

Potentialité de régénération in vitro du nœud cotylédonaire chez *Dacryodes edulis*

Emmanuel Youmbi

Département de Biologie
et Physiologie Végétales,
Faculté des Sciences,
Université de Yaoundé I,
BP 812, Yaoundé,
Cameroun

Potentiality of in vitro regeneration of cotyledonary nodes in *Dacryodes edulis*.

Abstract — Introduction. The bush butter tree (*Dacryodes edulis*) is an allogam tropical fruit tree whose multiplication by seeds induces a progeny with a strong variability. The in vitro vegetative multiplication of rejuvenated material obtained by pruning of selected old trees could make it possible to produce a homogeneous vegetal material. Prior to the development of such a technique, the potentialities of in vitro regeneration of cotyledonary nodes of young seedlings resulting from the germination of seeds were studied. **Materials and methods.** Explants of 2-month old seedlings, having undergone the ablation of whole or part of the cotyledons, were put in culture and their behavior was studied concerning the regeneration of cotyledonary node buds. The effects of various concentrations in cytokinins and auxins added to a culture medium of Murashige and Skoog diluted of half (MS1/2) were tested concerning the reparation of explants and their rooting. **Results.** On medium MS1/2, the cotyledonary nodes having preserved one or two cotyledonary lobes showed early shoot formation related to those where the totality of the cotyledons was removed. The concentrations of 2.22 and 4.44 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP were most effective to cause shoot formation, whereas the addition of 2.68 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA in the culture medium induced from 50 to 70 % of explant rooting. The cotyledonary nodes offer interesting capacities of regeneration which could be confirmed with explants taken on axes of order 2 and 3. **Discussion and conclusion.** The results obtained make it possible to consider possibilities of multiplication in conformity of the bush butter tree. © Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS

Dacryodes edulis / vegetative propagation / in vitro culture / micropropagation / explants / nodes / cotyledons

Potentialité de régénération in vitro du nœud cotylédonaire chez *Dacryodes edulis*.

Résumé — Introduction. Le safoutier (*Dacryodes edulis*) est un arbre fruitier tropical allogame dont la multiplication par semis induit une descendance à forte variabilité. La multiplication végétative in vitro de matériel rajeuni obtenu par la taille d'arbres âgés sélectionnés pourrait permettre de produire un matériel végétal homogène. En préalable à la mise au point d'une telle technique, les potentialités de régénération in vitro du nœud cotylédonaire de jeunes plants issus de la germination des graines ont été étudiées. **Matériel et méthodes.** Des explants de plantules de 2 mois, ayant subi l'ablation de tout ou partie des cotylédons, ont été mis en culture et leur comportement a été étudié vis-à-vis de la régénération des bourgeons du nœud cotylédonaire. Les effets de différentes concentrations en cytokinines et en auxines ajoutées à un milieu de culture Murashige et Skoog dilué de moitié (MS1/2) ont été testés vis-à-vis de la régénération des explants et de leur enracinement. **Résultats.** Sur milieu MS1/2, les nœuds cotylédonaire ayant conservé un ou deux lobes cotylédonaire débourent plus efficacement que ceux où la totalité des cotylédons a été supprimée. Les concentrations de 2,22 et 4,44 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP ont été les plus efficaces pour provoquer le débourement des explants, alors que l'ajout de 2,68 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA au milieu de culture a induit de 50 à 70 % d'enracinement des explants. Le nœud cotylédonaire offre des capacités de bouturage intéressantes qui ont pu être confirmées avec des explants prélevés sur des axes d'ordre 2 et 3. **Discussion et conclusion.** Les résultats obtenus permettent d'envisager des possibilités de multiplication conforme du safoutier. © Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS

Reçu le 25 octobre 1999
Accepté le 5 mai 2000

Fruits, 2000, vol. 55, p. 409–419
© 2000 Éditions scientifiques
et médicales Elsevier SAS
All rights reserved

RESUMEN ESPAÑOL, p. 419

Dacryodes edulis / multiplication végétative / culture in vitro / micropropagation / explant / nœud / cotylédon

1. introduction

Le safoutier, *Dacryodes edulis* (Don) Lam., est un arbre fruitier de la famille pantropicale des Burseracées. Ses caractéristiques botaniques ont fait l'objet de premiers travaux [1]. Les recherches récentes ont été consacrées à l'étude de la nature et de la qualité de l'huile [2, 3]. Malgré les progrès déjà réalisés sur sa multiplication végétative [4-6], le safoutier reste, jusqu'à présent, propagé par semis. Ces plants d'origine sexuée produisent généralement à partir de 5 ans. Les fruits présentent alors une grande variabilité de dimension, goût et épaisseur du mésocarpe. La plante étant allogame, il serait intéressant d'identifier et de cloner les arbres présentant les caractéristiques souhaitées. Or, comme souvent chez les ligneux, la micropropagation est limitée non seulement par des problèmes d'infection ou d'excrétion des composés phénoliques dans le milieu de culture, mais encore par des problèmes de rajeunissement [7, 8]. Pour résoudre ce dernier obstacle, deux solutions sont possibles : la taille intensive des arbres pour obtenir des repousses, ou l'utilisation de plantules issues de germination [7].

