

Callogenèse et micropropagation de *Bidens pilosa* Linn*

Emmanuel Fotso, Victor Bikay Bikay, Afa Focho Derek

B*idens pilosa* Linn. est utilisée en médecine traditionnelle dans le traitement des maladies (paludisme, dysenterie, conjonctivite, otites, etc.) [1, 2]. Ses propriétés médicinales sont dues à la présence dans ses tissus de phénylheptatryne et de dérivés du triophène, substances naturelles antimicrobiennes [2]. La fabrication industrielle de substances médicamenteuses à partir de *Bidens pilosa* nécessiterait d'importantes quantités de biomasse, condition difficilement réalisable dans les pays où cette espèce est rare. Une solution à ce problème consisterait en la création de nouvelles variétés de *Bidens pilosa*, capables de produire des quantités plus élevées de substances actives. Cette création variétale pourrait être obtenue soit par des croisements, soit par des variants performants [3]. On tenterait alors de reproduire fidèlement ces variants suivant les techniques classiques de micropropagation conforme.

Le but du présent travail est de déterminer les conditions optimales de callogenèse et de régénération conforme chez *Bidens pilosa* Linn.

Le matériel de départ est constitué de graines de *Bidens pilosa* récoltées dans le jardin de l'université de Yaoundé I. Ces graines sont désinfectées au Mercryl Lauryle® (10 % vol.) et à l'hypochlorite de calcium 2 %. Elles sont ensuite mises à

germer sur de l'eau gélosée stérile (0,4 %). Le développement des plantules s'effectue dans le milieu de base (milieu minéral de Murashige et Skoog + 0,6 % agar-agar + 3 % saccharose = MB). Après 28 jours de culture, les limbes foliaires, les fragments de racine et d'hypocotyle (1 à 3 cm) sont prélevés et repiqués dans les milieux collagènes ($M_1 = MB + 2,4-D \ 5 \text{ mg/L}$, $M_2 = MB + \text{kinétine } 5 \text{ mg/L}$, $M_3 = MB + \text{kinétine } 5 \text{ mg/L} + \text{ANA}^1 \ 1 \text{ mg/L}$, et $M_4 = MB + \text{kinétine } 5 \text{ mg/L} + \text{ANA } 1 \text{ mg/L} + \text{lait de coco } 10 \%$). Les cals obtenus sont repiqués dans le même milieu tous les 28 jours. Les bourgeons néo-formés sont transférés dans MB + BAP² ou MB + ANA (0 à 10 mg/L). Les milieux de culture et le matériel de dissection sont désinfectés à l'autoclave à 115 °C pendant 30 min. Les ensemencements et les repiquages se déroulent en conditions aseptiques, sous une hotte à flux laminaire horizontale. Les cultures sont réalisées à $25 \pm 1 \text{ °C}$, sous une luminosité de 2 000 lux et une photopériode de 8 heures d'éclairément.

Résultats

Dans le cadre de la micropropagation conforme, avec une concentration de l'ANA dans le milieu de culture inférieure à 1 mg/L, le développement des bourgeons est lent, la taille du vitroplant étant inférieure à 3 cm après 28 jours de culture. Les fortes concentrations d'ANA

stimulent la formation et le développement des racines. L'augmentation de la concentration en BAP dans le milieu de culture entraîne une baisse de croissance mais accroît le nombre de bourgeons axillaires. En présence de 5 ou 10 mg/L de BAP, chaque explant produit en moyenne 12 nouveaux bourgeons dont la taille n'excède pas 3 cm (tableau 1). Après 21 jours d'incubation, des cals blanchâtres apparaissent à la surface des explants (photos A et B) ; ces cals grossissent et leur aspect varie avec le régulateur de croissance utilisé. En présence de 2,4-D, des cals se forment sur les trois types d'explants, à des taux variables : 57 % pour les feuilles, 72 % pour les racines et 62 % pour l'hypocotyle (tableau 2). Ces cals sont friables, blanchâtres, pâteux et n'ont aucun pouvoir organogène.

La kinétine induit la formation des cals sur les racines avec un taux maximal de 90 %. Ce taux est obtenu avec 5 mg/L de kinétine tandis que les concentrations plus faibles donnent un taux inférieur à 30 % (tableau 2). La combinaison de l'ANA et de la kinétine donne un taux de callogenèse moyen supérieur à 70 %, quelle que soit la nature de l'explant.

