

EFFET DU CHARBON ACTIF SUR LA CONSERVATION DE LA VARIETE DE MANIOC (*MANIHOT ESCULENTA*) RB 89509 MENACEE D'EXTINCTION AU BENIN.

Adjahossou B. Sédami

Ecole Polytechnique d'Abomey-
Calavi de l'Université d'Abomey-Calavi (Bénin)

Cacai G.

Département de Génétique et des Biotechnologies de la Faculté des Sciences
et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi , Bénin

Dangou S.J.

Koukè Jaurès

Ecole Polytechnique d'Abomey-
Calavi de l'Université d'Abomey-Calavi (Bénin)

Agbangla C.

Département de Génétique et des Biotechnologies de la Faculté des Sciences
et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi(Bénin)

Ahanhanzo C.

Département de Génétique et des Biotechnologies de la Faculté des Sciences
et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi, (Bénin)
Centre Béninois de la Recherche Scientifique et Technique, Bénin, Cotonou

Abstract

In situ conservation of different cultivars of cassava (*Manihot esculenta*) implies many problems such as climatic risks, diseases, devastators and financial difficulties. This work contributes to the maintenance of RB 89509 variety of *Manihot esculenta* through *in vitro* culture. Two cultures media were used: medium of Murashige and Skoog (MS) and medium of Murashige and Skoog (MS) added with activated carbon. The effects of activated carbon were studied on the growth parameters (number of leaves, number of roots, number of nodes, height of stem, length of internodes, length of principal root) of plantlets aged of twenty months. The results show that the average number of leaves, the average number of nodes and the length of main root are more significant at the plantlets present on medium containing the activated carbon; while the number of roots, the height of stem and the length of internodes are more

significant at the plantlets present on medium without activated carbon. Moreover, it is noted an drying of the plantlets on the medium without activated carbon. The activated carbon allowed a better conservation of the plantlets.

Keywords: *Manihot esculenta*, conservation, activated carbon, slowed growth, Bénin.

Résumé

La conservation *in situ* des différents cultivars de manioc (*Manihot esculenta*) pose de nombreux problèmes face aux aléas climatiques, aux maladies, aux ravageurs et aux difficultés financières. Ainsi cette étude a pour objectif d'améliorer la conservation de la variété de manioc RB 89509 à travers sa culture *in vitro*. Deux milieux de culture ont été utilisés : le milieu de Murashige et Skoog (témoin) et le milieu de Murashige et Skoog (MS) additionné de charbon actif. Les effets du charbon actif ont été étudiés sur les paramètres de croissance (nombre de feuilles, nombre de racines, nombre de nœuds, hauteur de la tige, longueur des entre-nœuds, longueur de la racine principale) de 30 (2 x 15) vitroplants âgés de vingt mois. Les résultats montrent que le nombre moyen de feuilles, le nombre moyen de nœuds et la longueur de la racine principale sont plus importants chez les vitroplants présents sur le milieu contenant le charbon actif. Par contre, la longueur des racines, la hauteur de la tige et la longueur des entre-nœuds sont plus importants chez ceux cultivés sur le milieu témoin. De plus, on a noté un vieillissement des vitroplants sur ce milieu. Le charbon actif a permis une meilleure conservation des vitroplants.

Mots-clés: *Manihot esculenta*, conservation, charbon actif, croissance ralentie, Bénin