Les travaux présentés ont eu pour objectif d'étudier, en culture *in vitro*, les capacités organogènes et régénératrices des nœuds cotylédonaire de plantules de *D. edulis* issues de germinations stériles. Une telle régénération réalisée à partir de matériel jeune, pourrait permettre d'envisager le clonage, après rajeunissement, d'arbres sélectionnés pour des caractéristiques intéressantes.

2. matériel et méthodes

2.1. matériel végétal

Les fruits de *D. edulis* présentent une grande variabilité inter-arbre [2]. Pour disposer d'un matériel de départ homogène, les travaux entrepris se sont donc limités à l'étude de fruits de « type long » [2] récoltés sur un même arbre dans la région de Yaoundé (République du Cameroun).

2.2. stérilisation et germination des graines

Les graines extraites des fruits ont été stérilisées selon la méthode décrite par Youmbi [5]. Elles ont été trempées dans une solution de bénomyl à 5 g·L⁻¹ pendant 30 min, transférées dans de l'éthanol à 70 % pendant 30 sec, puis trempées dans de l'hypochlorite de calcium à 9 % pendant 20 min avant d'être rincées trois fois à l'eau stérile.

Les graines ont été mises à germer dans un milieu constitué d'eau gélosée à 7 g·L⁻¹.

La germination de la graine donne naissance à un axe d'ordre 1. Après élimination de l'axe primaire et mise en culture du nœud cotylédonaire constituant l'explant, il se développe, au point d'insertion des cotylédons, un axe d'ordre 2.

Les nœuds cotylédonaire prélevés ont été mis en culture sur trois milieux de base, à raison de 96 explants par milieu de culture testé : Murashige et Skoog dilué de moitié (MS1/2) [9], Wood Plant Medium (WPM) [10] et Quoirin et Lepoivre (QL) [11].

2.3. capacité de débourrement des bourgeons du nœud cotylédonaire

Le recépage de l'axe 2 au-dessus du premier bourgeon axillaire en partant de la base lui permet de se développer et de donner naissance à un axe d'ordre 3.

Les capacités de débourrement des bourgeons du nœud cotylédonaire des différents axes d'ordre 1, 2 ou 3 ont été étudiées à partir de la mise en germination de 100 graines sur milieu MS1/2 additionné de 4,44 µg·L⁻¹ BAP et 5,37 µg·L⁻¹ ANA (composition justifiée par les résultats exposés plus loin). Les germinations issues de ces graines ont été traitées de façon à induire la formation successive des différents axes. Le nombre d'explants portant des bourgeons débourrés et la taille relative des feuilles formées ont été déterminés.

2.4. effet du nombre de lobes cotylédonaire

La graine de *D. edulis* possède deux cotylédons ; chacun d'eux est pentalobé.

Afin de tester l'effet des lobes cotylédonaire sur le débourrement des bourgeons du nœud cotylédonaire, des explants ayant subi l'ablation de tout ou partie des cotylédons ont été mis en culture et leur comportement a été étudié vis-à-vis de la régénération des bourgeons du nœud cotylédonaire. Trois situations ont été testées : explants ayant été privés de leurs deux cotylédons (0 lobe), explants ayant un seul cotylédon réduit à un seul lobe cotylédonaire (1 lobe), explants ayant conservé un seul lobe de chacun des deux cotylédons (2 lobes).

Pour chacun des trois cas – explants avec aucun, un ou deux lobes – 120 explants ont été utilisés.

Le nombre d'explants portant des bourgeons débouffés, le nombre de bourgeons débouffés par explant et la vitesse de croissance des tiges feuillées ont été déterminés pour chacun de ces types d'explant.

2.5. effet des cytokinines

Le débourrement des bourgeons a été suivi sur quatre milieux de culture à base de MS1/2, contenant $0,27 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA (acide naphtalène acétique) et une cytokinine spécifique (benzylaminopurine ou BAP, isopentynyladénine ou IPA, kinétine et zéatine) testée à quatre concentrations de l'ordre de 0,45, 0,90, 2,30 et $4,60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

L'action de chacune de ces cytokinines a été évaluée à partir de deux répétitions de 24 explants pour chacune des quatre concentrations utilisées.

Le nombre d'explants portant des bourgeons débouffés, le nombre moyen de débourrements par explant et la vitesse de débourrement ont été évalués, après un mois de mise en culture des explants, en fonction du type et de la concentration de l'activateur de croissance.

2.6. effet des auxines

L'effet de l'ajout d'auxines dans un milieu de culture MS1/2 a été étudié vis-à-vis de l'enracinement des plantes issues du débourrement.

Trois auxines (acide indole – 3 acétique ou AIA, ANA et acide indole – 3 butyrique

ou AIB) utilisées à quatre concentrations (0,50, 1, 2,50 et $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), ont été testées et comparées à l'utilisation d'un milieu témoin sans auxine.

L'action de chacune des trois auxines a été évaluée à partir de l'observation de 24 explants mis en culture par concentration utilisée, soit 96 explants par auxine testée. Le traitement témoin a porté sur 24 explants.

Le nombre d'explants, le nombre moyen de racines formées par explant et leurs dimensions moyennes (longueur et diamètre) ont été évalués après deux mois de mise en culture des explants, en fonction du type et de la concentration de l'hormone de croissance.