Les poids frais et secs des cals sont évalués tous les quatre jours pendant 28 jours ; les résultats montrent que, en présence de 2,4-D ou de kinétine, les poids frais et secs augmentent au cours du temps pour atteindre un maximum (respectivement 2,6 et 4 g de poids frais ; 0,20 et 0,25 g de poids sec), 16 à 20 jours après repiquage (tableau 2).

Quel que soit le type d'explant utilisé, les cals bourgeonnent dès le 4^e jour de culture (photo C). Le nombre de bourgeons par cal varie avec la nature de l'explant et la concentration de la BAP dans le milieu de culture. Ce nombre est compris entre $4,5 \pm 0,45$ et 10 ± 2 pour les cals provenant des feuilles, et entre 45 ± 4 et $99 \pm$

E. Fotso, V. Bikay Bikay, A. Focho Derek : Université de Dschang, Faculté des sciences, Laboratoire de physiologie végétale, BP 67, Dschang, République du Cameroun. <fotsoe@yahoo.fr>

Tirés à part : E. Fotso

Thèmes : Méthodologie ; Physiologie végétale.

* Ce travail est réalisé dans le cadre d'un projet de recherche sur la domestication des plantes médicinales traditionnelles du Cameroun. Nous tenons à remercier tous ceux qui ont participé à sa réalisation.

¹ ANA = Acide naphthalène acétique.

² BAP = Benzylaminopurine.

Tableau 1

Évolution des paramètres biométriques en fonction de la concentration d'acide naphthalène acétique et de benzylaminopurine

	Benzylaminopurine				Acide naphthalène acétique			
	0 mg/L	1 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	0 mg/L	1 mg/L	5 mg/L	10 mg/L
Taille de la plante (cm)	5,7 ± 0,5	4,4 ± 0,8	2,3 ± 0,7	1,1 ± 0,4	11,0 ± 1,6	10 ± 1	2,2 ± 0,2	1,4 ± 0
Longueur des racines (cm)	0,5 ± 0	2,1 ± 0,3	8,0 ± 1,8	12,0 ± 1,4	11,1 ± 1,5	11,6 ± 0,8	4,0 ± 1,0	2,6 ± 1,4
Nombre de racines	2,5 ± 0,8	1,7 ± 0,5	0,7 ± 0,2	0,4 ± 0	2,6 ± 0,8	4,2 ± 0,7	12,8 ± 1,4	14,0 ± 1,7
Bourgeons F	4,5 ± 0,4	5,3 ± 0,8	8,7 ± 1,9	10 ± 2	-	-	-	-
Bourgeons H	47,0 ± 4,2	58,1 ± 6	72,5 ± 8,3	109,7 ± 8,2	-	-	-	-

Bourgeons F : nombre de bourgeons issus des cals foliaires ; bourgeons H : nombre de bourgeons issus des cals hypocotylaires.

Evolution of biometric parameters as a function of naphthalene acetic acid and benzylaminopurin

8 pour les cals issus des hypocotyles (tableau 1). Les bourgeons formés sur les cals ne portent pas de racines ; leur transfert sur un milieu contenant de l'AIA³ (1 mg/L) entraîne une formation des racines à la base du bourgeon. Le repiquage des cals d'origine racinaire sur milieu contenant la BAP et l'ANA produit des racines qui se ramifient abondamment (photo B). Les vitroplants dont la taille est supérieure à 7 cm sont transférés en serre sur un substrat composé d'un mélange de terre (50 %) et de vermiculite (50 %). Ils sont ensuite transférés en champs après 7 jours d'acclimatation.

Discussion et conclusion

L'ANA favorise le développement de l'appareil racinaire, tandis que la BAP

³ AIA = Acide indolacétique.

stimule la formation et la multiplication d'embryons somatiques. Cependant, ces deux phytohormones inhibent la croissance de la tige. De telles actions de ces phytohormones sont signalées en culture *in vitro* pour une variété d'espèces [3, 4]. Le 2,4-D est une auxine essentiellement callogène ; dans nos essais, les cals obtenus dans ces conditions sont pâteux et n'ont aucune potentialité organogène. En revanche, avec la kinétine, nous avons obtenu des cals compacts, rugueux et organogènes, ce qui est rarement rencontré en culture *in vitro*. Le rôle des cytokinines dans la multiplication des bourgeons est bien connu [3, 4]. Tous ces paramètres sont stimulés par le lait de coco. L'utilisation séparée du 2,4-D ou de kinétine donne naissance à des cals de poids faible. La croissance des cals est stimulée par la combinaison d'ANA, de kinétine et de lait de coco. Bien que les auxines et les cytokinines soient souvent considérées comme antagonistes, leur utilisation simultanée

a parfois un effet synergique sur certains processus physiologiques. Skoog et Miller [3] ont montré qu'une prédominance d'auxines favorise le développement de l'appareil racinaire.

