

Comparaison de l'aptitude à la régénération *in vitro* de deux kolatiers : *Cola anomala* et *C. acuminata*

M. Fotso, Denis Omokolo Ndoumou, Duclair Mbouna

Au Cameroun, le genre *Cola* (Sterculiaceae) compte 39 espèces parmi lesquelles *Cola anomala*, *C. acuminata* et *C. nitida* sont les plus exploitées [1]. Leurs graines riches en alcaloïdes, stimulants nerveux et musculaires, font l'objet de transactions commerciales importantes dans presque tous les pays d'Afrique tropicale. Elles donnent une sensation d'augmentation d'énergie et de vigueur chez les consommateurs, dissipent la somnolence et la faim [2]. En l'absence de graines de *Cola*, l'hospitalité traditionnelle et les cérémonies socioculturelles sont considérées comme incomplètes au Cameroun, au Nigeria et dans de nombreux pays ouest-africains. Les graines de *Cola* ont également une importance thérapeutique et industrielle à cause de leur richesse en polyphénols [3, 4]. Traditionnellement, les kolatiers sont multipliés par voie sexuée. Cependant, ce mode de propagation se heurte à deux problèmes majeurs : d'une part, le faible taux de germination des graines, lié principalement à leur richesse en

polyphénols et à leur sensibilité à la température, mais également à la durée de leur stockage, au poids des graines et au nombre de cotylédons [5, 6] et, d'autre part, la perte des génotypes élités, étant donné le caractère allogame du kolatier.

Les premières tentatives de propagation des kolatiers datent de la fin du XIX^e siècle et portent sur le bouturage [7, 8], le marcottage [9, 10] et le greffage [11]. Cependant, l'utilisation de ces méthodes est limitée par la difficulté d'enracinement pour le bouturage et le marcottage et par le faible taux de reprise après transplantation pour le greffage. De plus, l'application de ces techniques réalisées dans des conditions non contrôlées facilite le transfert de maladies sur les nouveaux plants. Aussi, le développement des techniques de culture *in vitro* semble indispensable pour participer à l'amélioration des kolatiers. Les premiers essais de microbouturage *in vitro* ont été réalisés sur *C. nitida* par Dossa *et al.* [12]. Ils se sont soldés par un pourcentage de réussite très faible accompagné d'une faible induction de rhizogénèse. Or, la régénération *in vitro* des kolatiers à partir de fragments d'organes aiderait non seulement à surmonter les difficultés des méthodes horticoles traditionnelles, mais aussi à faciliter et accélérer la production de génotypes élités, comme cela a déjà été observé pour le caféier [13], l'hévéa [14, 15] et le cacaoyer [16, 17].

Ce travail présente une toute première approche de la mise au point d'une technique de régénération et de propagation *in vitro* pour deux espèces de kolatier : *Cola anomala* et *C. acuminata*.

Matériel et méthode

Aseptisation du matériel végétal

Les graines de *C. anomala* et *C. acuminata* proviennent des cabosses commercialisées localement. Les cotylédons sont directement prélevés sur les graines alors que les feuilles et les tiges sont prises sur les plantules des deux espèces, âgées de 30 jours, issues de la germination des graines dans un mélange terre-sable à volume égal. Le mode d'aseptisation des différents organes est résumé dans le *tableau 1* et permet d'obtenir 85 % de réussite, quel que soit l'organe mis en culture.

Milieus de culture

Pour la callogénèse

Des fragments de cotylédons d'environ 0,5 cm de longueur, de tiges d'environ 1 cm ou de feuilles d'environ 0,25 cm² de surface des deux espèces, préalablement aseptisés, sont placés sur un milieu de culture contenant les macro et micro-éléments selon Murashige et Skoog [18] dilués de moitié (MS/2), les vitamines selon Morel et Wetmore [19] ainsi que 30 g.L⁻¹ de saccharose, 6 g.L⁻¹ d'agar et de 2 à 6 mg.L⁻¹ de 2,4-D. Pour chaque organe et pour chacune des espèces, 40 explants sont mis en culture sur chacun des cinq milieux différents.