2.7. analyse statistique

Les données obtenues au cours de l'expérimentation ont été soumises à un test χ^2 ($p = 0,05$).

3. résultats

3.1. milieux de culture

Les milieux de base testés ont permis d'obtenir 16 % de débourrement sur le milieu de culture QL, 50 % sur WPM et 58 % sur MS1/2. Bien que les effets des milieux WPM et MS1/2 n'aient pas été significativement différents, c'est le milieu MS1/2 qui a été retenu pour la suite des expériences.

3.2. effet des lobes cotylédonaire sur le débourrement

Au cours de la phase de débourrement des bourgeons, trois modalités d'obtention des plantes entières ont été observées (*figure 1*) : débourrement avant enracinement de la bouture, cas le plus fréquent ; enracinement précédant le débourrement ; débourrement et enracinement simultanés.

L'étude de l'influence de l'absence ou de la présence d'un ou deux lobes cotylédonaire sur l'explant a montré que le débour-

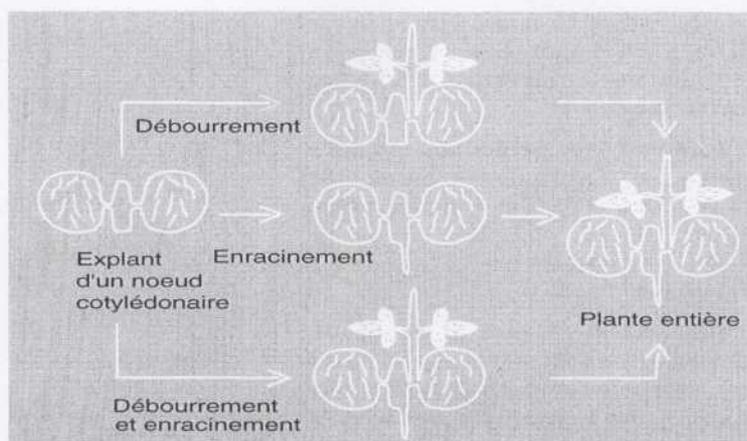


Figure 1. Schéma des différents modes de débourement d'explants de nœuds cotylédonaire mis en culture sur milieu nutritif gélosé et formation de plantes entières chez *Dacryodes edulis*.

Tableau I.

Influence du nombre de lobes cotylédonaire sur le débourement et la croissance des bourgeons débourents, pour trois types d'explants de nœud cotylédonaire de *Dacryodes edulis* ayant subi une ablation partielle ou totale de leurs cotylédons (120 explants étudiés pour chaque type de matériel). Observations effectuées après 4 semaines de culture sur milieu MS additionné de $0,44 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP et de $0,27 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA.

Types d'explants	Explants portant des bourgeons débourents (%)	Nature de la croissance
Avec 2 lobes	80	Très rapide
Avec 1 lobe	83,3	Rapide
Sans lobe	33,3	Très lente

Tableau II.

Différents modes de bourgeonnement à l'aisselle des lobes cotylédonaire pour deux types d'explants de nœud cotylédonaire de *Dacryodes edulis* ayant conservé soit un lobe sur un cotylédon, le second cotylédon ayant été supprimé, soit un lobe sur chacun des deux cotylédons (100 explants débourents, étudiés pour chaque type de matériel).

Types d'explants	Nombre et position des bourgeons par rapport aux cotylédons	Nombre d'explants
Avec un lobe cotylédonaire	1 bourgeon à l'aisselle du lobe conservé	21
	1 bourgeon à l'aisselle du lobe conservé + 1 bourgeon à l'aisselle du cotylédon supprimé	33
	1 bourgeon à l'aisselle du cotylédon supprimé	46
Avec deux lobes cotylédonaire	1 bourgeon à l'aisselle du lobe conservé	43
	1 bourgeon à l'aisselle du lobe conservé + 1 bourgeon à l'aisselle du cotylédon supprimé	52
	1 bourgeon à l'aisselle du cotylédon supprimé	5

rement des bourgeons est plus important sur les explants comportant un ou deux lobes que sur ceux qui en sont complètement démunis. Il en est de même pour la vitesse de croissance ultérieure des bourgeons. En effet, si la comparaison des valeurs obtenues avec les deux premiers types d'explants ne présente pas de différence significative, cette différence est très significative au seuil de 5 % lorsque ces valeurs sont comparées à celle du troisième type d'explant (tableau I).

Le débourement des bourgeons s'est fait différemment selon l'emplacement des lobes cotylédonaire (tableau II) : pour les explants n'ayant conservé qu'un seul lobe,

le débourrement a concerné surtout le côté de l'axe dépourvu de cotylédon (46 %) ; il y a eu 33 % de débournements simultanés à partir des deux aisselles cotylédonaire et, dans 21 % des cas, le débourrement s'est manifesté à l'aisselle du seul cotylédon présent. Pour les explants ayant conservé deux lobes, c'est le double débourrement à l'aisselle des deux cotylédons qui a été le plus fréquent (52 %) ; il y a eu 43 % de débournements à l'aisselle d'un seul cotylédon et, dans 5 % des cas, il y a eu formation de trois bourgeons, cas qui a pu également être observé occasionnellement sur les explants n'ayant conservé qu'un seul lobe.