Bien que *Bidens pilosa* soit une espèce rudérale, son amélioration nécessite l'utilisation de techniques de micropropagation pour produire du matériel végétal et pour améliorer les performances médicinales de l'espèce. La production des variants à haute performance passe par la maîtrise des techniques de callogenèse et de micropropagation conformes. La multiplication conforme offre la possibilité de la conservation de la biodiversité tout en permettant l'exploitation économique de l'espèce ■

Références

1. Kuate JR. Détermination des teneurs, des propriétés chimiques et des activités anti-microbiennes des huiles essentielles de quelques astéracées utilisées en médecine traditionnelle au Cameroun. Thèse Doct 3^e cycle, Fac Sci, Univ Yaoundé, 1993 : 20-69.
2. Bondarenko AS, Petrenko GT, Aizenmann BE, Evsenko OV. Antimicrobial properties of phenylheptatriyne, a polyacetylene antibiotic. *Microbiol* 1985 ; 47 : 81-3.
3. Skoog F, Miller CO. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue culture *in vitro*. *Symp Soc Exp Biol* 1957 ; 11 : 118-21.
4. Waren-Wilson J, Waren-Wilson PM. Effect of auxin concentration on the dimension and patterns of tracheary element differentiating in pith explants. *Ann Bot* 1991 ; 68 : 463-7.
5. Boxus P. The production of strawberry plants by *in vitro* micropropagation. *J Hort Sci* 1974 ; 49 : 209-10.

Tableau 2

Callogenèse dans les milieux de culture M₁, M₂, M₃ et M₄

	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄
Pourcentage de callogenèse				
• Explant foliaire (%)	57,0 ± 5,1	16,1 ± 3,4	70,7 ± 1,3	72,0 ± 2,7
• Explant racinaire (%)	72,3 ± 3,2	90,5 ± 1,2	100	100
• Explant hypocotyle (%)	62,7 ± 2,7	24,5 ± 6,7	86,3 ± 0,9	92,2 ± 1,1
Poids frais des cals (g)	2,6 ± 0,6	4,0 ± 0,5	3,5 ± 0,08	3,9 ± 0,11
Poids sec des cals (g)	0,18 ± 0,02	0,25 ± 0,17	0,24 ± 0,12	0,25 ± 0,10