Introduction

Le manioc (*Manihot esculenta* Crantz), est une plante herbacée à racines tubéreuses, amylacées et à tige noueuse. Il est une plante en C₃ possédant cependant quelques caractéristiques de plante en C₄ (El-sharkawy, 2004), s'adapte à de nombreux climats et présente une bonne résistance à la sécheresse et à l'acidité des sols. Depuis son émergence en Afrique aux XVI^{ème} et XVII^{ème} siècles, cette culture originaire d'Amérique du Sud, a remplacé plusieurs aliments de base et a été intégrée avec succès à de nombreux systèmes agricoles et alimentaires du continent (Vieira da Silva, 1989). Le manioc est adopté à l'origine comme une nourriture de réserve pour les temps de famine et 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 et Bernauer, 2006). La productivité élevée même dans des conditions difficiles, sa disponibilité tout au long de l'année ainsi que sa grande adaptabilité à divers systèmes agricoles et alimentaires font du manioc une culture de choix (Awa et Tumanteh, 2001). Cette culture qui revêt une importance alimentaire et économique au Bénin présente néanmoins quelques problèmes liés à sa production. Ainsi, la multiplication par voie végétative y reste le principal mode de reproduction et pourrait entraîner progressivement sa dégénérescence génétique. Malgré sa rusticité, elle est confrontée à d'autres séries de contraintes comme les maladies virales, fongiques, bactériennes ; les ravageurs et les pratiques culturales rudimentaires qui contribuent au faible rendement de la culture du manioc (Braïma et *al.*, 2000). Du fait de l'évolution grandissante des maladies et ravageurs à partir des années 1970, de nombreux programmes de recherche conduits par Mingui et *al.*, 1992 puis Mabanza & Mingui (1998 a et b) ont permis de réaliser des prospections et des collectes des cultivars locaux de manioc. Mais la mise en collection *in situ* de ces cultivars bien qu'étant coûteuse, pose donc un véritable problème de conservation en raison des attaques parasitaires. Ainsi, trois variétés améliorées (RB 89509, BEN 86052, TMS 30572) plus productives n'ont guère échappé à cette menace (Fagbemissi, 2002). La culture *in vitro* apporte une meilleure solution aux problèmes de conservation et de diffusion du matériel végétal (Withers, 1990; Engelmann, 2010). Ainsi, les techniques de conservation à moyen terme utilisant le charbon actif (Escobar et *al.*, 1995) permettent de maintenir les collections à l'abri des infections. En Afrique, des collections *in vitro* de manioc ont été mises en place au Nigéria, en Côte d'Ivoire et au Congo Brazzaville (Mabanza & Mambou, 2002). Dès lors sous la supervision du Professeur Ahanhanzo Corneille plusieurs travaux de recherches sont réalisés au Bénin et s'inscrivent dans le cadre de production de semences saines de manioc (Ahanhanzo et *al.*, 2008; Cacaï et *al.*, 2012; 2013). Cette étude s'inscrit dans la continuité de ces travaux et vise une conservation *in vitro* de la variété RB 89509 de *Manihot esculenta* en vulgarisation au Bénin. En effet, cette variété améliorée, faible en acide cyanhydrique est utilisée pour la production du gari, du tapioca et de la cossette. Son rendement est de l'ordre de 25 tonnes par hectare (Fagbémissi, 2002).

Il s'est agi spécifiquement d'évaluer l'influence du charbon actif sur la conservation des vitroplants de cette variété de manioc.

Milieu d'étude

Les travaux de la présente étude ont été effectués au Laboratoire de Génétique et des Biotechnologies de la Faculté des Sciences et Techniques (LGB/FAST) à l'Université d'Abomey-Calavi (UAC) située à 16 km environ

au Nord de Cotonou dans la commune d'Abomey-Calavi (2° 20'30.''1 ; 6° 24' 56'') en République du Bénin.

Matériel et méthodes

Matériel

Le matériel végétal est constitué de vitroplants de manioc de la variété RB 89509 âgés de vingt mois. En effet, ces vitroplants proviennent de deux différents milieux de culture : le milieu MS et le milieu MS additionné de charbon actif à une concentration de 3g/l.

Méthodes

Les cultures sont placées dans une chambre dont la température est réglée à 28°C ± 1 conformément au standard proposé par (Hunter *et al.*, 1984). Cette température offre une condition optimale à la croissance des vitroplants. L'humidité relative de la chambre de culture est maintenue à 80% pour prévenir la dessiccation des explants et réduire également les problèmes de contamination dans la chambre de culture. La chambre de culture est pourvue de lampes de types Philips TLD18W et Sibalec FL18W assurant un éclairage d'environ 5000 lux avec une photopériode de 12 heures. Les paramètres de croissance de 30 vitroplants (2 x 15) âgés de vingt mois ont été étudiés pour évaluer l'effet du charbon actif sur la conservation sont : le nombre de feuilles, le nombre de racines, le nombre de nœuds, la hauteur de la tige, la longueur moyenne des entre-nœuds et la longueur moyenne des racines principales.

