

Régénération *in vitro* du *Ricinodendron heudelotii*

Fotso¹
Donfagsiteli Tchinda Néhémie²
Duclaire Mbouna¹
Omokolo Ndoumou Denis¹

¹ Laboratoire de physiologie végétale,
LAF314, École normale supérieure,
BP 47,
Yaoundé
Cameroun
<fotsob@yahoo.fr>
<dc_mbouna@yahoo.fr>
<domokolo@yahoo.fr>

² Institut de recherches médicales et
d'études des plantes médicinales (IMPM),
BP 6113,
Yaoundé
Cameroun
<donfagsiteli@yahoo.fr>

Résumé

Les fragments de tige uninodaux et les morceaux d'entre-nœuds prélevés sur une plante adulte de *Ricinodendron heudelotii* âgée de 8 ans sont aseptisés et cultivés sur le milieu de Murashige et Skoog dilué de moitié (MS/2). L'effet de la 6-benzylaminopurine (BAP) (1 à 5 mg/L) a été étudié sur le débourrement et le développement des fragments de tige uninodaux. Avec 4 mg/L de BAP, 100 % des bourgeons débourrent, se développent et donnent des tiges feuillées au bout de 52 jours. Par ailleurs, l'effet de la kinétine (1 à 5 mg/L) a été étudié sur la prolifération des bourgeons au niveau des nœuds des fragments de tige ou sur calcs formés à partir des morceaux d'entre-nœuds, cultivés sur MS/2 enrichi avec 5 à 7 mg/L d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D). Les fragments de tige uninodaux différencient des bourgeons à 86 % en présence de 3 mg/L de kinétine avec en moyenne 8,2 bourgeons par explant. Quant aux calcs, ils différencient des bourgeons à 100 % en présence de 3,5 mg/L de kinétine. À cette concentration, chaque cal présente un nombre moyen de 5,6 bourgeons. L'effet de l'acide naphthalène acétique (ANA) (1 à 2,5 mg/L) a été étudié sur la rhizogenèse. En présence de 1,5 mg/L d'ANA, 85 % des fragments de tige portant une tige feuillée forment des racines contre 21 % des tiges feuillées isolées soit de ces fragments, soit des calcs. L'acclimatation des vitroplants régénérés réussit à 53,4 %. Les conditions ainsi définies dans ce travail constituent une nouvelle voie de production des plants de *Ricinodendron heudelotii* en vue de la propagation et de la domestication de cette espèce.

Mots clés : bouture ; plante à fruit à coque ; régénération *in vitro* ; substance végétale.

Thèmes : productions végétales ; physiologie ; méthodes et outils.

Abstract

In vitro regeneration of *Ricinodendron heudelotii*

Microcuttings and stem fragments from an adult 8-year-old plant of *Ricinodendron heudelotii* were aseptized and cultured on a half strength Murashige and Skoog medium (MS/2). This paper analyses the impact of 6-benzylaminopurine (BAP) (1 to 5 mg/L) on budding and shoot development. With 4 mg/L of BAP, 100% of microcuttings sprout and give shoots after 52 days of culture. This study also examines the effect of kinetin (1 to 5 mg/L) on the proliferation of buds on microcuttings and on calli obtained from stem fragments, cultured on MS/2 supplemented with 5 to 7 mg/L of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D). Eighty-six per cent of microcuttings form buds at 3 mg/L of kinetin with a mean of 8.2 buds per microcutting. A hundred per cent of calli form buds at 3.5 mg/L of kinetin with a mean of 5.6 buds per callus. The effect of naphthalene acetic acid (NAA) (1 to 5 mg/L) on rhizogenesis is also studied. At 1.5 mg/L, 85% of microcuttings with developed axillary buds give roots against 21% of buds isolated from microcuttings or calli and subcultured on the same rooting medium. Acclimatation of plantlets is successful in 53.4% of cases. Conditions defined in this work constitute a new method for producing plantlets of *Ricinodendron heudelotii* in view of the propagation and domestication of this species.

Key words: cuttings; *in vitro* regeneration; nut crops; plant hormones.

Subjects: vegetal productions; physiology; tools and methods.

