

seeds, may be attributed to that seed germination in wild cassava is genetically controlled. Probably cassava cultivars have had their genetic factors of dormancy eliminated by breeders through the years.

From the above results it can be concluded that preservation of wild *Manihot* species germplasm can be achieved vegetatively through transplanting whole plants from their natural habitats to the germplasm collection plots or by grafting scions from these wild species onto stocks of cassava. Preservation of such germplasm of wild species may continue through introducing their genes into native cultivars known by easy reproduction by seeds. This technique can be realized by hybridizing the wild species with these cultivars, and maintaining the produced hybrids by common vegetative means.

Summary

An urgent effort to conserve genetic resources of wild cassava is badly needed. Occurrence of wild cassava species in their natural habitats is diminishing day after day and a number of species are on the verge of extinction. Trials of collecting these wild species from their natural habitats were carried out. Frequency of their occurrence in these habitats is reported.

By experimenting with different ways of preserving these species, it was found that transplanting whole plants is the most efficient method of reproducing the sub-shrubby species. Grafting scions of wild shrubby species onto stocks of cassava was found to be another potential way of germplasm conservation.

Resumen

Es preciso un esfuerzo urgente para conservar los recursos genéticos de la yuca silvestre. Las especies silvestres están disminuyendo constantemente en sus habitats naturales, algunas de ellas en vía de extinción. Se coleccionaron varias de estas especies silvestres en sus habitats naturales y se registró la frecuencia en que ocurrían.

Se experimentó con diferentes métodos de preservar las especies en colección viva. Hallóse que el método de trasplantar plantas enteras es el más eficiente para reproducir las especies subarborescentes. El método de injertar ramas de especies silvestres arbustivas sobre la yuca se encontró con potencial en la conservación de germoplasma silvestre en una colección viva.

May 11th, 1979

NAGIB M. A. NASSAR*

* Professor of Genetics and Plant Breeding, Centro de Ciências Agrárias Universidade Federal de Paraíba, 58397 Areia, Brazil

REFERENCES

- MARTIN, F. W. Cytogenetics and plant breeding of cassava: A review. *Plant Breeding Abstracts* 46:909-910. 1976
- MOGHINER, I., PORTUGUEZ, A. J. D., GUTUZZO, A. D. and ACOSTA, J. A. Influence of *Manihot flabellifolia* as a scion on the formation of storage roots in *M. esculenta* as a stock. *Banplandia* 2:137-142. 1967
- NASSAR, NAGIB M. A. Wild *Manihot* species for cassava breeding. *Canadian Journal of Plant Science* 58:257-261. 1978.
- NASSAR, NAGIB M. A. Compatibility of cassava with four wild *Manihot* species from Central Brazil. *Turrialba* 28(3):93-94. 1978.
- NASSAR, NAGIB M. A. Some further wild *Manihot* species of potential value for cassava breeding. *Canadian Journal of Plant Science* 58:915-917. 1978.
- NASSAR, NAGIB M. A. and COSTA, C. Tuber formation and protein content in some wild *Manihot* species native to Central Brazil. *Experientia* 33:1304-1305. 1977.
- NASSAR, NAGIB M. A. and FITCHNER, S. Hydrocyanic content in some wild *Manihot* species native to Central Brazil. *Canadian Journal of Plant Science* 58:577-578. 1978.
- ROGERS, D. J., APPAN, S. G. Untapped genetic resources for cassava breeding. *Proceedings of the 2nd International Symposium on Tropical Roots and Tuber Crops* 1: 72-75. 1970.
- ROGERS, D. J. and APPAN, S. G. *Manihot, Manihotoideae* (Euphorbiaceae). New York, Hafner 1973. 272 p. (Flora Neotropica, Monograph 13)

Potentiel morphogénétique des entrenoeuds de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener et *P. mollissima* Bailey en culture "in vitro"

Abstract. Morphogenetic potential of stem internodes from two passion flower plants, *P. edulis* var. *flavicarpa* and *P. mollissima* was proved when Nitsch's medium added with 2 mg/l of kinetin was used. Callus formation, starch accumulation, dedifferentiation and vessel formation are shown. Kinetin was the stimulating agent. This morphogenetic potential would be useful for vegetative multiplication in order to maintain the genetic characters of the mother plants.