La longueur de la racine principale et la hauteur des tiges ont été mesurées à l'aide d'un pied à coulisse avec une précision de ± 0,1mm. La longueur des entre-nœuds a été prise à l'aide d'une règle graduée.

Pour analyser ces données, le tableur Excel et le logiciel Minitab 16 ont été utilisés. Le test T de Student Newman et Keuls (SNK) à deux variables indépendantes a été utilisé pour la comparaison des moyennes. Les moyennes ont été comparées entre elles en ayant recours à la méthode de la plus petite différence significative au seuil de 5%. Le test de corrélation de Person a été effectué afin d'évaluer la relation entre les différents paramètres de croissance étudiés.

Résultats

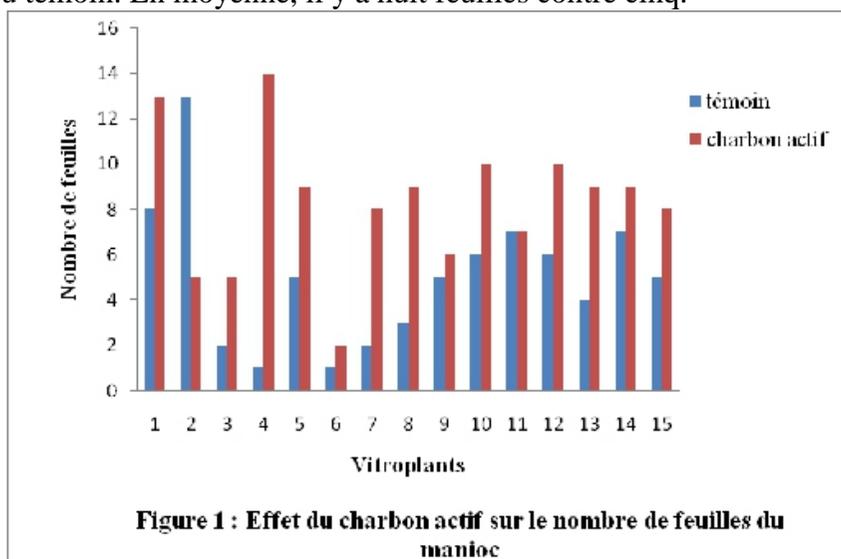
A partir des observations nous notons un dessèchement des vitroplants de vingt mois de *Manihot esculenta* obtenus sur le milieu témoin tandis que ceux du milieu additionné au charbon actif présentent une couleur verte (photos 1 et 2).



Photo 1: Vitroplants de vingt mois sur MS Photo 2: Vitroplants de vingt mois sur MS+CA

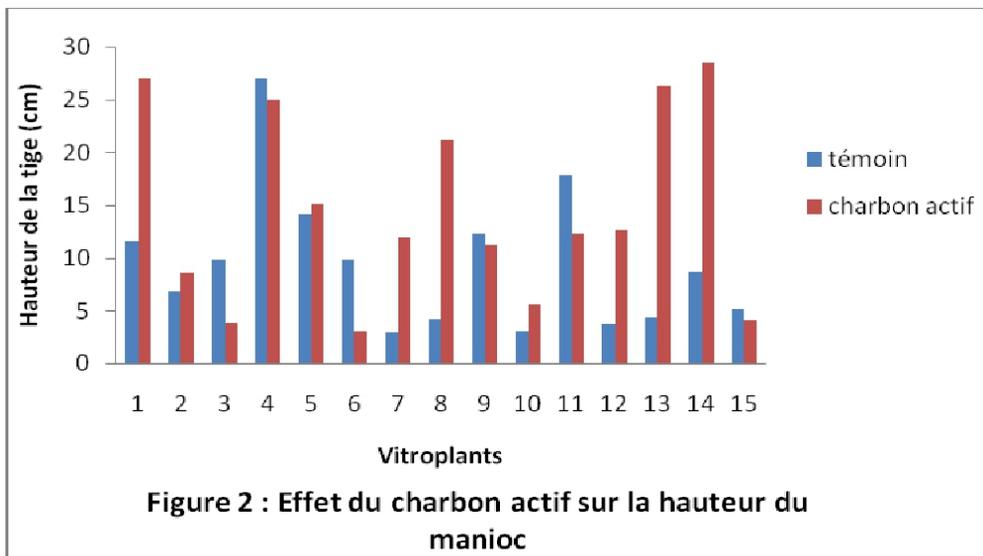
MS: Milieu de Murashige et Skoog; MS+CA : Murashige et Skoog+ charbon actif

La figure 1 montre que les vitroplants obtenus sur le milieu traité présentent dans l'ensemble un nombre de feuilles plus élevé que ceux du milieu témoin. En moyenne, il y a huit feuilles contre cinq.