3.3. effet des cytokinines

Parmi les quatre cytokinines testées, la BAP et l'IPA ont stimulé le débourrement d'une manière identique ; cependant, à forte concentration, la BAP est plus efficace que l'IPA (figure 2). La zéatine et la kinétine ont eu des effets moins prononcés.

Le nombre moyen de bourgeons formés par explant s'est révélé être positivement corrélé avec l'augmentation de la concentration en BAP dans le milieu de culture, alors que les différentes concentrations testées pour les trois autres cytokinines n'ont pas induit de différences significatives (figure 3).

3.4. effet des auxines

Le nombre d'explants enracinés a augmenté avec la concentration d'ANA (tableau III). Le nombre moyen de racines portées par explant a varié de 0,16 à 6 et le pourcentage d'enracinement, de 17 à 92 %.

Aux faibles teneurs en ANA ($0,54 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), les racines formées ont été peu nombreuses ; elles se sont allongées et ont épaissi rapidement. Aux fortes concentrations, les racines ont été plus nombreuses, moins longues et se sont souvent présentées en couronne radiaire.

Les taux d'enracinement obtenus avec les plus fortes concentrations d'AIA et d'AIB utilisées ont été inférieurs à ceux observés avec les fortes teneurs en ANA. Le diamètre et la longueur des racines ont varié dans le

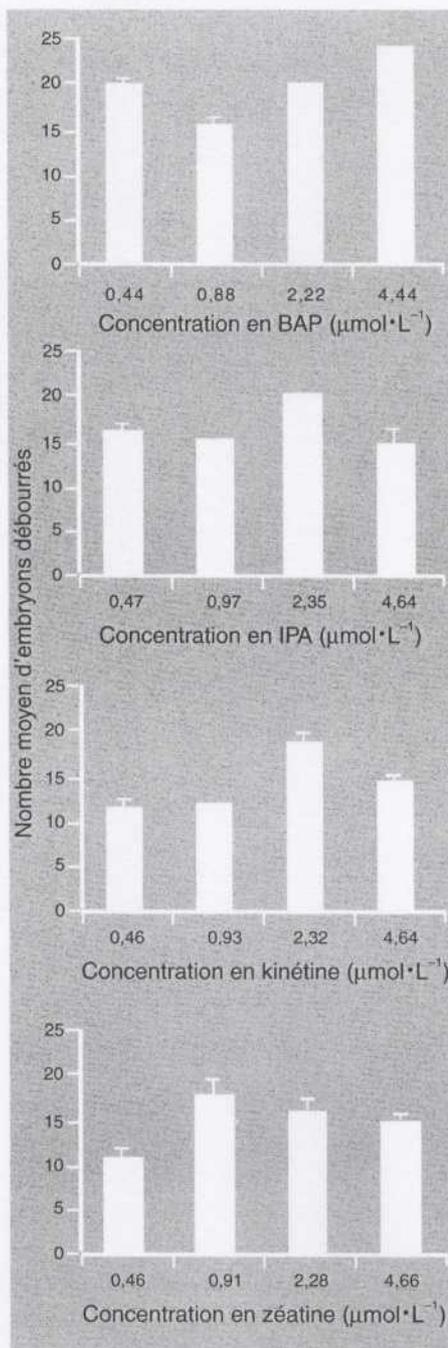
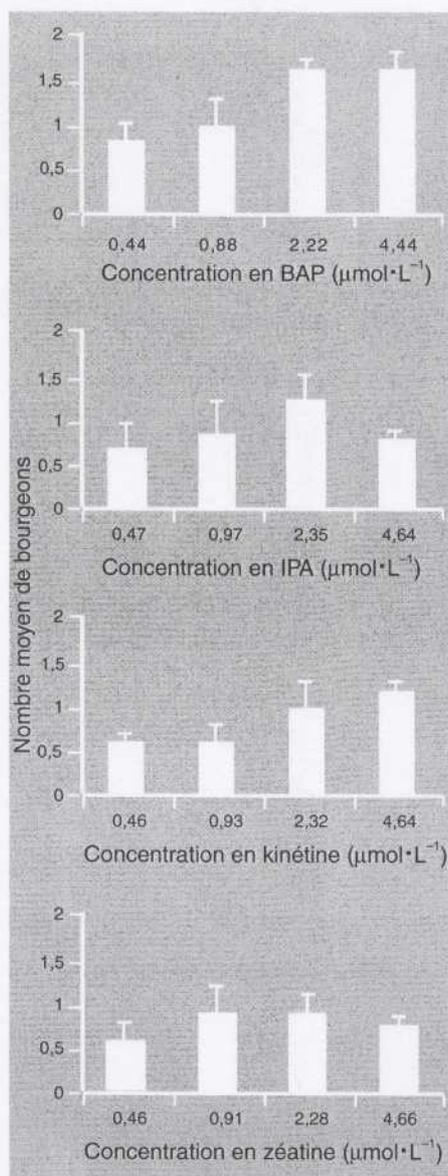


Figure 2. Influence, sur de débourrement des explants au niveau du nœud cotylédonaire, de l'ajout à un milieu de culture gélosé (Murashige et Skoog dilué de moitié, additionné d'ANA à $0,27 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) de différentes cytokinines à différentes concentrations chez *Dacryodes edulis*. Moyenne de 24 plants par combinaison cytokinine / concentration ; observations faites après 1 mois de culture.

même sens que celui décrit pour les racines formées sur milieu enrichi en ANA.