Introduction

La culture de cellules et de tissus a été conçue originellement comme un moyen de comprendre les phénomènes morphogénétiques et physiologiques. Plusieurs auteurs (3, 5, 8) ont étudié les modes de différenciation et attiré l'attention sur l'utilisation de ces techniques pour la propagation des plantes.

Les espèces fruitières de l'Amérique tropical constituent un matériel auquel ces techniques pourraient être appliquées, en raison de l'intérêt croissant porté à ces espèces. Les techniques *in vitro* constitueraient un outil important pour résoudre les problèmes posés par leur propagation.

Notre but est d'explorer le potentiel morphogénétique des entrenoeuds de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* et de *P. mollissima* cultivés *in vitro*, en vue d'étudier la propagation végétative de plantes sélectionnées de ces espèces.

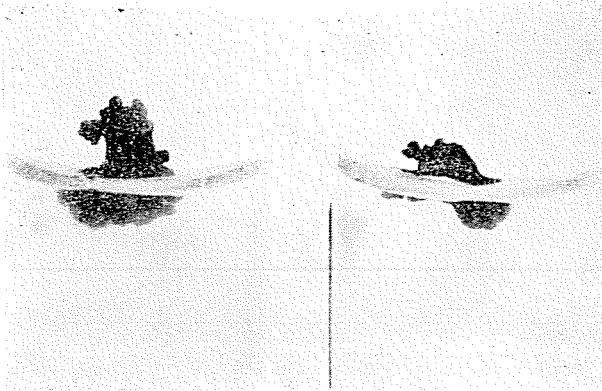


Fig. 1.—Cals formés aux deux extrémités (à gauche) ou à une extrémité (à droite), des segments, chez *P. edulis* var. *flavicarpa*.

Matériel et méthodes

Les entrenoeuds de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener et de *P. mollissima* Bailey, ont été prélevés sur des plantes âgées de huit mois, cultivées en serre à la température de 25° C et à une humidité relative de 45%. Après leur prélèvement, les explantats ont été divisés en segments de 10 mm, plongés dans l'alcool éthylique (70%) pendant une minute, ensuite trempés dans l'hypochlorite de calcium à 4% pendant 5 minutes et rincés trois fois à l'eau désionisée stérile. La mise en culture a été faite sur le milieu de base de Nitsch (sans substances de croissance) (11) en présence de 2 mg/1 de cinétine. Les explantats ont été placés suivant leur géotropisme naturel. Le pH du milieu a été ramené à 5,8 par addition de NaOH N avant d'ajouter l'agar. Le milieu a été autoclavé à 115°C pendant 15 minutes. Les expériences ont été menées à la lumière avec une intensité de 3000 lux pendant 18 h/jour à la température de 25 ± 2°C et à une humidité relative de 65%. Les échantillons destinés aux observations cytomorphologiques ont été pris tous les trois jours, fixés dans le crafi et colorés à l'hématoxyline ou au fastgreen suivant la procédure décrite par Johansen (6) pour les préparations permanentes. Quant aux frottis réalisés à partir des pointes de racines de plantules régénérées, ils ont été colorés à l'acéto-orcéine.

Résultats

L'apparition d'un cal a été observée chez les deux espèces après environ six jours de culture; cette apparition pouvait se produire à une des extrémités du segment, aux deux extrémités et même en dehors des blessures produites par sectionnement (Fig. 1 et 2). Le contact direct avec le milieu n'était pas essentiel pour la formation de l'amas. Cependant, le début de formation de l'amas a été noté, lors des observations microscopiques, après trois jours de culture. La prolifération pouvait avoir lieu aux extrémités de la blessure



Fig. 2.—Cals formés dans la partie moyenne de l'explantat et racine régénérée à une extrémité du segment, chez *P. mollissima*.

ou dans la partie moyenne de l'explantat (Fig. 3); elle finissait par provoquer la rupture de l'épiderme.

Le développement de ces cals a débuté dans les tissus parenchymateux et a continué de façon active (Fig. 4) pendant les vingt premiers jours de culture.