La probabilité (P= 0,007) associée au Test t d'égalité des deux moyennes de feuilles est inférieure à 0,05. Il y a une différence hautement significative entre les deux nombres moyens de feuilles obtenues sur les deux milieux au seuil de 5%.

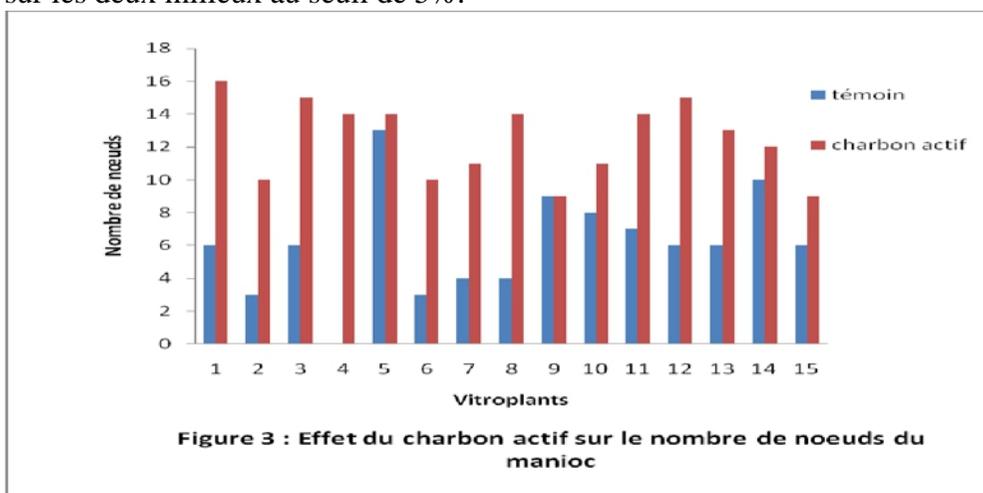
La figure 2 indique que les vitroplants obtenus sur le milieu traité présentent une hauteur plus importante (14,44 cm en moyenne) que les vitroplants obtenus sur le milieu témoin (9,42 cm).



La probabilité ($P= 0,037$) associée au Test t d'égalité des deux moyennes de hauteur de tige est inférieure à 0,05. Il y a donc une différence significative entre les deux longueurs moyennes de tiges obtenu sur les deux milieux au seuil de 5%.

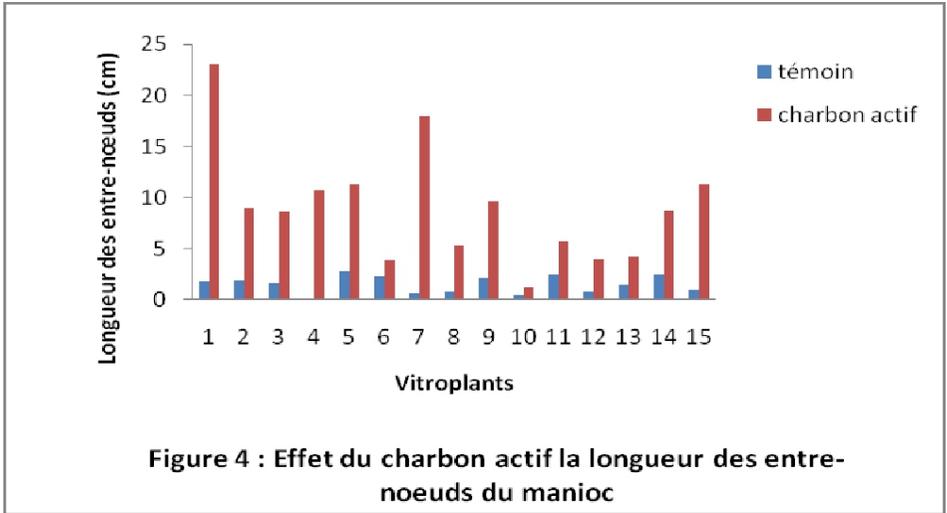
La figure 3 présente l'effet du charbon actif sur la formation des nœuds. Les vitroplants obtenus sur le milieu traité ont un nombre de nœuds moyen supérieur (12,47) à ceux obtenu sur le milieu témoin (6,07).