Callogenesis in the M₁, M₂, M₃ and M₄ media

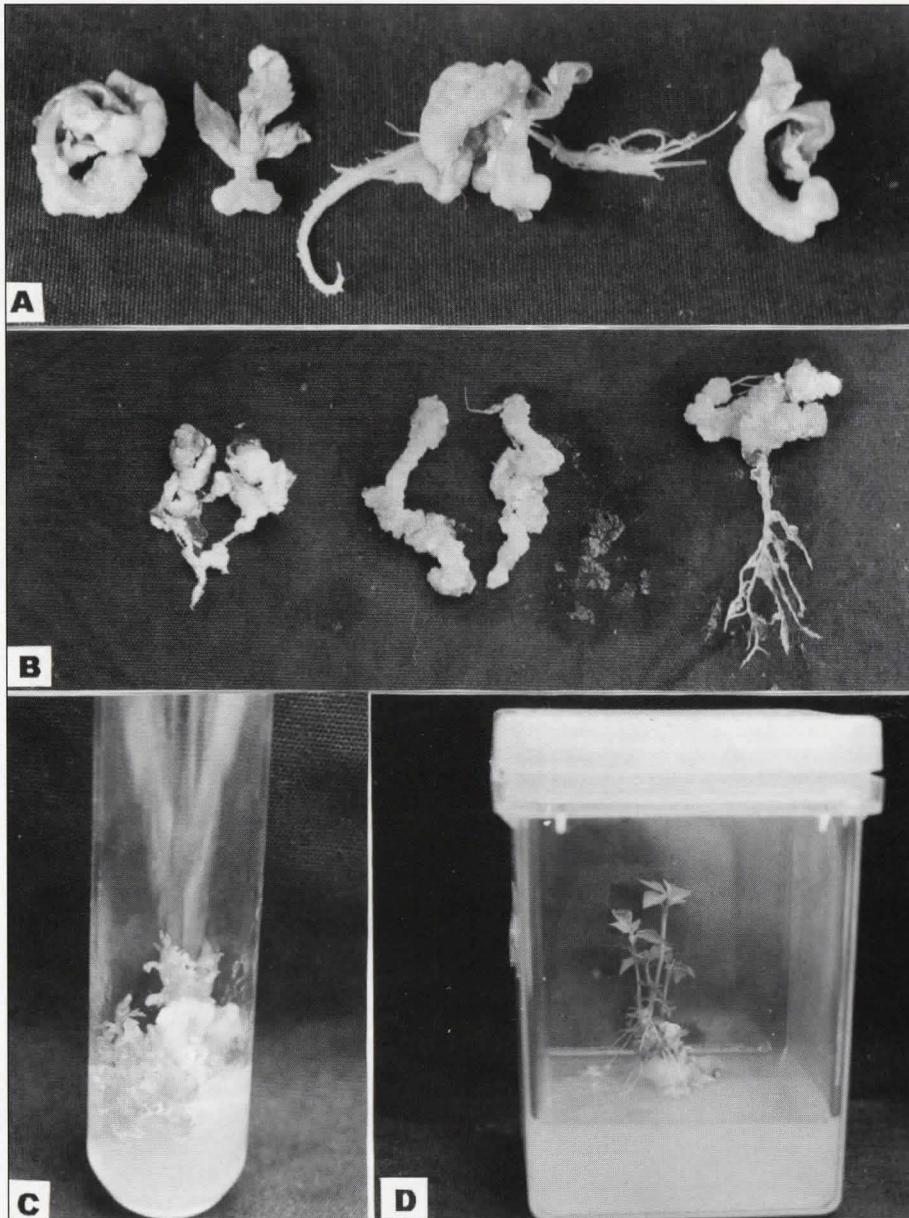


Photo. Callogenèse et rhyzogenèse à partir des explants foliaires (A) et racinaires (B). Néo-formation de bourgeon (C) et régénération de la plante (D).

Photo. Callogenesis and rhyzogenesis from leaves (A) and root (B) cuttings. Bud formation (C) and plant regeneration (D).

Summary

Callogenesis and micropropagation of *Bidens pilosa* Linn

E. Fotso, V. Bikay Bikay, A. Focho Derek

Bidens pilosa Linn is a tropical plant used in traditional medicine to cure fever, malaria, dysentery, ulcers, neuralgia, lombalgia and gastritis. These therapeutic properties are linked to phenylheptatriyn, triophene derivatives and other essential oils present in its tissues. However, the industrial extraction of these active compounds is limited by their low content in the plant and the rarity of *Bidens pilosa* in industrialized countries. We were interested in the selection of *B. pilosa* with high medicinal potential and their reproduction by conform micropropagation. Cuttings of *Bidens pilosa* Linn. were maintained in a basic medium supplemented with growth regulators. Axillary buds developed on shoot tips and single node-cuttings after 10 days of culture. Their number increased with the concentration of 6-benzylaminopurin in the medium (Table 1). Calli were obtained by adding kinetine and 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (Table 2, Photos A and B). Addition of naphthalene acetid acid allowed the development of 10 buds per callus originating from leaves and over 100 buds per stem-derived callus (Table 1, Photo C). Vitroplants achieved their growth in the basic medium supplemented with 1 mg/L indolacetic acid (Photo D). Hardening of vitroplants occurred on earth/vermiculite substrate (1:1).

Cahiers Agricultures 2002 ; 11 : 399-402.

Résumé

Bidens pilosa Linn est une plante tropicale utilisée en médecine traditionnelle dans le traitement des maladies (paludisme, dysenterie, conjonctivite, otites, etc.). Ses propriétés thérapeutiques sont dues à l'existence de phénylheptatryne et de dérivés du triophène dans ses tissus. Le développement d'une activité industrielle d'extraction de ces substances nécessiterait d'importantes quantités de biomasse pour une espèce peu abondante. Le projet est d'utiliser les techniques classiques de micropropagation conforme pour multiplier les plants obtenus après sélection. Les plantules issues d'explants foliaires et racinaires du *Bidens pilosa* Linn sont développées sur un milieu de base, supplémenté avec des régulateurs de croissance. Le développement des bourgeons axillaires est lent, leur nombre augmentant en présence de 6-Benzylaminopurine. L'acide naphthalène acétique stimule la formation et le développement de racines. La callogenèse est obtenue par addition de 2,4-D et de kinétine. La croissance des cals est stimulée par la combinaison acide naphthalène acétique-kinétine-lait de coco. La maîtrise de la multiplication conforme de *Bidens pilosa* Linn ouvre la voie à l'exploitation économique de l'espèce.