Pour la régénération

Le milieu de base pour la régénération est constitué de la solution minérale de

M. Fotso, D. Omokolo Ndoumou, D. Mbouna : Laboratoire de physiologie végétale, LAF314, École normale supérieure, BP 47, Yaoundé, Cameroun.

Tirés à part : M. Fotso

Thèmes : Physiologie végétale ; Phyto-technologie.

Tableau 1

Techniques de désinfection des organes de *C. anomala* et *C. acuminata*

Opération	Produits utilisés	Durée (min)	
		Cotylédons et tiges	Feuilles
Lavage	Eau courante	15-20	15-20
Trempage	Mercryl laurylé (2 %)	60	45
	Hypochlorite de Na (3 %)	30	15
Rinçage	Eau distillée stérile (3 fois)	5, 10 et 15	5, 10 et 15

Procedure for the desinfection of organs from *C. anomala* and *C. acuminata*

Murashige et Skoog diluée de moitié, supplémentée de 30 g.L⁻¹ de saccharose, 6 g.L⁻¹ d'agar et du complexe vitaminique de Morel et Wetmore. Les cals développés sur les explants de tiges des deux espèces sont remis en culture sur cinq à six milieux différant par leur teneur en BAP. Pour *C. anomala*, les cals repiqués proviennent des cultures sur milieu de base contenant 4 mg.L⁻¹ de 2,4-D tandis que ceux de *C. acuminata* sont issus des cultures en présence de 3 mg.L⁻¹ de 2,4-D.

Pour le développement des néoformations

Des bourgeons néoformés de *C. anomala* et des embryons somatiques de *C. acuminata* sont sous-cultivés dans le même milieu de base additionné de 4 mg.L⁻¹ de 2,4-D et 2 mg.L⁻¹ de BAP. En effet, les essais préliminaires ont montré que les autres combinaisons 2,4-D/BAP n'ont aucun effet sur le développement des bourgeons et des embryons somatiques. L'effectivité des différents milieux est évaluée en notant au cours du temps la longueur de la tigelle, le nombre de feuilles nouvellement formées ainsi que le nombre d'embryons somatiques en germination.

Conditions de culture

Les milieux de culture ajustés à pH 5,6 sont distribués dans les tubes de culture avec bouchon, puis stérilisés à 115 °C pendant 30 min sous une pression de 1,5 kg.cm⁻². Les ensemencements et les sous-cultures se font sous une hotte à flux laminaire horizontal au voisinage de la flamme d'un bec Bunsen. Les tubes ensemencés sont bouchonnés et scellés avec du parafilm, puis placés dans une salle de culture à la température de 26 ± 1 °C sous un éclairage de 40 µmol.m⁻².s⁻¹ pendant 16 heures par jour.

Résultats

La callogénèse

Pour les deux espèces de *Cola*, les cals sont obtenus environ 35 jours après mise en culture des fragments d'organes. Le pourcentage de callogénèse est évalué pour chaque type d'explant de chaque espèce en fonction de la concentration en 2,4-D du milieu de culture (figure 1). Quelle que soit l'espèce utilisée, le pourcentage de callogénèse est généralement faible lorsque les explants proviennent de feuilles. Pour les deux espèces, des teneurs de 3 à 4 mg.L⁻¹ en 2,4-D sont favorables à la callogénèse sur cotylédons, les taux étant de 49 et 37 % pour

ces deux teneurs chez *C. anomala* et de 37 et 35 % pour *C. acuminata*. Il en est de même pour les tiges, avec d'excellents résultats pour 4 mg.L⁻¹ de 2,4-D chez *C. anomala*, où un taux de callogénèse de 85 % est observé. Seule cette dernière condition de culture permet d'obtenir un taux de callogénèse supérieur à 50 %. Tous les cals obtenus sont friables et diffèrent légèrement par leur couleur. Ainsi, les fragments de cotylédons donnent des cals rougeâtres pour *C. anomala*, blancs jaunâtres pour *C. acuminata* alors que, pour les deux espèces, les fragments de tiges fournissent des cals jaunâtres et les fragments de feuilles des cals blanchâtres.