La probabilité ($P= 0,000$) associée au Test t d'égalité des deux moyennes de nœuds est inférieure à 0,05. Il existe une différence très hautement significative entre les deux nombres moyens de nœuds obtenus sur les deux milieux au seuil de 5%.

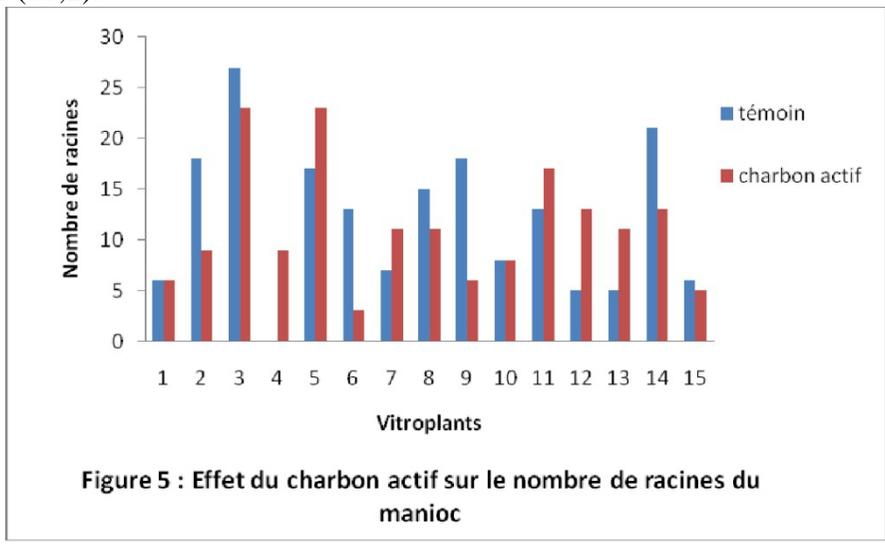


La figure 4 montre la longueur moyenne des entre-nœuds sur les deux milieux. Les vitroplants obtenus sur le milieu avec du charbon actif présentent une longueur moyenne d’entre-nœuds moins élevée (1,247cm) que celle du milieu sans charbon actif (2,23 cm).

La probabilité (P= 0,018) associée au Test t d’égalité des deux moyennes pour la longueur est inférieure à 0,05. Il y a donc une différence significative au seuil de 5% entre les longueurs moyennes des entre-nœuds obtenus sur les deux milieux au seuil de 5%.



La figure 5 montre l’influence du charbon actif sur la rhizogénèse des vitroplants du manioc. Le nombre moyen de racines issues des vitroplants du milieu témoin est supérieur (11,93) à celui du milieu additionné au charbon actif (11,2).