R*icinodendron heudelotii* (Euphorbiacée) est une espèce forestière à usages multiples en Afrique. Au Cameroun, ses amandes riches en lipides et en vitamines sont récoltées par les populations pour la consommation et la commercialisation (Kapseu et Tchien-gang, 1995 ; Leakey, 1999). Son bois est très utilisé en menuiserie (Anigbogu, 1996). Cette espèce est confrontée à deux problèmes majeurs : d'une part, l'espèce est dioïque, ce qui entraîne le plus souvent une diversité des individus (Fondoun *et al.*, 1998) ; d'autre part, ses graines sont enveloppées d'une coque résistante qui limite considérablement leur germination et par conséquent la régénération naturelle (Mapongmetsem *et al.*, 1998). Comme chez la plupart des arbustes et des arbres forestiers, le bouturage, le marcottage et le greffage qui sont des méthodes de multiplication conformes sont également confrontés à deux problèmes majeurs : la difficulté d'enracinement pour le bouturage et le marcottage et le faible taux de reprise après transplantation du greffon (Dossa *et al.*, 1994 ; Mollet *et al.*, 1995 ; Youmbi, 2000). Actuellement, les méthodes de la culture *in vitro* sont utilisées pour la régénération et la propagation de plusieurs espèces ligneuses à régénération naturelle difficile et pour lesquelles, les techniques de multiplication horticole sont limitées (Dhawan et Bhoswani, 1985 ; Trigiano *et al.*, 1993 ; Ana *et al.*, 1994). Très peu de travaux font état de la régénération *in vitro* de *R. heudelotii*. Toutefois, cette technique pourrait aider non seulement à contourner les difficultés de régénération naturelle et horticole, mais aussi faciliter la production rapide et conforme d'individus sélectionnés pour la domestication. L'objectif de ce travail est la mise au point d'une technique de régénération conforme et de propagation *in vitro* de *Ricinodendron heudelotii*.

Matériel et méthode

Prélèvement et aseptisation du matériel végétal

Des fragments de tige uninodaux d'environ 1,5 cm de longueur ainsi que des morceaux d'entre-nœuds d'environ 1 cm de longueur sont prélevés directement sur une plante adulte (8 ans) ayant déjà fructifié dans la région de Nkolbisson

(Yaoundé-Cameroun). Ces prélèvements se font au niveau des rameaux orthotropes entre les mois de décembre et février, qui correspondent à la période de rajeunissement de l'arbre avec l'apparition de nouvelles pousses feuillées. Ces explants sont soigneusement lavés sous un courant d'eau du robinet puis aseptisés de la manière suivante : trempage dans une solution de Tween 80 (1 %) pendant 15 minutes, trempage dans une solution de Mercryl laurylé (20 %) pendant 45 minutes, trempage dans une solution d'hypochlorite de sodium (3 %) pendant 25 minutes, trois rinçages successifs de 10 minutes chacun avec de l'eau distillée stérile. Cette méthode permet d'obtenir environ 77 % d'explants sains.

Milieus de culture

Pour le débourrement et la croissance des bourgeons axillaires

Les fragments de tige uninodaux après aseptisation sont placés sur un milieu de culture contenant les macro- et microéléments selon Murashige et Skoog (1962) dilués de moitié (MS/2), les vitamines selon Morel et Wetmore (1951), 6 g/L d'agar en poudre (MERCK), 30 g/L de saccharose et de 0 à 5 mg/L de 6-benzylaminopurine (BAP) (SIGMA). Cinquante explants sont mis en culture sur chacun des différents milieux. Le pourcentage des bourgeons axillaires débourrés, la taille moyenne des tiges formées, ainsi que le nombre moyen de feuilles par tige sont notés dans chaque milieu au bout de 52 jours de culture.

Pour la rhizogenèse

Pour l'induction des racines, le milieu de base est le même que celui utilisé pour le débourrement des bourgeons axillaires ainsi que le complexe vitaminique et la concentration en agar. À ce milieu sont ajoutés 60 g/L de saccharose et de 0 à 2,5 mg/L d'acide naphthalène acétique (ANA) (SIGMA). Quarante fragments de tige portant un axe feuillé sont mis en culture sur chacun des 5 milieux. Le pourcentage de tiges feuillées qui forment les racines et le nombre moyen de racines par tige sont notés dans chaque milieu au bout de 65 jours de culture.