Régénération et développement des néoformations

Étant donné les résultats obtenus en callogénèse, les études de régénération et de développement ont été effectuées uniquement avec les cals issus des fragments de tiges cultivés dans 4 mg.L⁻¹ de 2,4-D pour *C. anomala* et 3 mg.L⁻¹ de 2,4-D pour *C. acuminata*.

Pour les cals de *C. anomala*, le transfert sur milieu contenant de la BAP conduit à la formation des bourgeons, mais une réponse positive n'est observée que pour des teneurs en BAP comprises entre 1,5 et

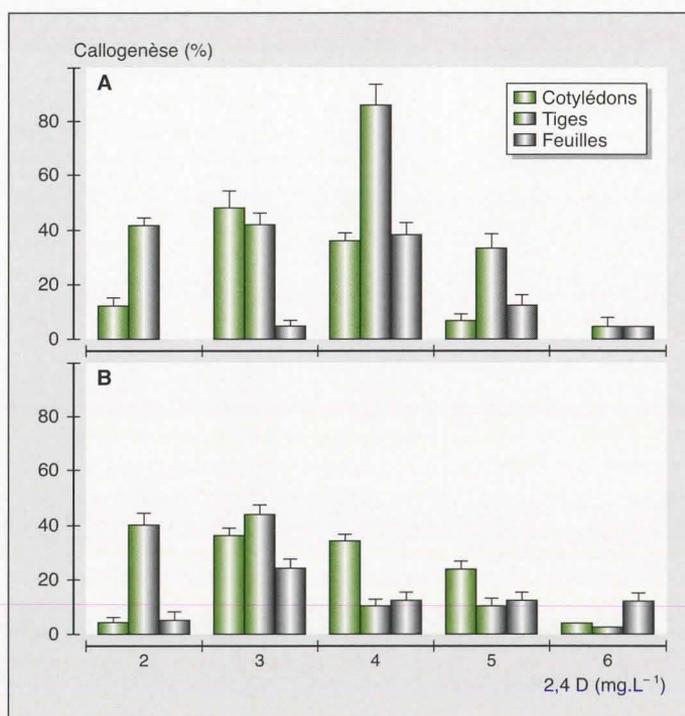


Figure 1. Taux de callogénèse obtenu à partir des fragments de cotylédons, de tiges et de feuilles issus de jeunes germinations de *Cola anomala* (A) et de *C. acuminata* (B) mis en culture en présence de teneurs variables en 2,4-D (n = 40).

Figure 1. Frequency of callogenesis obtained from cotyledons fragments, stems and leaves fragments stemming from young germinated plantlets of *Cola anomala* (A) and *C. acuminata* (B) cultivated in a basal medium supplemented with different concentrations of 2,4-D (n = 40).

3,5 mg.L⁻¹ (tableau 2) avec des pourcentages maximum observés aux concentrations de 2 et 2,5 mg.L⁻¹ (respectivement 13 et 21 %). À ces concentrations, les cals renferment un nombre total de 15 à 29 bourgeons, soit environ 4 bourgeons par cal (tableau 2). Trois mois après sous-culture des cals, les bourgeons néoformés présentent chacun 2 à 3 feuilles d'aspect grisâtre (figure 2A). Lorsque ces bourgeons sont isolés et sous-cultivés dans MS/2 contenant 4 mg.L⁻¹ de 2,4-D et 2 mg.L⁻¹ de BAP en vue de régénérer les vitroplants, le pourcentage de réussite est de 77 %. Après 3 mois de culture, les néoformations qui se sont développées ont fourni une tigelle d'une longueur moyenne de 3,8 cm comportant en moyenne 7 feuilles qui passent progressivement du gris au vert (figure 2B). Cependant, aucune rhizogenèse n'est observée dans ces conditions de culture.