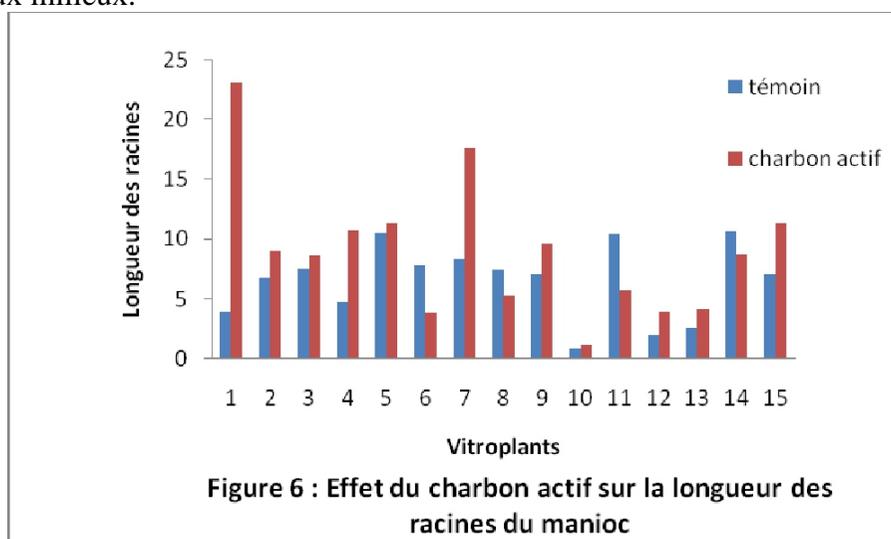


La probabilité ($P= 0,768$) associée au Test t d'égalité des deux moyennes de racine est supérieure à 0,05. Il y a donc une différence significative entre le nombre moyen de racines obtenues sur les deux milieux au seuil de 5%.

La figure 6 indique la longueur moyenne des racines sur les deux milieux.

On note que la longueur des racines des vitroplants du milieu traité est plus élevée (8,95 cm) que celles des vitroplants du milieu témoin (6,5 cm).

La probabilité ($P= 0,150$) associée au Test t d'égalité des deux moyennes de longueur est supérieure à 0,05. Au seuil de 5 %, il n'y a donc pas de différence entre les longueurs moyennes de racines obtenues sur les deux milieux.



Les tableaux 1 et 2 montrent respectivement les relations entre les paramètres de croissance évalués sur les vitroplants de manioc dans les milieux témoins et traités.

Il existe un lien hautement significatif ($P<0,005$) entre la hauteur de la tige et la longueur des entre-nœuds d'une part et d'un lien significatif ($P<0,019$) entre le nombre de racine et la longueur de la racine principale des vitroplants du milieu témoin.

Tableau 1: Corrélation de Pearson et valeur de P établies entre les différents paramètres des vitroplants issus du milieu témoin

	NF MS	NR MS	NNe MS	HT MS	LEN MS	LR MS
NF MS	1					
NR MS	0,166NS	1				
NNe MS	0,244NS	0,416NS	1			
HT MS	-0,169NS	-0,069NS	-0,138NS	1		
LEN MS	-0,197NS	-0,100NS	0,137NS	0,684**	1	
LR MS	-0,033NS	0,595*	0,288NS	0,272NS	0,189NS	1

NS : Non Significatif ; * : Significatif ; ** : Hautement significatif ; NR : Nombre de Racine ; NNe : Nombre de Nœuds ; HT : Hauteur Tige ; LEN : Longueur Entre-nœud ; LR : Longueur Racine principale ; MS : Milieu de Murashige et Skoog

L'analyse du tableau 2 révèle l'existence d'un lien hautement significatif ($P < 0,007$) entre la hauteur de la tige et le nombre de nœuds. De même, il existe respectivement un lien significatif ($P < 0,030$) entre la hauteur de la tige et le nombre de feuilles puis entre le nombre de nœuds et le nombre de feuilles ($P < 0,045$) et enfin entre le nombre de nœuds et le nombre de racines ($P < 0,030$).

Tableau 2: Corrélation de Pearson et valeur de P établies entre les différents paramètres des vitroplants issus du milieu additionné de charbon actif

	NF MS+ CA	NR MS+ CA	NNe MS+ CA	HT MS+ CA	LEN MS+ CA	LR MS+ CA	Poi nt A	Poi nt B	Poi nt C	Poi nt D	Poi nt E
NF MS+ CA	1						—				
NR MS+ CA	-	1					87	—			
NNe MS+ CA	0,015 NS	0,524 *	0,559 *	1			64	56	—		
HT MS+ CA	0,559 *	0,306 NS	0,663 **	1			37	32	91	—	
LEN MS+ CA	0,030 NS	0,384 NS	0,351 NS	0,610 *	1		93	35	54	43	—
LR MS+ CA	0,341 NS	-	0,165 NS	0,297 NS	0,293 NS	1					