Pour la néoformation des bourgeons et leur développement

La néoformation des bourgeons a lieu soit directement sur les fragments de tige uninodaux initiaux, soit sur les cals prove-

nant des morceaux d'entre-nœuds. Dans le premier cas, les fragments de tige uninodaux sont mis en culture sur milieu MS/2 supplémenté de 30 g/L de saccharose, 6 g/L d'agar (MERCK), des vitamines de Morel et Wetmore (milieu de base) et de 0 à 5 mg/L de kinétine (SIGMA). Cinquante explants sont mis en culture sur chaque milieu.

Dans le second cas, les cals sont obtenus en cultivant des morceaux d'entre-nœuds sur le même milieu de base contenant 5 à 7 mg/L de 2,4-D (SIGMA), puis repiqués sur ce même milieu de base supplémenté de 0 à 5 mg/L de kinétine. Quarante cals sont mis en culture pour chacun des milieux. Le pourcentage d'explants qui forment les bourgeons et le nombre moyen de bourgeons par explant sont notés dans chaque milieu au bout de 35 jours pour les microboutures et de 67 jours pour les cals. Les bourgeons néoformés dans les deux cas après isolement et sous-culture sur le même milieu d'enracinement que précédemment, se développent en plantules.

Conditions de culture et acclimatation

Le pH des milieux de culture est ajusté à 5,6 et ceux-ci sont distribués dans des tubes de culture en verre (PYREX) obturés par un bouchon en polycarbonate, puis stérilisés par autoclavage (SULZER) à 115 °C pendant 30 minutes sous une pression de 1,5 kg/cm². Les ensemencements et les repiquages se font sous une hotte à flux laminaire horizontale (MERCAPLEX) 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/m²/s pendant 16 heures par jour par des tubes fluorescents blancs (OSRAM).

Les vitroplants enracinés sont transférés dans des sachets en polyéthylène contenant un mélange terre/vermiculite à volume égal, préalablement stérilisé à l'étuve (RELPE) à 120 °C pendant 1 h 30 min, à raison d'un vitroplant par sachet. Chaque sachet a été recouvert d'une cloche de plastique permettant de confiner l'atmosphère et de réduire la déshydratation. Puis il a été mis dans une chambre de culture maintenue à 26 ± 1 °C, 72 à 76 % d'humidité relative et une photopériode de 16/8. L'acclimatation a été réalisée en réduisant progressivement l'humidité ambiante de la

plantule par diminution régulière du confinement. Les plantules ont été arrosées à l'eau stérile pendant 30 jours, puis à l'eau de robinet pendant les 60 derniers jours d'acclimatation.

Analyses statistiques

Les résultats ont été traités par analyse de variance et les moyennes statistiquement différentes séparées par le test de Duncan ($P < 0,05$).

Résultats

Débourrement et croissance des bourgeons axillaires

L'apport de BAP au milieu de culture stimule le débourrement des bourgeons axillaires. Le débourrement des bourgeons des fragments de tige uninodaux se manifeste après 17 jours de culture (*figure 1A*). Le pourcentage de débourrement est évalué en fonction de la concentration en BAP. À 4 mg/L, on a un taux maximal de 100 % (*tableau 1*). Au bout

de 52 jours de culture, on obtient, à partir des bourgeons débourrés, des tiges feuillées présentant une taille moyenne de 6,3 à 6,7 cm et un nombre moyen de feuilles nouvellement formées de 7,9 à 8,3 avec les teneurs de 3 et 4 mg/L de BAP respectivement (*tableau 1*).

Induction de la rhizogenèse

Les explants initiaux ayant développé les tiges feuillées forment des racines à leur base (*figure 1B*) au bout de 65 jours lorsqu'ils sont repiqués dans le milieu MS/2 enrichi de 1 à 2,5 mg/L d'ANA. On