Pour les cals de *C. acuminata*, la culture sur milieu contenant de la BAP induit la formation d'embryons somatiques pendant le troisième mois de culture. Seules les concentrations en BAP comprises entre 1,5 et 4 mg.L⁻¹ permettent l'expression de cette embryogenèse. Les meilleurs résultats sont obtenus avec 3 et 3,5 mg.L⁻¹ de BAP où le pourcentage de cals embryogènes est respectivement de 31 et 34 % et le nombre total d'embryons est de 147 et 145, soit environ 15 embryons somatiques par cal (tableau 3). Toutefois, le nombre total d'embryons présentant un début de déve-

loppement est faible. En effet, ce nombre ne dépasse pas 40 pour les milieux les plus producteurs, soit un taux de réussite inférieur à 30 %. Les embryons isolés présentent une forme plus ou moins globulaire (figure 2C). Ils peuvent germer et amorcer leur développement sur le cal (figure 2D) ou être isolés et soumis à une deuxième sous-culture dans les mêmes milieux. Dans ce cas, on observe, après la germination, un développement de l'hypocotyle qui peut atteindre 3 à 4 cm de longueur (figure 2E). De même, aucune rhizogenèse n'est observée.

Discussion

Ce travail montre que, en utilisant le même milieu de base enrichi avec le 2,4-D, on peut induire la callogenèse chez *C. anomala* et *C. acuminata* à partir des fragments de cotylédons, de tiges et de feuilles issus de jeunes germinations. La différenciation des bourgeons sur cal est spécifique aux fragments de tiges de *C. anomala* tandis que celle des embryons somatiques sur cal est spécifique des fragments de tiges de *C. acuminata*. Ces deux processus morphogénétiques sont notés lorsque les cals issus des milieux contenant le 2,4-D (3 à 4 mg.L⁻¹) sont sous-cultivés sur milieu additionné de la BAP. L'obtention de bourgeonnement chez *C. anomala* est un résultat original car, à partir de fragments d'organes de plantes ligneuses telles que le cacaoyer [20, 21] ou le manquier [22], il est plus courant d'observer la formation d'embryons somatiques.

Même si le nombre total de bourgeons néoformés est relativement faible, l'obtention de régénération est intéressante pour la propagation de l'espèce, si toutefois la rhizogenèse peut être obtenue lors de la dernière mise en culture. Cette absence de rhizogenèse a déjà été observée par Dufour et Dublin [23] et par Figueira et Janick [20] chez le cacaoyer ainsi que par Enjalric [15] chez l'hévéa. Pour ces auteurs, l'association d'une auxine et d'une cytokinine en phase d'allongement semble être indispensable. L'absence de formation de racines en conditions de culture *in vitro* rappelle la difficulté d'obtention de racines des boutures classiques [12, 24]. L'obtention d'embryogenèse somatique chez *C. acuminata* est en revanche en parfait accord avec les résultats généralement obtenus chez les espèces ligneuses [21, 25, 26]. Bien qu'aucune rhizogenèse n'ait pu être observée, l'ensemble de ces résultats ouvre une nouvelle voie dans l'étude de la régénération du genre *Cola* en général et plus particulièrement de l'espèce *C. acuminata* pour laquelle un nombre important d'embryons somatiques a été obtenu.

Conclusion

L'objectif de ce travail était de faire une étude comparée de la régénération *in vitro* de *C. anomala* et *C. acuminata* en vue de leur propagation. Il a été montré que les explants utilisés cultivés dans les mêmes milieux permettent d'obtenir les cals chez ces deux espèces. Avec les

Tableau 2

Effet de la BAP sur la prolifération des bourgeons néoformés à partir de cals issus des fragments de tiges de *C. anomala*

BAP (mg.L ⁻¹)	Cals donnant des bourgeons (%)	Nombre total de bourgeons néoformés
1,5	2	2
2,0	13	15
2,5	21	29
3,0	9	9
3,5	2	2

Les cals (32 par essai) ont été induits pendant 35 jours sur milieu de base contenant 4 mg.L⁻¹ de 2,4-D puis repiqués pendant 3 mois (avec une sous-culture par mois) sur milieu de base additionné de différentes concentrations de BAP.