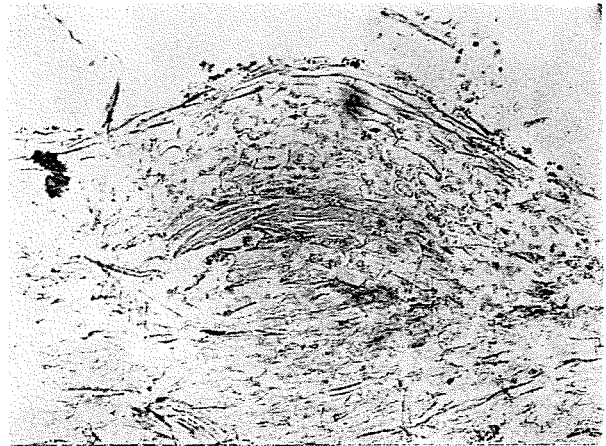


Fig. 3.—Prolifération dans la partie moyenne d'un explantat chez *P. edulis* var. *flavicarpa*.

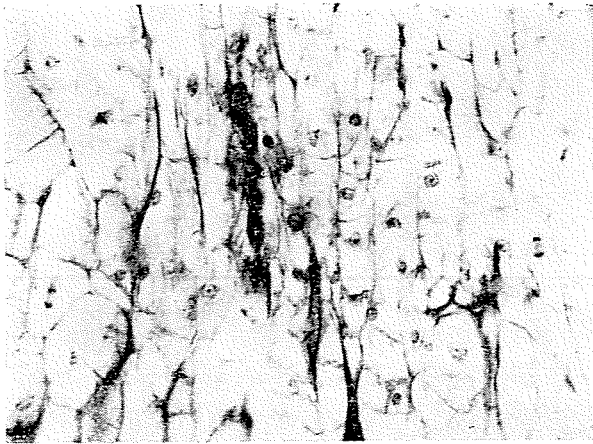


Fig. 4.—Zone de division chez *P. mollissima*.

L'apparition d'organes, racines ou pousses feuillées, a été observé lors du premier repiquage, après vingt jours de culture, sur le même milieu. Les différenciations se développaient à une extrémité du segment (Fig. 2) ou aux deux extrémités (Fig. 5), à l'intérieur ou hors du milieu de culture (Fig. 6). On pouvait observer plusieurs nouveaux organes sur le même explantat (Fig. 7). Les observations microscopiques ont

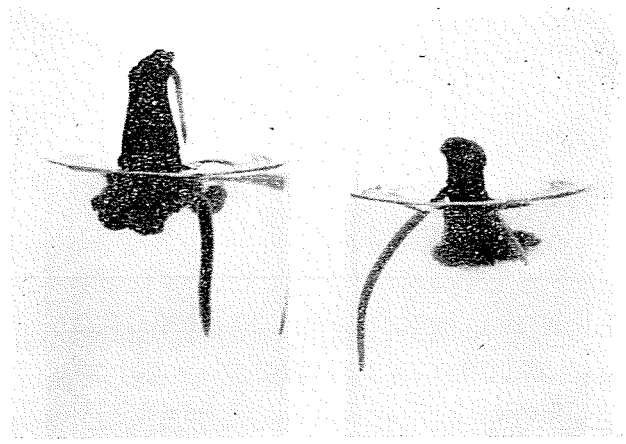


Fig. 5.—Différenciations aux deux extrémités du même segment chez *P. edulis* var. *flavicarpa*.

montré la présence de plusieurs zones de différenciation (Fig. 8) dans le même amas. Ultérieurement nous avons noté la présence de grains d'amidon et une différenciation des tissus vasculaires (Fig. 9).

Les organes formés (racines et pousses feuillées) ont été séparés et cultivés de façon à développer des plantules. Celles-ci se sont produites seulement (Figs.

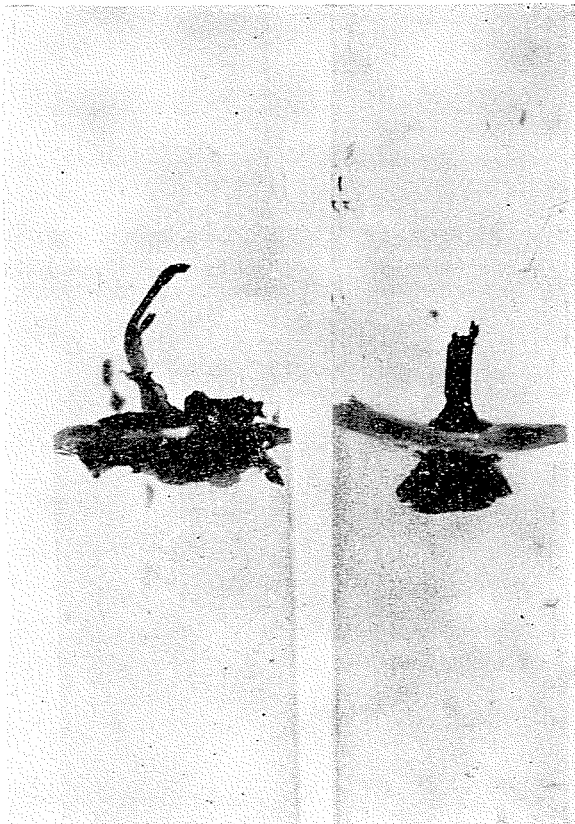


Fig. 6.—Différenciations à l'intérieur et en dehors du milieu de culture chez *P. edulis* var. *flavicarpa*.



