3^{ème} cycle pour l'obtention du diplôme d'ingénieur agronome, option: Horticulture, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Complexe d'Agadir, Royaume du Maroc*, 104.
28. OTOO J. A., 1990. Multiplication rapide Le manioc en Afrique tropical. Dans Le manioc en Afrique tropical : un manuel de référence. *IITA & UNICEF*, pp. 39-49.
29. PELACHO A.M., MINGO-CASTEL A. M., 1991. Jasmonic acid induces tuberization of potato stolons cultured *in vitro*. *Plant Physiol.*, 97, 1253-1255.
30. SALEIL V., DEGRAS L., JONARD R., 1990. Obtention des plantes indemnes du virus de la mosaïque de l'igname (YMV) par culture *in vitro* des apex chez l'igname américaine *Dioscorea trifida* L. *Elsevier/INRA*, 10, 605-615.
31. WASSWA P., ALICAI T., MUKASA S.B., 2010. Optimisation of *in vitro* techniques for Cassava brown streak virus elimination from infected cassava clones. *Afr. Crop Sci. J.*, 18(3), 235-241