Aux faibles concentrations, le taux d'enracinement des explants cultivés sur milieu

Figure 3. Influence, sur le nombre moyen de bourgeons formés par explant, de l'ajout à un milieu de culture gélosé (Murashige et Skoog dilué de moitié, additionné d'ANA à $0,27 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), de différentes cytokinines à différentes concentrations chez *Dacryodes edulis*. Moyenne de 24 plants par combinaison cytokinine / concentration ; observations faites après 1 mois de culture.



avec AIB a été le double de celui des explants avec AIA. Dans les deux cas, le nombre de racines formées a été moins élevé que celui obtenu avec l'ANA.

Aucune racine n'a été formée sur le milieu témoin sans auxine.

L'ANA se révèle donc être l'auxine qui, par rapport à l'utilisation d'AIA ou d'AIB, stimule le mieux l'enracinement des

explants constitués par le nœud cotylédonaire. La concentration de $2,68 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ a permis non seulement d'obtenir 50 % de plants enracinés, mais aussi un développement satisfaisant des racines.

3.5. capacité de débourrement du nœud cotylédonaire

L'observation du débourrement des bourgeons caulinares ou axillaires sur les nœuds cotylédonaire des axes d'ordre 1, 2 ou 3 a montré que le taux d'explants portant des bourgeons débourrés est plus important sur les axes d'ordre 1 et 2 que sur les axes d'ordre 3 (tableau IV). De plus, les axes d'ordre 3 sont moins vigoureux. Cependant, bien que le nombre d'explants prélevés sur les axes d'ordre 2 et 3 soit inférieur à 100, leur taux de débourrement reste important et il ne diffère pas significativement du pourcentage obtenu pour les axes d'ordre 1.

Une réduction de la surface foliaire a été observée sur les rameaux produits à partir des axes d'ordre 2 et surtout d'ordre 3 par rapport à celle des rameaux issus d'axes d'ordre 1 (tableau IV).

4. discussion et conclusion

Le débourrement de bourgeons de plantules de safoutier a été obtenu in vitro, à partir du nœud cotylédonaire, sur milieu MS modifié (MS1/2). Cela est conforme à certaines conclusions de Hu et Wang [12] selon lesquelles le milieu MS modifié était le plus utilisé et le plus efficace pour régénérer des plantes à partir des nœuds, apex et méristèmes. Ce milieu MS1/2 a été utilisé par certains auteurs [13] pour la régénération du poirier. En revanche, d'autres équipes [14] ont utilisé le milieu MS non modifié pour la phase de multiplication de différentes espèces d'*Eucalyptus*.

D'autres milieux, tels que les milieux WPM [10] et QL [11], ont été également testés, mais la régénération de plantes entières a été plus importante sur les milieux MS1/2 et WPM qui permettent, dans les mêmes

Tableau III.

Influence de la nature et de la concentration de différentes auxines ajoutées à un milieu de culture de Murashige et Skoog dilué de moitié, sur l'enracinement d'explants de nœuds cotylédonaire de *Dacryodes edulis* portant des bourgeons débouffés à l'aisselle des cotylédons (24 explants par combinaison auxine / concentration). Observations effectuées 2 mois après la mise en culture. Aucun des 24 explants mis en culture sur un milieu dépourvu d'auxines (traitement témoin) n'a émis de racines.

Auxine	Concentration ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Taux d'explants enracinés (%)	Nombre moyen de racines	Longueur moyenne des racines (mm)	Diamètre moyen des racines (mm)
ANA	0,54	17	$0,16 \pm 0,1$	110 ± 10	3
	1,07	33	$1,25 \pm 0,2$	92 ± 06	3
	2,68	50	$2,66 \pm 0,5$	75 ± 11	1,5
	5,37	92	$6,00 \pm 1,2$	43 ± 08	1
AIB	0,49	17	$0,41 \pm 0,1$	134 ± 15	3
	0,98	25	$0,50 \pm 0,1$	114 ± 10	3
	2,46	25	$2,16 \pm 1,2$	65 ± 08	2
	4,90	33	$3,66 \pm 1,5$	64 ± 09	1
AIA	0,57	08	$0,30 \pm 0,2$	66 ± 06	2
	1,14	17	$0,16 \pm 0,1$	98 ± 10	2
	2,85	08	$0,25 \pm 0,5$	61 ± 07	1
	5,70	42	$1,25 \pm 0,9$	58 ± 08	1

conditions, d'obtenir un taux d'enracinement plus élevé que les autres milieux utilisés. De même, la régénération du *Tectonia* a pu être obtenue à partir de nœuds sur milieu MS [15], alors que, sur milieu WPM, la même espèce a été régénérée à partir d'apex [16].

Bien que, chez les Angiospermes, le nœud cotylédonaire soit rarement utilisé pour la micropropagation, il intervient comme organe principal de régénération

chez des espèces telles que *Albizia lebbek* [17], *Broussonetia kazinoki* [18], *Eucalyptus alba* [19], *Sapium sebiferum* [20], *Santalum album* et *Tectona grandis* [15].