Fig. 7.—Formation de plusieurs pousses feuillées sur un même explantat chez *P. edulis* var. *flavicarpa*.

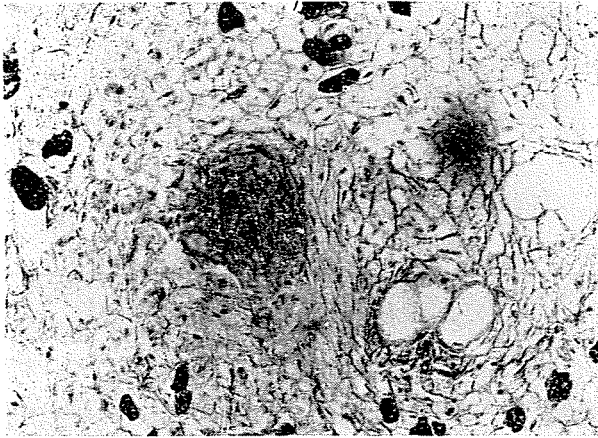


Fig. 8.—Plusieurs zones de différenciation dans le même cal chez *P. mollissima*.

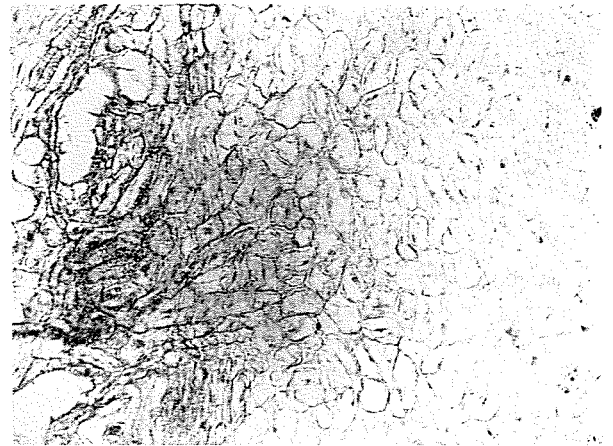


Fig. 9.—Présence de grains d'amidon et différenciation de tissu vasculaire, chez *P. mollissima*.

10 et 11) si l'organe initialement formé était une pousse feuillée.

Les plantules régénérées avaient 18 chromosomes somatiques.

Discussion

La prolifération des tissus en culture, à partir de différents explantats, représente le premier stade conduisant à la formation d'un cal. Cette formation qui peut être propagée de façon indéfinie, a été notée par plusieurs auteurs chez des espèces fruitières. Le cal



Fig. 10.—Plantule différencié à partir d'un cal chez *P. mollissima*.



Fig. 11.—Plantule régénérée et repiquée en terre, chez *P. edulis* var. *flavicarpa*.

préalablement observé était le point de départ pour la différenciation d'organes (2, 7, 10, 14) Dans nos essais, ce développement s'est poursuivi.

Le stade suivant est la division d'une cellule parenchymateuse, laquelle forme, après plusieurs divisions, un centre méristématique ou "méristemoïde". Skoog et Miller (12) affirment que les auxines et les cytokinines sont fondamentales pour la régulation de la croissance et du développement, et que le mode de développement dépend du rapport entre les quantités finales de ces deux types de substances. Dans nos expériences et pour les deux espèces, la seule addition de la cinétine a assuré la différenciation des plantules. Nous pensons, à cet égard, que la quantité d'auxine déjà contenue dans les plantes, au moment de commencer la culture, a été suffisante pour établir cet équilibre adéquat avec la cinétine. Bottino (1) mentionne que la capacité d'un tissu à former un cal dépend du stade original du tissu au moment du prélèvement et d'une interaction complexe de substances de croissance.