Effect of BAP on bud formation on calli from *C. anomala* stem fragments

Tableau 3

Effet de la BAP sur la formation des embryons somatiques à partir des cals issus des fragments de tiges de *C. acuminata*

BAP (mg.L ⁻¹)	Cals donnant des embryons (%)	Nombre total d'embryons somatiques	Nombre total d'embryons germant
1,5	4	7	1
2,0	4	10	1
2,5	11	32	3
3,0	31	147	40
3,5	34	145	38
4,0	7	10	1

Les cals (32 par essai) ont été induits pendant 35 jours sur milieu de base contenant 3 mg.L⁻¹ de 2,4-D puis repiqués pendant 3 mois (avec une sous-culture par mois) sur milieu de base additionné de différentes concentrations de BAP.

Effect of BAP on the formation of somatic embryos by calli from *C. anomala* stem fragments

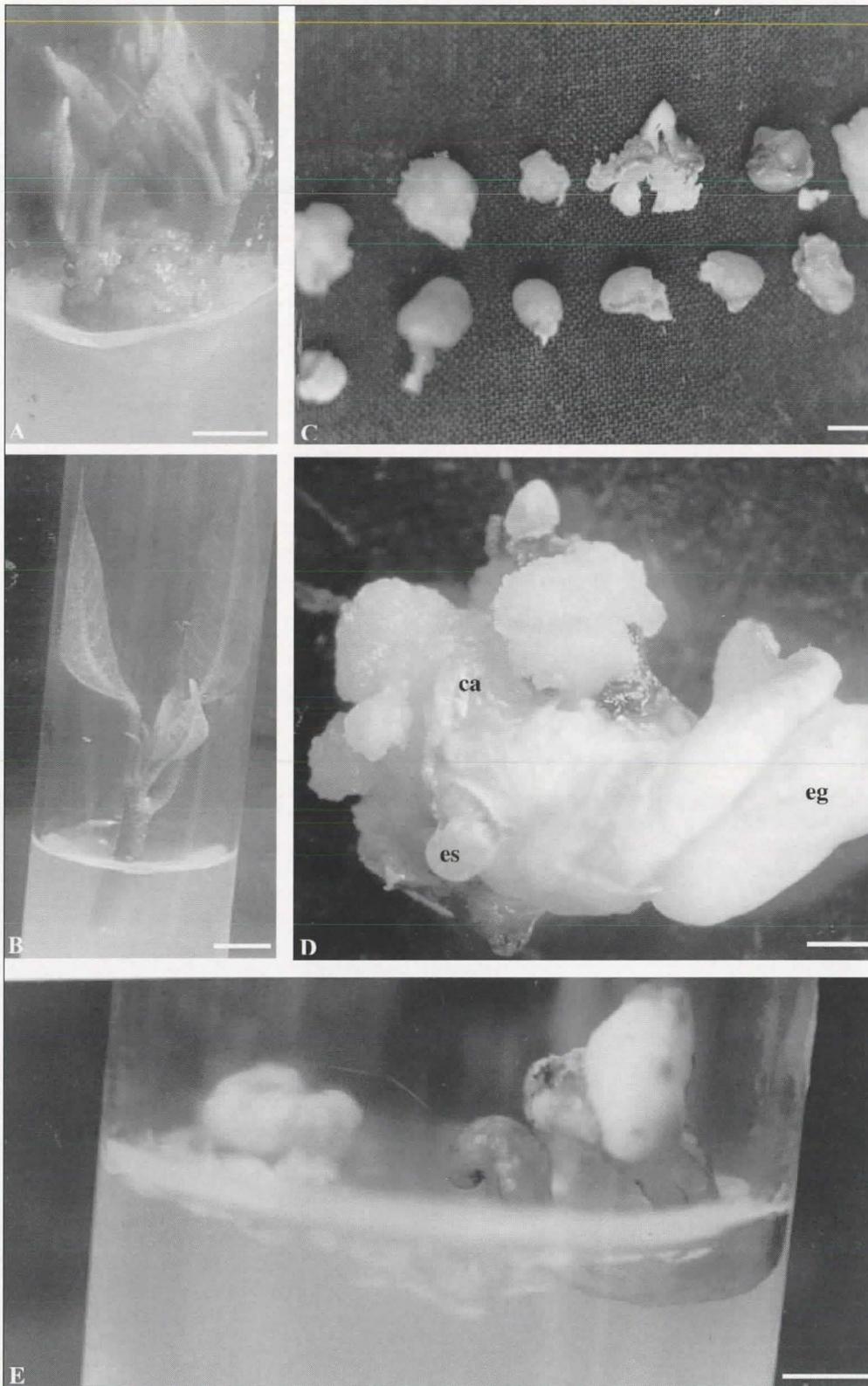


Figure 2. Régénération de *C. anomala* et embryogenèse somatique chez *C. acuminata*. **A.** Prolifération des bourgeons sur cals issus de fragments de tiges de *C. anomala* sur le milieu de base enrichi en BAP $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$. **B.** Bourgeons néoformés de *C. anomala* après 3 mois de sous-culture sur le milieu de base additionné de 2,4-D (4 mg.L^{-1}) et BAP (2 mg.L^{-1}). **C.** Morphologie des embryons somatiques isolés des cals de *C. acuminata*. **D.** Cal (ca) portant des embryons somatiques au stage globulaire (es) et présentant un début de développement (eg) sur le milieu de base contenant 3 mg.L^{-1} de BAP. **E.** Embryons somatiques germés avec un développement d'hypocotyle (échelle = $0,2 \text{ cm}$).