Le débouffement rapide des bourgeons au niveau du point d'insertion des cotylédons confirme des observations réalisées en serre sur des plantes âgées de 6 mois, et en tube sur des plantules issues de germination sur lesquelles le premier rameau apparaît au niveau des points d'insertion

Tableau IV.

Capacité de débouffement des bourgeons axillaires d'explants de *Dacryodes edulis* mis en culture sur un milieu de Murashige et Skoog dilué de moitié et enrichi avec $4,44 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP et $5,37 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA, en fonction de l'ordre de l'axe sur lequel ils se développent.

Type d'axe	Nombre d'explants	Pourcentage	Taille des feuilles
Axe d'ordre I	100	96	Normale
Axe d'ordre II	96	87,5	Réduite
Axe d'ordre III	84	78	Très réduite

des cotylédons. Pour les plantes multipliées en culture *in vitro*, il se produit non seulement un développement du bourgeon le plus proche de l'apex, mais encore celui des bourgeons situés à l'aisselle des cotylédons [7] ; cela pourrait être imputable à un traumatisme observé fréquemment, occasionné par les dimensions exiguës des tubes de culture pouvant entraîner une courbure de la tige après contact avec le bouchon du tube à essai.

L'influence de l'ablation des cotylédons sur le développement des bourgeons axillaires issus du nœud cotylédonaire a déjà fait l'objet de travaux antérieurs [21, 22]. Chez *D. edulis*, en revanche, le débourrement a été influencé par l'absence ou la présence de lobes cotylédonaires. En effet, la présence d'un ou de deux lobes cotylédonaires a stimulé le débourrement pour près de 80 % des explants, alors qu'en leur absence le débourrement n'a été que de 33 %, valeur inférieure aux 50 % observés sur les plantules de *Bidens* [22]. Par ailleurs, les lobes ont eu une action significative sur la croissance des bourgeons débourrés qui a été importante sur les explants portant deux lobes, moyenne sur ceux n'en ayant conservé qu'un et nulle sur ceux n'en ayant plus du tout. Ce résultat est à rapprocher de celui de Murray [23] selon lequel, pour les espèces dont les cotylédons sont les organes de stockage des réserves [24], la vitesse de croissance des bourgeons débourrés dépendrait de la taille des cotylédons. De plus, le milieu de culture ne pouvant remplacer les réserves cotylédonaires [23], les bourgeons formés sur les explants sans cotylédon présentent une croissance ralentie. Il y aurait donc une corrélation positive entre le débourrement des bourgeons du nœud cotylédonaire et la présence d'un lobe, vraisemblablement consécutive à son rôle nutritionnel. Cependant, le fort taux de débourrement observé du côté dépourvu de lobe, pour les explants munis d'un seul lobe cotylédonaire, ne peut s'expliquer que par le rôle inhibiteur du cotylédon sur la morphogénèse ; ce rôle corrélatif serait masqué par celui de la mobilisation des réserves, mais pourrait être levé par l'ablation des lobes cotylédonaires [21].

Les trois modalités de régénération des plantes entières à partir d'explants de nœud cotylédonaire, mises en évidence par nos travaux, ne sont pas spécifiques à *D. edulis*. Ce résultat rejoint celui obtenu par Pierik [25] sur les plantes supérieures ; cependant, chez *D. edulis*, un transfert sur un second milieu n'est pas nécessaire. À noter que, si les trois modalités décrites sont caractéristiques des plantes vasculaires, l'espèce considérée et la nature de l'explant jouent un rôle important. En effet, l'induction de bourgeons et de racines de façon soit simultanée soit décalée dans le temps, suivie de leur développement sans qu'il y ait eu transfert sur un second milieu, montre que les nœuds cotylédonaires peuvent être des organes de choix pour la régénération des vitroplants de *D. edulis*. Cette régénération directe échappe aux étapes de la micropropagation établies par Hu et Wang [10], Druart et Gruselle [26] et Boxus [27].

Le débourrement a été rapide et deux à trois bourgeons ont pu débourrer à la fois. Il a été favorisé par l'addition de cytokinines dans le milieu de culture, notamment de BAP à $4,44 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ qui s'est révélée être le régulateur de croissance stimulant le mieux le débourrement. Ce résultat est en accord avec celui de Pierik [25] pour qui la BAP, à partir d'une telle concentration, pourrait favoriser le développement des bourgeons axillaires en réduisant l'effet de dominance apicale et induire un bourgeonnement adventif. Des résultats similaires ont été observés pour la régénération de *Prunus domestica* [26] et pour la micropropagation de *Anacardium occidentale* Linn (cashew) [28] et de *Phoenix* [29]. Un effet comparable a été observé pour la régénération, à partir d'hypocotyle, de *Shorea pinanga*, *Tectona grandis*, *Acacia mangium*, *Eucalyptus urophylla* et *Dalbergia latifolia* [15]. Certains de ces travaux ont utilisé ou non une combinaison de cytokinines et d'auxines tant pour la phase de multiplication que pour celle d'enracinement.