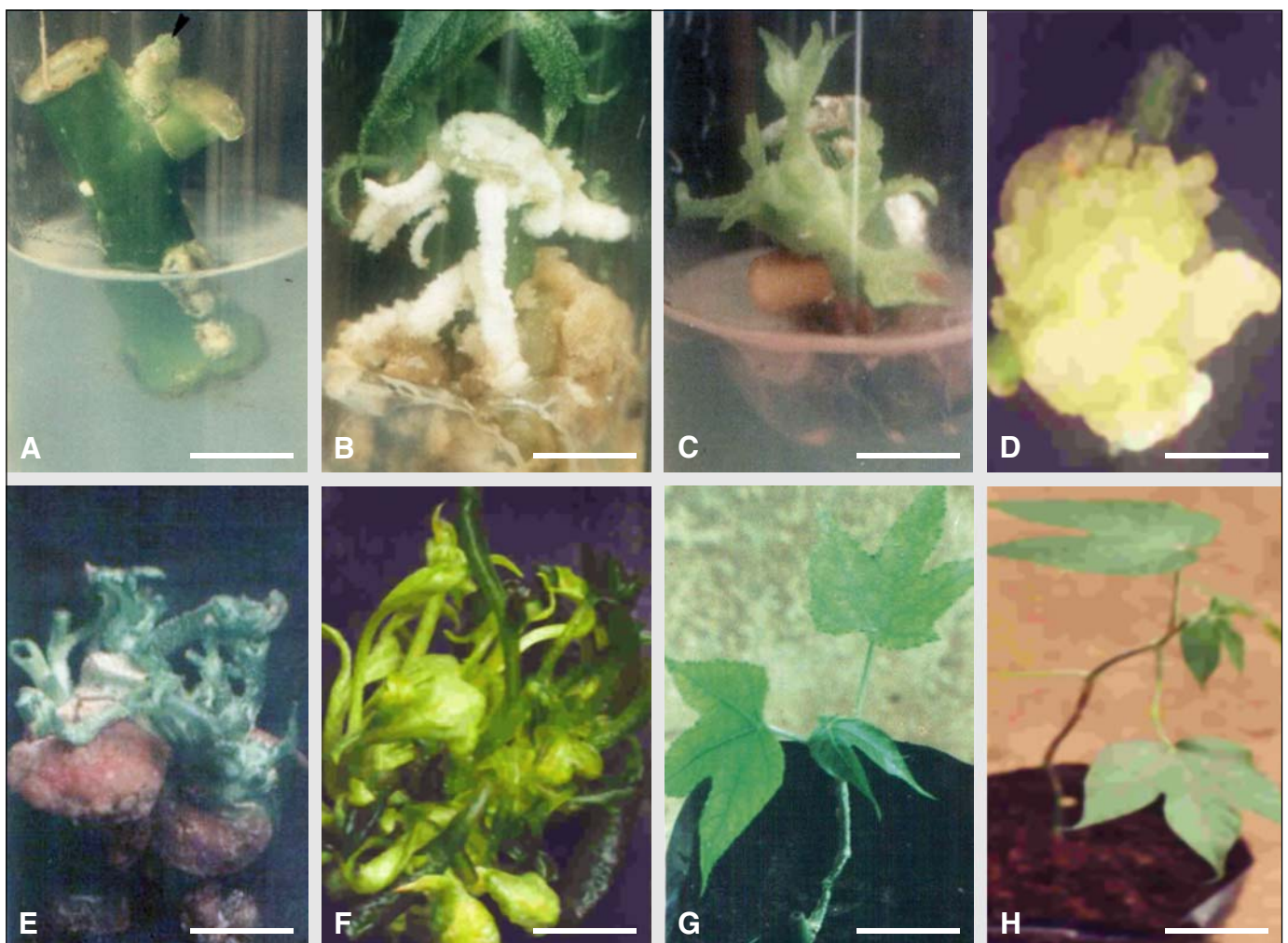


Figure 1. Différentes étapes de la régénération *in vitro* de *Ricinodendron heudelotii* à partir de fragments de tiges uninodaux et de morceaux d'entre-nœuds.

Figure 1. Different stages of *in vitro* regeneration of *Ricinodendron heudelotii* from microcutting and stem fragments.