Figure 2. Regeneration in *C. anomala* and somatic embryogenesis in *C. acuminata*. **A.** Bud proliferation on callus stemming from stems fragments of *C. anomala* on a basal medium supplemented with 2.5 mg.L^{-1} BAP. **B.** 3-month old *C. anomala* neoformed buds in a basal medium containing 4 mg.L^{-1} 2,4-D and 2 mg.L^{-1} BAP. **C.** Morphology of somatic embryos isolated from calli of *C. acuminata*. **D.** Callus (ca) with globular somatic embryos (es) and developed embryos (eg) on a basal medium supplemented with 3 mg.L^{-1} BAP. **E.** Germinating somatic embryos showing hypocotyl (scale = 0.2 cm).

explants de cotylédons et de tiges issus de jeunes germinations, le 2,4-D à 3 ou 4 mg.L⁻¹ est favorable à la callogenèse. Avec les feuilles issues de jeunes germinations, le processus s'amenuise. Selon l'espèce, la remise en culture des cals issus des tiges permet la formation de bourgeons ou d'embryons somatiques pour, respectivement, *C. anomala* et *C. acuminata*. Bien qu'on ait noté un début de développement de ces bourgeons et de ces embryons, leur évolution en plantules entières n'a pas été concluante. Des études approfondies restent à faire afin de surmonter les difficultés d'obtention de la rhizogénèse. Une étude histologique des cals et des embryons somatiques devra également être développée ■

Remerciements

Les auteurs remercient les Drs Nicolas Niemenak, Margaret Awah Tita ainsi que M. Joseph Nankeu (École normale supérieure, LAF 314, Yaoundé) pour leur parfaite collaboration.