NS : Non Significatif ; * : Significatif ; ** : Hautement significatif ; NR : Nombre de Racine ; NNe : Nombre de Nœuds ; HT : Hauteur Tige ; LEN : Longueur Entre-nœud ; LR : Longueur Racine principale ; MS+CA : Milieu de Murashige et Skoog+ Charbon actif

Discussion

Les résultats ont révélé que la croissance des feuilles des vitroplants est dans l'ensemble plus importante sur le milieu traité que celle du milieu témoin. En effet, les vitroplants issus du milieu sans charbon actif ont subi un dessèchement suivi d'une chute massive des feuilles. En plus de son effet ralentisseur indiqué par plusieurs auteurs (Krassimir *et al.*, 2006 ; Gomes 2009 ; Rassimwaï *et al.*, 2013), le charbon actif interviendrait aussi dans le maintien des feuilles, réduisant ainsi le processus de sénescence.

Le charbon actif a également agi favorablement sur la rhizogenèse des vitroplants du manioc. Comme l'ont montré respectivement les travaux de Mazinga *et al.*, 2014, Agbidinoukoun *et al.*, 2013, l'ajout du charbon actif est bénéfique pour le développement du système racinaire et de l'organogenèse du bananier et de l'igname. Les résultats similaires ont également été obtenus par Bettaieb *et al.* (2007) dont les essais d'enracinement *in vitro* en présence de charbon actif 2 g.l⁻¹ ont abouti à une rhizogenèse générale des pousses du glaïeul mises en culture. De même, le nombre moyen de nœuds sur le milieu traité est plus important et conduit à un raccourcissement des entre-nœuds. Par conséquent, les plants sont en croissance ralentie avec une apparition élevée de nœuds sur le vitroplant. Le charbon actif ralentit l'élongation des vitroplants. Ces résultats confirment ceux de Agbidinoukoun *et al.*, (2013). Toutefois, il importe de contrôler la concentration du charbon actif car il peut exercer un effet inhibiteur, lorsque sa concentration dans le milieu est supérieure à 1,00 %. L'action inhibitrice du charbon actif sur la rhizogenèse a été par exemple observée par Rassimwaï *et al.*, (2013) et Gomes (2009) respectivement sur l'enracinement de *Nauclea latifolia* et de *Arbutus unedo*. Le nombre réduit de racines serait bénéfique à la conservation de ces vitroplants en ce sens que ces derniers absorberaient moins d'éléments nutritifs du milieu de culture.

Conclusion

Les résultats de la présente étude montrent que la culture *in vitro* est une alternative à l'intensification ou à la sauvegarde des ressources génétiques de manioc en voie de disparition. La faible disponibilité du matériel de plantation constitue l'un des principaux freins à la production de cette racine tubéreuse. L'ajout du charbon actif au milieu de culture contribue au maintien en croissance ralentie des vitroplants de la variété RB 89509 de *Manihot esculenta* en voie de disparition. Cet effet s'est fait remarquer sur le nombre moyen de feuilles, sur la hauteur moyenne des tiges, sur la longueur moyenne des entre-nœuds et sur le nombre moyen de racines qui sont moins importants sur le milieu additionné de charbon actif. A moyen terme, l'utilisation du charbon actif constitue un atout pour la conservation de la biodiversité surtout pour nos pays en voie de

développement mais pour une conservation plus durable, il faudra adopter progressivement la cryoconservation.

References:

- Aerni, P. & Bernauer, T. (2006): Stakeholder attitudes toward GMOs in the Philippines, Mexico, and South Africa: The issue of public trust. *World Development* **34** (3), 557-575.
- Agbidinoukoun, A., Ahanhanzo, C., Adoukonou-Sagbadja, H., Adjassa, M., Agassounon Djikpo-Tchibozo, M., Agbangla C. (2013): Impact of osmotic dehydration on the encapsulated apices survival of two yams (*Dioscorea spp.*) genotypes from Benin. *Journal of Applied Biosciences* **65**, 4999 – 5007.
- Ahanhanzo, C., Agbangla, C., Agassounon Djikpo Tchibozo, M., Cacaï, G., Dramane, K. (2008): Etude comparative de l'influence des régulateurs de croissance sur la morphogénèse (*in vitro*) de quelques variétés de *Manihot esculenta* Crantz (manioc-euphorbiaceae) du Bénin. *Revue. CAMES - Série A*. **07**, 47-52.
- Awa, E.T, Tumanteh, A. (2001): Cassava based cropping systems and use of inputs in different ecological zones of central Africa. *African Journal of Root and Tuber Crops* **4** (2): 20-27.
- Braima, J., Yaninek, J., Neuenschwander, P., Cudjoe, A., Modder, W., Echendu, N, Toko, M. (2000): Lutte contre les ravageurs du manioc. IITA, ISBN 978-131-184-3.
- Cacaï, G., Ahanhanzo, C., Dangou, J., Houedjissin, S., Agbangla, C. (2012) : Effets de différentes combinaisons hormonales sur l'organogénèse *in vitro* de quelques cultivars locaux et variétés améliorées de *Manihot esculenta* Crantz (manioc-*Euphorbiaceae*) cultivées au Bénin. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* **6** (4): 1593-1607.
- Cacaï, G., Adoukonou-Sagbadja, H., Kumulugui, B. S., Ondo Ovono, P., Hougue, J., Ahanhanzo, C. (2013): Eradication of Cassava (*Manihot esculenta*) Mosaic Symptoms through Thermo-therapy and Meristems Cultured *in vitro*. *International Journal of Agronomy and Plant Production*. **4** (S), 3697-3701.
- Engelmann, F. (2010): Use biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In vitro Cell. Dev. Biol.- Plant*. DOI 10.1007/s11627-010-9327-2.
- El-Sharkawy, M.A. (2004): Cassava biology and physiology. *Plant Molecular Biology*, **53**: 621-641.
- Escobar, R., Mafla, G., Roca, W. (1995): Cryopreservation for long-term conservation of Cassava genetic resources. In "The Cassava Biotechnology Network". Proc. of 2nd International Scientific Meeting. Bogor, Indonesia,

- 22-26, August 1994. Working document no. 150. CIAT, Cali, Colombia, 190-193.
- Fagbémissi, R. C., Coulibaly, O., Hanna, R., Endamana, D. (2002). Adoption de variétés de manioc et efficacité durable de la lutte biologique contre l'acarien vert du manioc au Bénin. *Bulletin de la Recherche Agronomique du Bénin*, 38.
- Gomes, F. & Canhoto, J.M. (2009): Micropropagation of strawberry tree (*Arbutus unedi* L.) from adult plants. *In vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*, **45**, 72-82. DOI 10.1007/s11627-008-9164-8.
- Hunter, S. A., Hannon, M., Foxe, J. Hennerty, M. J. (1984): Factors affecting the *in vitro* production of strawberry (*Fragaria X ananassa Duch*) meristems (cv. Cambridge Favourite). *J. Life Sci.*, 13-19.
- Krassimir, N., Tremblay, F., Bergeron, Y., Goudiaby, V. (2006): Influence du charbon actif sur la croissance primaire des plantules de pins gris. *Revue Canadienne de Recherche Forestière*, **36**, 761-767.
- Mabanza, J. Tonnang, A.G, Mahouka, J (1997): Développement des cultivars assainis de manioc. *African Journal and Root Tuber Crops* **2**: 52-54.
- Mabanza, J. & Mambou, J.C. (2002): *Dioscorea liebrechtsiana* de Wild, un légume de cueillette de grande importance au Congo. Centre de recherches sur l'amélioration génétique des plantes de (CERAG), Brazzaville, Congo. *Plant genetic resources and food security in west and central Africa*, 234-237.
- Murashige, T. & Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* **15**: 473-492.
- Pitekélabou, R., Etse, D. K., Aïdam, V. A. (2013): Micropropagation et rhizogenèse *in vitro* chez *Nauclea latifolia* Smith (Rubiaceae) . *European Scientific Journal* 9 (24): 296-307.
- Vieira da Silva, J. (1989): Cultures alternatives pour le Sahel. In: Proceedings of an International workshop, 7-11 janv 1987. ICRISAT Sahelian Center, Niamey, Niger, 333-337.
- Withers L. (1990): *In vitro* conservation. *Biological Journal of the Linnean Society*.