A) débourrement d'un bourgeon axillaire après 17 jours de culture sur MS/2 + 6-benzylaminopurine (BAP) (4 mg/L) (barre = 0,4 cm) ; B) plantule de *Ricinodendron heudelotii* issue du développement des bourgeons axillaires après 52 jours de culture sur MS/2 + BAP (4 mg/L) et 65 jours de culture sur MS/2 + acide naphthalène acétique (ANA) (2 mg/L) (barre = 1 cm) ; C) prolifération des bourgeons latéraux sur microbouture après 35 jours de culture sur MS/2 + kinétine (3 mg/L) (barre = 0,4 cm) ; D) cal issu des morceaux d'entre-nœuds après 7 jours de culture sur MS/2 + 2,4-D (5 mg/L) (barre = 0,2 cm) ; E) cals ayant différenciés des bourgeons après 21 jours de culture sur MS/2 + kinétine (3,5 mg/L) (barre = 0,2 cm) ; F) croissance des tiges après 67 jours de culture sur le même milieu (barre = 1,5 cm) ; G) plantule acclimatée âgée de 90 jours provenant du développement de fragments de tiges uninodaux (barre = 0,4 cm) ; H) plantule acclimatée âgée de 90 jours provenant du développement de tige feuillée isolée des cals (barre = 1,5 cm).

Tableau 1. Effet de la BAP sur le débourrement et la croissance des bourgeons axillaires de fragments de tige uninodaux de *Ricnodendron heudelotii* au bout de 52 jours de culture.

Table 1. Effect of BAP on the axillary bud development from microcuttings of *Ricnodendron heudelotii* after 52 days of culture.

BAP (mg/L)	Bourgeons axillaires débourrés et développés (%) (cm)	Taille moyenne des tiges	Nombre moyen des feuilles nouvellement formées par tiges
0	0	0,6d	0
1	17	1,7c	2,9
2	41	3,1b	3,3b
3	84	6,3a	7,9a
4	100	6,7a	8,3a
5	18	0,9d	1,1c

Les valeurs de chaque colonne ayant la même lettre ne sont pas significativement différentes d'après le test de Duncan $P < 0,05$; BAP : 6-benzylaminopurine (BAP).

obtient des vitroplants entiers. Le pourcentage d'explants rhizogènes et le nombre moyen de racines formées par explant sont évalués en fonction de la concentration d'ANA. Avec 1,5 mg/L, le maximum d'explants nodaux (85 %) forme des racines et chacun porte en moyenne 4,3 racines (tableau 2). Le pourcentage minimum (14 %) est obtenu à 1 mg/L et chaque explant porte en moyenne 2,2 racines. Ces racines se différencient surtout au niveau de la tige initiale (figure 1B).

Activation et développement de bourgeons latéraux

On note au niveau du nœud des fragments de tige une activation et un développement de bourgeons latéraux autour du bourgeon principal lorsque ces explants initiaux sont cultivés sur milieu MS/2 enrichi en kinétine pendant 35 jours (figure 1C). Le pourcentage de fragments de tige uninodaux qui différencient des bourgeons latéraux et le nombre moyen

de ces bourgeons par explant sont évalués en fonction de la concentration en kinétine. À 3 mg/L, cette phytohormone permet d'obtenir un maximum de 86 % de fragments de tige uninodaux qui différencient des bourgeons latéraux et chacun porte en moyenne 8,2 bourgeons (tableau 3). Lorsque les bourgeons latéraux sont isolés et repiqués sur le milieu d'enracinement des fragments de tige uninodaux, le taux maximum de différenciation des racines par les explants est de 21 % à 1,5 mg/L d'ANA comparé à un taux de 85 % obtenu avec les fragments de tige uninodaux initiaux. À cette concentration, chaque explant porte en moyenne 3,2 racines (tableau 2).

Néoformation de bourgeons sur cal

Les cals sont d'abord induits à 100 % par culture des morceaux d'entre-nœuds pendant 7 jours sur le milieu MS/2 enrichi de 5 à 7 mg/L de 2,4-D (figure 1D). Ces cals repiqués sur le milieu MS/2 enrichi en kinétine commencent à différencier les bourgeons après 21 jours de culture (figure 1E). Au bout de 67 jours, ces bourgeons sont développés en touffes (figure 1F). Le pourcentage des cals qui différencient les bourgeons et le nombre moyen de bourgeons par cal sont évalués en fonction de la concentration en kinétine. Ainsi à 3,5 mg/L, 100 % de cals différencient les bourgeons et chacun porte en moyenne 5,6 bourgeons (figure 1E,

Tableau 2. Effet de l'ANA sur l'induction des racines sur les vitroplants de *Ricnodendron heudelotii* issus des tiges feuillées portées par les fragments de tige uninodaux ou des tiges feuillées isolées des fragments de tige uninodaux ou des cals au bout de 65 jours de culture.