L'enracinement des plants régénérés nécessite la présence d'auxines. Leur nature et leur concentration dans le milieu de culture varient selon les espèces utilisées. Parmi les différentes auxines testées pour

D. edulis, l'ANA s'est révélée être l'hormone la plus efficace pour l'enracinement des explants cotylédonaire. Son rôle a été indispensable puisqu'aucune ébauche racinaire n'a été formée en son absence ; elle a agi à faible dose ($0,27 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Le nombre de racines formées a été corrélé à l'augmentation de la concentration, les plus nombreuses (17 racines par plant) ayant été observées avec $5,37 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA. Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus par Al Maari et al. [30] sur l'enracinement des microboutures de poirier cv. Passe Crasane pour lequel l'ANA à faible dose donnerait un meilleur enracinement, mais différent de ceux de Belaizi et al. [31] qui auraient obtenu plus de succès pour l'enracinement de microboutures de *Pyrus malus* L. cv. Golden delicious avec de l'AIB et de l'AIA qu'avec de l'ANA.

Chez *D. edulis*, les potentialités de régénération du nœud cotylédonaire ne résident pas seulement dans sa capacité à bourgeonner et à s'enraciner dès la phase primaire de multiplication, mais encore dans les possibilités du recépage de l'axe d'ordre 1 qui conduit à produire les axes d'ordre 2 et d'ordre 3 aptes à constituer également une source supplémentaire de matériel à utiliser pour la micropropagation. L'état plus juvénile des nœuds issus des axes d'ordre 2 et 3 peut expliquer le meilleur taux de débourrement obtenu. Chez d'autres ligneux tels que *Quercus robur* [32], *Theobroma cacao* l. [33] et *Anacardium occidentale* Linn [28], le nœud est l'organe généralement utilisé comme explant de régénération, puisque c'est à son niveau que se trouve le bourgeon axillaire.

L'ensemble des résultats obtenus à l'issue des travaux présentés montre que la multiplication végétative du safoutier est possible à partir de matériel jeune. Le nœud cotylédonaire offre des capacités de régénération intéressantes du fait de la production d'axes d'ordre 2 et 3. Comme le semis ne résout pas le problème de multiplication rencontré par le cultivateur, le rajeunissement par la taille et l'utilisation des repousses issues d'un arbre sélectionné pour la régénération in vitro de nombreux plants conformes semblent être une voie

privilegiée. Une étude des capacités régénératrices des bourgeons axillaires et apex prélevés sur des plants issus de germination devrait permettre de mieux appréhender l'utilisation in vitro des repousses.

remerciements

L'auteur tient à exprimer mes sincères remerciements au P^r A. Benbadis de l'université Paris VI qui a encadré ce travail dans le cadre de son doctorat.

références

- [1] Chevalier A., Quelques arbres fruitiers et oléagineux peu connus de l'Afrique tropicale : Canaris et Safous, Rev. Int. Prod. Colon. Mater. Colon. 152-153 (1934) 385-392.
- [2] Tchendji C., Severin M., Watherlet J.P., Composition de la graisse de *Dacryodes edulis* (Don) Lam., Rev. Franç. des corps gras 28 (3) (1981) 123-125.
- [3] Youmbi E., Clair-Maczulajtys D., Bory G., Variations de la composition chimique des fruits de *Dacryodes edulis* (Don) Lam., Fruits 44 (3) (1989) 149-154.
- [4] Kengue J., Tchio F., Ducelier D., Le marcottage aérien : une technique pour la multiplication végétative du safoutier, in: Actes du 2^e séminaire international sur la valorisation du safoutier et autres oléagineux non conventionnels, Ngaoundéré, Cameroun, 1997, pp. 123-135.
- [5] Youmbi E., Étude histophysiologique, cytochimique de la graine ; culture in vitro et micropropagation du safoutier (*Dacryodes edulis* (Don)) Lam., thèse, université Paris VII, 1991, 191 p.
- [6] Youmbi E., Benbadis A., Callogenèse et rhizogenèse sur les cotylédons de *Dacryodes edulis* (Don) Lam. cultivés in vitro, in: Actes du 2^e séminaire international sur la valorisation du safoutier et autres oléagineux non conventionnels, Ngaoundéré, Cameroun, 1997, pp. 55-60.
- [7] Franclet A., Rajeunissement et propagation végétative des ligneux, Ann. Rech. Sylvicoles-Afocel (1980) 12-40.
- [8] Fouret Y., Arnaud Y., Larrieu C., Rajeunissement in vitro du *Sequoia sempervirens*. Effet du nombre et de la fréquence des repiquages. Recherches de critères précoces de juvénilité, Ann. Rech. Sylvicoles-Afocel (1984) 111-137.