Références

1. Nkongmeneck BA. Le genre *Cola* au Cameroun. *Ann Fac Sc Biol Biochem* 1985 ; 3 : 5-27.
2. Morton JF. Widespread tannin intake via stimulants and masticatories, especially guarana, kola nut, betelvine, and accessoires. In : Hemingway RW, Laks PE, eds. *Plant polyphenols*. New York : Plenum Press, 1992 : 739-65.
3. Eka OU. Chemical composition and uses of kola nuts. *J West Af Sci Assoc* 1971 ; 16 : 167-9.
4. Ogutuga DBA. Chemical composition and potential commercial uses of kola nut, *Cola nitida*, Vent. (Schott and Endlicher). *Ghana J Agri Sci* 1975 ; 8 : 121-5.
5. Oladokun MAO. Germination studies on *Cola acuminata*. *Turialba* 1985 ; 35 : 109-15.
6. Oladokun MAO. *Morpho-physiological aspects of germination, rooting and seedling growth in Kola (Cola spp.)*. Ph. D thesis, University of Ibanda, Nigeria 1982 ; 320 p.
7. Clay DWT. Vegetative propagation of Kola (*Cola nitida* Vent. (Schott and Endlicher)). *Trop Agri* 1964 ; 41 : 61-8.
8. Eijnatten CLM. *Kola: its botany and cultivation*. Department of Agricultural Research of the Royal Tropical Institute (Amsterdam) Communication 1969 ; 56 : 100 p.

Summary

Comparative study of *in vitro* regeneration of *C. anomala* and *C. acuminata*

M. Fotso, D. Omokolo Ndoumou, D. Mbouna

Fragments of cotyledons, stems and leaves stemming from young germinated plantlets of *C. anomala* and *C. acuminata* were cultured on half strength Murashige and Skoog medium (MS/2) supplemented with 2 mg.L⁻¹ to 6 mg.L⁻¹ of 2,4-Dichlorophenoxy acid (2,4-D). For both species, the best percentage of success, 85 and 44% for *C. anomala* and *C. acuminata* respectively are obtained with stems. The maximum percentage of callogenesis are observed for *C. anomala* with 3 and 4 mg.L⁻¹ of 2,4-D. When the calli issued from stem fragments are cultured on the same basic medium supplemented with benzylaminopurine (BAP), we observe the proliferation of buds in *C. anomala*, particularly with 2.5 mg.L⁻¹ of BAP. Meanwhile, in *C. acuminata*, we observe the formation of somatic embryo, maximal at 3 mg.L⁻¹ of BAP. The culture of buds in *C. anomala* on the basic medium supplemented with 2,4-D (4 mg.L⁻¹) and BAP (2 mg.L⁻¹) permits the elongation of shoots and the formation of new leaves in most cases, but without forming roots. For *C. acuminata*, 27% of the somatic embryos formed, maintained on calli or isolated and sub-cultured on the same media germinate and develop into plantlets.

Cahiers Agricultures 2002 ; 11 : 355-60.