Thorpe et Murashige (13) font remarquer, chez *Nicotiana tabacum*, une corrélation étroite entre l'accumulation d'amidon et l'initiation de bourgeons; ils observent une diminution de la quantité d'amidon au cours de la différenciation. Par ailleurs, chez plusieurs espèces, ont été observées des zones de différenciation de tissu vasculaire: *Citrus limon* (8), *Citrus madurensis* (4), *Carica papaya* (14); Ces auteurs ont utilisé différentes substances de croissance. La coïncidence des grains d'amidon et des zones de différenciation de tissu vasculaire, dans nos préparations, indique l'action stimulante de la cinétine pour la formation de cals et pour la différenciation des pousses feuillées et des racines chez les deux espèces de *Passiflora* étudiées. Nakayama (10) avait seulement noté l'action caulogène de la cinétine chez *P. caerulea*.

Il faut préciser qu'il a été possible d'obtenir une plantule lorsque la première différenciation était une pousse feuillée. La différenciation préalable d'une racine ne nous a pas permis l'obtention de plantules.

Nous avons observé le même nombre chromosomique ($2n=18$) dans les méristèmes racinaires des plantules régénérées que dans les plantes d'origine.

Il peut être possible d'utiliser le potentiel morphogénétique des entrenoeuds de *P. edulis* var. *flavicarpa* et de *P. mollissima* pour la multiplication végétative de ces espèces.

Résumé

Le potentiel morphogénétique des entrenoeuds de *P. edulis* var. *flavicarpa* et de *P. mollissima* a été montré en utilisant le milieu de Nitsch, additionné de 2 mg/l de cinétine. La formation de cals, l'accumulation

d'amidon, la dédifférenciation et la formation de vaisseaux sont illustrés. La cinétine a agi comme agent stimulateur. Il serait possible d'utiliser ce potentiel pour la multiplication végétative, qui permet la conservation des caractéristiques génétiques des plantes mères.

Remerciements

Nous remercions M. le Professeur J. Bouharmont qui a bien voulu se charger de la lecture de ce manuscrit.

13 septembre 1978

MIGUEL J. MORAN ROBLIS
UNITE DE CYTOGENETIQUE
UNIVERSITE CATHOLIQUE DE LOUVAIN*

* Place Croix du Sud, 4; 1348 Louvain-la-Neuve, Belg que

RÉFÉRENCES

1. BOITINO, P. The potential of genetic manipulation in plant cell cultures for plant breeding. *Radiation Botany* 15: 1-16. 1975.
2. BOUZID, S. Quelques traits du comportement de boutures de *Citrus* en culture in vitro. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences (Paris)*. Série D 280: 1688-1692. 1975.
3. GAUTHERET, R. La culture de tissus végétaux; techniques et réalisations. Paris: Masson, 1959. 1863 p.
4. GRINBLAT, U. Differentiation of *Citrus* stem in vitro. *Journal of the American Society of Horticultural Science* 97:599-603. 1972.
5. HUSSEY, G. In vitro methods of plant propagation. *Scientia Horticulturae* 27: 16-20. 1975.
6. JOHANSEN, D. Plant microtechnique. New York: Mc Graw Hill, 1940. 523 p.
7. MAPES, M. Tissue culture of Bromeliads. *The International Plant Propagators' Society* 23: 47-55. 1973.
8. MURASHIGE, I. Plant propagation through tissue culture. *Annual Review of Plant Physiology* 25:135-166. 1974.
9. MURASHIGE, I., NAKANO, R. et TUCKER, D. Histogenesis and rate of nuclear change in *Citrus* stem in vitro. *Phytomorphology* 17: 468-476. 1967.
10. NAKAYAMA, F. Cultivo "in vitro" de tejidos de *Passiflora caerulea*. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de la Plata* 42: 63-74. 1966.
11. NITSCH, J., NITSCH, C. et HAMON, S. 1968. Réalisation expérimentale de l'androgénèse chez divers *Nicotiana*. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances et Mémoires, Société de Biologie (Paris)* 162:369-372. 1968.
12. SKOOG, F. et MILLER, I. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro. *Symposia of the Society for Experimental Biology* 11:118-131. 1957.
13. THORPE, T. et MURASHIGE, I. Starch accumulation in shoot forming tobacco callus cultures. *Science* 160: 421-422. 1968.
14. YIE, S. and LIAW, S. Plant regeneration from shoot tips and callus of papaya. *In Vitro* 13: 564-568. 1977.