Table 2. Effect of NAA on the rooting of plantlets of *Ricnodendron heudelotii* issued from shoots of microcuttings or shoots isolated from microcuttings or calli after 65 days of culture.

ANA (mg/L)	Explants formant des racines (%)		Nombre moyen de racines par explant	
	Fragments de tige uninodaux	Tiges feuillées isolées	Fragments de tige uninodaux	Tiges feuillées isolées
0	0	0	0	0
0,5	0	0	0	0
1	14	7	2,2c	2,1b
1,5	85	21	4,3b	3,2a
2	80	9	11,1a	2,3b
2,5	23	3	2,1c	2,3b

Les valeurs de chaque colonne ayant la même lettre ne sont pas significativement différentes d'après le test de Duncan $P < 0,05$; ANA : acide naphthalène acétique.

Tableau 3. Effet de la kinétine sur la croissance des bourgeons latéraux portés par les explants uninodaux et sur la néoformation de bourgeons sur des cals provenant des morceaux d'entre-nœuds de tige de *Ricinodendron heudelotii* après respectivement 35 jours et 67 jours de culture.

Table 3. Effect of kinetine on the proliferation of buds on microcuttings and calli of *Ricinodendron heudelotii* after 35 days and 65 days, respectively.

Kinétine (mg/L)	Explants formant les bourgeons (%)	Nombre moyen de bourgeons par explant
Microboutures		
0	0	0
2	17	2,1c
3	86	8,2a
4	41	3,2b
5	13	2,3c
Cals		
0	0	0
2,5	16	2,1c
3	32	2,3c
3,5	100	5,6a
4	46	3,2b
4,5	24	2,3c
5	7	2,2c

Les valeurs de chaque colonne ayant la même lettre ne sont pas significativement différentes d'après le test de Duncan $P < 0,05$.

tableau 3). Lorsque les bourgeons néoformés sur cal sont isolés et repiqués sur le même milieu d'enracinement que celui des fragments de tige uninodaux, le taux maximum d'explants qui différencient les racines est le même que celui obtenu avec les bourgeons latéraux (21 %) avec 1,5 mg/L d'ANA, et le nombre moyen de racines par explant est également de 3,2 (tableau 2).

Acclimatation

L'induction du bourgeonnement au niveau des fragments de tige uninodaux et au niveau des cals en présence de kinétine permet d'obtenir en conditions optimales un nombre moyen de vitroplants trois fois plus élevé que la méthode de débourement du bourgeon axillaire des fragments de tige uninodaux en présence de la BAP. Les vitroplants obtenus par ces deux méthodes placés en conditions d'acclimatation survivent à 53,4 % et au bout de 90 jours d'acclimatation, on obtient des plantules vigoureuses prêtes pour le transfert en champ (figure 1G, 1H).

Discussion

Les méthodes mises au point dans ce travail montrent que *R. heudelotii* peut-être multiplié *in vitro* avec succès à partir de fragments de tige uninodaux et de morceaux d'entre-nœuds prélevés sur une plante adulte. Le pourcentage de réussite des différentes étapes de cette multiplication est évalué en fonction de la nature et de la concentration des phytohormones utilisées. On a observé l'action activatrice de la BAP sur le débourement du bourgeon axillaire de l'explant nodal et son développement en une tige feuillée avec un effet maximal à 4 mg/L (100 % de débourement). Des résultats similaires ont été obtenus par Enjalric (1983) chez *Hevea brasiliensis* qui est une autre Euphorbiacée. L'enracinement des tiges feuillées ainsi obtenues nécessite un traitement inducteur à l'ANA (tableau 2). L'effet maximal est observé à 1,5 mg/L où 85 % de tiges feuillées différencient les racines. Shiembo (1994) a obtenu des résultats analogues avec les fragments de tige de la même espèce mais cultivés en conditions horticoles et traités à l'acide