9. Dublin P. La multiplication végétative et l'amélioration de *Cola nitida*. *Café Cacao Thé* 1970 ; 14 : 275-94.
10. Ashiru GA, Quarcoo T. Vegetative propagation of Kola (*Cola nitida* Vent. (Schott and Endlicher)). *Trop Agri* 1971 ; 48 : 85-92.
11. Dublin P. Le kolatier (*Cola nitida*) en République centrafricaine : culture et amélioration. *Café Cacao Thé* 1965 ; 9 : 294-306.
12. Dossa EL, Bertrand B, Aidam A. Microbouturage *in vitro* du *Cola nitida* Vent. (Schott et Endlicher). *Café Cacao Thé* 1994 ; 38 : 57-60.
13. Etienne-Barry D, Bertrand B, Vasquez N, Etienne H. Direct sowing of *Coffea arabica* somatic embryos mass-produced in a bioreactor and regeneration of plants. *Plant Cell Rep* 1999 ; 19 : 111-7.
14. Michaux-Ferrière N, Grout H, Carron MP. Origin and ontogenesis of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae). *Am J Bot* 1992 ; 79 : 174-80.
15. Enjalric F. Étude sur le microbouturage *in vitro* de *Hevea brasiliensis*. Mull Arg. Thèse de doctorat 3^e cycle, Université de Paris-sud, Orsay, France, 1983 ; 161 p.
16. Lopez-Baez O, Bollon H, Eskes A, Pétiard V. Embryogenèse somatique du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) à partir des pièces florales. *CR Acad Sci Paris* 1993 ; 316 : 579-84.
17. Guiltinan MJ, Siela M. *Recent advances in the tissue culture of cocoa from somatic embryos to bentwood gardens: a short review*. Proceedings of the International Workshop on New Technologies and Cocoa Breeding, 16-17 October 2000, Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia : 157-62.
18. Murashige T, Skoog G. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 1962 ; 15 : 473-97.
19. Morel G, Wetmore RH. Fern callus tissues culture. *Ann J Bot* 1951 ; 38 : 141-3.
20. Figueira A, Janick J. Development of nucellar somatic embryos of *Theobroma cacao* L. *Acta Hort* 1993 ; 336 : 213-36.
21. Li Z, Traore A, Maximova Siela N, Guiltinan M. Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using thidiazuron. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 1998 ; 34 : 293-9.
22. Litz RE. *In vitro* somatic embryogenesis from nucellar callus of nonembryonic *Mangifera indica* L. *Hort Sci* 1994 ; 19 : 715-7.
23. Dufour M, Dublin P. Quelques données sur la multiplication végétative *in vitro* des cacaoyers cultivés (*Theobroma cacao*). *Café Cacao Thé* 1985 ; 24 : 235-44.
24. Palacios JB, Monteiro WR. *Mass Multiplication on a semi-industrial scale of coca clones by rooted cuttings in Brazil*. Proceedings of the International Workshop on New technologies and Cocoa Breeding, 16-17 October 2000, Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia : 178-84.
25. Michaux-Ferrière N, Dublin P, Schwendiman J. Étude histologique de l'embryogenèse somatique à partir d'explants foliaires de *Coffea arabica* L. *Café Cacao Thé* 1987 ; 31 : 103-14.
26. Van Boxel J, Berthouly M. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. Factors influencing embryogenesis, and subsequent proliferation and regeneration in liquid medium. *Plant Cell Tiss Org Cult* 1996 ; 44 : 7-17.

Résumé

Les fragments de cotylédons, de tiges et de feuilles issues de jeunes germinations de *C. anomala* et de *C. acuminata* sont cultivés sur le milieu de Murashige et Skoog dilué de moitié (MS/2) contenant de 2 à 6 mg.L⁻¹ d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D). Pour les deux espèces, les tiges fournissent le meilleur rendement, présentant respectivement 85 et 44 % de réussite pour *C. anomala* et *C. acuminata*. Les pourcentages maximum de callogenèse sont observés pour *C. anomala* aux concentrations de 3 et 4 mg.L⁻¹ en 2,4-D. Lorsque les cals issus des fragments de tiges sont mis en culture dans le même milieu de base enrichi en benzylaminopurine (BAP), on observe une prolifération de bourgeons chez *C. anomala* particulièrement en présence de BAP à 2,5 mg.L⁻¹. En revanche, chez *C. acuminata*, on observe la formation d'embryons somatiques, maximale en présence de BAP à 3 mg.L⁻¹. La mise en culture des bourgeons de *C. anomala* sur le milieu de base enrichi en 2,4-D (4 mg.L⁻¹) et BAP (2 mg.L⁻¹) permet l'allongement de la tigelle et la formation de nouvelles feuilles dans la plupart des cas, mais non de rhizogenèse. Pour *C. acuminata*, 27 % des embryons somatiques formés, maintenus sur cals ou isolés et sous-cultivés dans les mêmes milieux, germent et présentent un début de développement en plantules.