indol butyrique (AIB). En revanche, chez d'autres espèces ligneuses telles que *Cola anomala* (Fotso *et al.*, 2002), *Cola nitida* (Ashiru et Quarcoo, 1971) et *Psidium guajava* (Yassen *et al.*, 1995), les difficultés d'enracinement constituent un obstacle à la régénération. Une phase de micropropagation par induction de bourgeons latéraux sur les nœuds des fragments de tige uninodaux ou sur les cals issus des fragments d'entre-nœuds a été entamée. Ce processus caulogène est régulé par la kinétine, 86 % de fragments de tige uninodaux différencient des bourgeons latéraux à 3 mg/L et 100 % des cals néoforment des bourgeons à 3,5 mg/L. Pour ces concentrations, le nombre de bourgeons par explant est respectivement de 8,2 et de 5,6 (tableau 3). Il semble que la kinétine au niveau des nœuds crée un effet antagoniste de la dominance apicale du bourgeon axillaire principal sur ses bourgeons latéraux qui entrent alors en croissance et en concurrence avec le bourgeon principal. *A contrario*, les traitements à la BAP permettent le débourement du bourgeon axillaire principal sans réduire sa dominance qui maintient toujours les bourgeons latéraux en dormance. Ces résultats sont meilleurs que ceux obtenus par Donfagsiteli (2002) et Omokolo (2002) chez la même espèce. En effet, ces auteurs, en cultivant des fragments de tige uninodaux et des cals de *R. heudelotii* sur le même milieu de base enrichi en kinétine, ont obtenu respectivement 5,8 et 3,1 bourgeons par explant. Les tiges issues des bourgeons latéraux ou néoformés de cals se développent mais présentent un faible taux de rhizogénèse en présence d'ANA par rapport aux tiges feuillées issues des fragments de tige uninodaux (21 % contre 85 %) (tableau 2). Cela confirme le faible taux d'enracinement des bourgeons induits *in vitro* déjà démontré chez des ligneux tels que *Dacryodes edulis* (Youmbi, 2000), *Irvingia gabonensis* (Omokolo *et al.*, 2004). En conditions d'acclimatation, on a noté une croissance lente des vitroplants issus des cals par rapport aux vitroplants issus des fragments de tige uninodaux, ce qui laisse penser que ces individus ne sont pas conformes. Toutefois, la méthode d'acclimatation a permis d'obtenir 53,4 % de plantules viables. Ces résultats se rapprochent de ceux de Youmbi et Benbadis (2001) qui ont obtenu avec la même méthode d'acclimatation 50 % de plantules viables chez *Dacryodes edulis*. D'une part, les méthodes de régénération

in vitro de *R. heudelotii* développées dans ce travail permettraient d'obtenir par développement direct des bourgeons axillaires des fragments de tige uninodaux une multiplication conforme des individus élites. D'autre part, l'induction de la prolifération des bourgeons au niveau des fragments de tige uninodaux et des cals pourrait permettre d'obtenir des plantules variantes présentant peut-être des caractéristiques intéressantes pour la domestication de cette espèce.

Conclusion

Ce travail montre qu'on peut multiplier l'espèce *R. heudelotii in vitro* à partir de fragments de tige uninodaux et de morceaux d'entre-nœuds. Les résultats ici présentés sont meilleurs que ceux obtenus par Mapongmetsem *et al.*, (1998) et Shiembo (1994) chez la même espèce multipliée par bouturage horticole. La multiplication à partir du bourgeon axillaire principal ou des bourgeons latéraux de fragments de tige uninodaux favoriserait une multiplication conforme des individus élites. En revanche, celle établie par régénération de bourgeons à partir de cals issus de morceaux d'entre-nœuds pourrait conduire à des variants possédant éventuellement des caractères intéressants pour la domestication de cette espèce. Une analyse approfondie de ces variants reste à réaliser. De plus, l'étude de la physiologie de l'enracinement des tiges feuillées isolées devra être approfondie. Cette étude permettrait certaine-

ment d'augmenter le taux d'enracinement de ces tiges, ce qui permettrait d'augmenter encore le taux de la multiplication *in vitro* de cette espèce. ■

Références

Ana MV, Sanchez MC, Amo-marco SB, Baller A. Forced flustering of branch segments as a method for obtaining reactive explants of mature *Quercus robur* tree for micropropagation. *Plant Cell Tissues Org Cult* 1994 ; 31 : 287-95.

Anigbogu P. Nature's gifts : improving trees and shrubs around the world. *Ricinodendron heudelotii* (Baill) in Nigeria. *Agroforestry Today* 1996 ; 8-25.

Ashiru GA, Quarcoo T. Vegetative propagation of Kola (*Cola nitida* (Vent) Schott and Endlicher). *Tropical Agriculture* 1971 ; 48 : 85-92.

Dhawan V, Bhoswani SS. *In vitro* vegetative propagation of *Leucaena leucocephala* (Lam) de wit. *Plant Cell Rep* 1985 ; 4 : 315-8.

Donfagsiteli TN. *Potentialités de régénération in vitro* chez *Ricinodendron heudelotii* (Baill.) à partir des fragments d'organes. Mémoire de Diplôme d'étude approfondie, université de Yaoundé I, 2002.

Dossa EL, Bertrand B, Sidam A. Microbouturage *in vitro* de *Cola nitida* (Schott et Endl). *Cafe, Cacao, The* 1994 ; 38 : 57-60.

Enjalric F. *Étude sur le microbouturage in vitro* de *Hevea brasiliensis*. *Mull Arg*. Thèse de Doctorat de 3^e cycle, université de Paris-Sud, Orsay, France, 1983.

Fondoun JM, Tiki TM, Kengne J. *Ricinodendron heudelotii* (Baill) (Djangsang) *Ethnobotany and importance for forest dwellers in Southern Cameroon*. Actes du deuxième séminaire international sur la valorisation du safoutier et autres oléagineux non conventionnels, Ngaoundéré, Cameroun, 1998.

Fotso, Omokolo ND, Mbouna D. Comparaison de l'aptitude à la régénération *in vitro* de deux kolatiers : *Cola anomala* et *Cola acuminata*. *Cah Agric* 2002 ; 11 : 355-60.

Kapseu C, Tchiengang C. Chemical properties of *Ricinodendron heudelotii* (Baill) seed oil. *J Food Lipids* 1995 ; 2 : 87-98.

Leakey RRB. Potential for novel food products from agroforestry trees. *Rev Food Chemistry* 1999 ; 66 : 1-4.

Mapongmetsem PM, Duguma B, Nkongme-neck BA. *Domestication of Ricinodendron heudelotii* (Baill). in the humid lowlands of Cameroon. Actes du deuxième séminaire international sur la valorisation du safoutier et autres oléagineux non conventionnels, Ngaoundéré, Cameroun, 1998.

Mollet M, Tiki manga T, Kengne J, Tchoundjeu Z. The top ten species in Cameroon. A survey of farmes news on trees. *Agroforestry Today* 1995 ; 7 : 14-6.

Morel G, Wetmore RH. Fern callus tissue culture. *Ann J Bot* 1951 ; 38 : 141-3.

Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 1962 ; 15 : 473-97.

Omokolo ND. *Preliminary results on the in vitro regeneration of Ricinodendron heudelotii* (Baill) Pierre ex pax. Proceedings First Protia International workshop, 2002, Nairobi, Kenya.

Omokolo ND, Fotso, Oumar, Mbouna D. Propagation d'*Irvingia gabonensis* par microbouturage *in vitro*. *Fruits* 2004 ; 59 : 31-8.

Shiembo PN. *Domestication of multipurpose tropical plants with particular reference to Irvingia gabonensis, Ricinodendron heudelotii* (Baill) and *Gnetum africanum welw*. Ph D thesis, University of Edingburgh, 1994.

Trigiano RN, Geneve RL, Merkle SH, Preece JE. Tissue and cell cultures of woody legumes. *Hortic Rev (Am Soc Hortic Sci)* 1993 ; 14 : 265-332.

Yassen RN, Shell RJ, Splittstoesser WE. *In vitro* Shoot proliferation and propagation of guava (*Psidium guajava* L.) from germinated seedlings. *Plant Cell Rep* 1995 ; 14 : 525-8.

Youmbi E. Potentialités de régénération *in vitro* de nœud cotylédonaire chez *Dacryodes edulis*. *Fruits* 2000 ; 55 : 409-19.

Youmbi E, Benbadis A. Régénération *in vitro* des plantes à partir des bourgeons axillaires et de l'apex de plantules sexuées de *Dacryodes edulis* (Dom.) Lam. *Fruits* 2001 ; 56 : 333-43.