- [9] Murashige T., Skoog F., A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues culture, *Physiol. Plant.* 57 (1962) 473-497.
- [10] Lloyd G., McCowon B., Commercially feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use shoot tip culture, *Proc. Intern. Plant. Prop. Soc.* 30 (1981) 421-427.
- [11] Quoirin M., Lepoivre P., Étude de milieux adaptés aux cultures in vitro de *Prunus*, *Acta Hortic.* 78 (1977) 437-442.
- [12] Hu C.Y., Wang P.J., Meristem, shoot tip and bud cultures, in: Evans D.A., Sharp W.R., Ammirato P.V., Yamada Y. (Eds.), *Hand book of Plant Cell Culture. Techniques for plant propagation and breeding*, vol. 1, 1983, 177-227.
- [13] Al Maarri K., Duron M., Arnaud Y., Miginiac E., Étude comparative de l'aptitude à la micropropagation, par culture des méristèmes in vitro, du poirier cv Passe-Crassane adulte et de poiriers juvéniles issus de semis de Passe-Crassane, *C. R. Acad. Agri. Fr.* 72 (5) (1986) 413-421.
- [14] Grattapaglia D., Caldas L.S., Machado M.A., Assis T.F., Large scale micropropagation of *Eucalyptus* species and hybrids, VIIIth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, Amsterdam, Hollande, 1990.
- [15] Umboh M.I.J., Tissue culture of some important tropical trees at biotop laboratory, in: The application of tissue culture techniques in economically important tropical trees, *Biotrop special publication* 35, 1988, 77-86.
- [16] Kertadikara A., Prat D., Plant regeneration through apex culture in teak (*Tectona grandis*), VIIIth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, Amsterdam, Hollande, 1990.
- [17] Gharyal P.K., Maheswari S.C., In vitro differentiation of somatic embryoids in a leguminous tree: *Albizia lebbek* L., *Naturwissenschaften* 68 (1981) 379-380.
- [18] Ohyama K., Oka S., Bud and root formation in hypocotyl segments of *Broussonetia kazinoki* Sieb. in vitro, *Plant Cell Physiol.* 21 (1980) 487-492.
- [19] Kitahara E.H., Caldas L.S., Shoot and root formation in hypocotyl callus cultures of *Eucalyptus*, *For. Sci.* 21 (1975) 242-243.
- [20] Venketeswaran S., Gandh V., Tissue culture and plantlet regeneration of Chinese tallow tree, *Sapium sebiferum* L., *In vitro* 17 (1981) 218-219.
- [21] Desbiez M.O., Thellier M., Contrôle ionique de la manifestation d'un rythme nyctéméral de préséance entre bourgeons axillaires, *Physiol. Vég.* 16 (4) (1978) 785-798.
- [22] Thellier M., Desbiez M.-O., Model of a switching 'on' and 'off' pump-and-leak, as a relay and amplification-mechanism in the control of morphogenesis, in: Marrè E., Ciferri O. (Eds.), *Regulation of cell Membrane Activities in Plants*, 1977, pp. 291-298.
- [23] Murray D.R., Axis-cotyledon relationships during reserve mobilisation, in: Murray D.R. (Éd.), *Germination and reserve mobilisation*, *Seed Physiology* 2, 1984, pp. 247-280.
- [24] Bory G., Youmbi E., Clair-Mačzulajtyš D., Évolution des réserves cotylédonaire au cours de la germination de *Dacryodes edulis* (Don) Lam Bull. Soc. Bot. Fr. 137, *Lettres bot.* 1 (1990) 5-12.
- [25] Pierik R.L.K., *In vitro* culture of higher plants, Martinus Nijhoff Publishers, 1987, 344 p.
- [26] Druart Ph., Gruselle R., Plum (*Prunus domestica*), in: Bajaj Y.P.S. (Ed), *Trees, I. Biotechnology in agriculture and forestry*, New York, 1986, pp. 130-169.
- [27] Boxus P., Multiplication végétative : micropropagation, embryogenèse somatique, *Unisat*, BV 93, 1995, 191 p.
- [28] Ferrant J.M., Berjak P., Myoock D.J., In vitro propagation of *Anacardium occidentale* Linn. (Cashew), VIIIth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture. Amsterdam, Hollande, 1990, 65 p.
- [29] Benbadis A., Ammar S., Drira N., Tripathi B.K., Yakoub S., Évolution du modèle architectural du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) liée aux modalités de la multiplication végétative et à l'expression de la néotonie en culture in vitro, *Naturalia monspeliensia*, Colloque international sur l'arbre, 1986, 265-277.
- [30] Al Maarri K., Duron M., Arnaud Y., Miginiac E., Microbouturage in vitro de jeunes poiriers issus de pépins de Passe-Crassane, *Can. J. Bot.* 65 (1987) 803-806.
- [31] Belaizi M., Sangwan R.S., David A., Sangwan-Norreel B.S., Maîtrise des étapes de la micropropagation du Pommier (*Pyrus malus* L.) CV. Golden delicious. *Bull. Soc. Bot. Fr.* 136, *Lettres bot.* 3 (1989) 187-197.
- [32] Vermeer E., Evers P., Rejuvenation pretreatments for micropropagation of adult *Quercus*, VIIIth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture. Amsterdam, Hollande, 1990, 139 p.
- [33] Flynn W.P., Fritz P.J., In vitro multiplication of juvenile shoots of *Theobroma cacao* L., VIIIth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, Amsterdam, Hollande, 1990, 100 p.

Potencialidad de regeneración in vitro del nudo cotiledóneo de *Dacryodes edulis*.

Resumen — Introducción. El *Dacryodes edulis* es un árbol frutal alógamo cuya multiplicación por semilla induce una descendencia de alta variabilidad. La multiplicación in vitro de material rejuvenecido obtenido por corte de árboles maduros seleccionados podría permitir la producción de material vegetal homogéneo. Antes de poner a punto esta técnica, hubo que estudiar las potencialidades de regeneración in vitro del nudo cotiledóneo de plantas jóvenes provenientes de la germinación de semillas. **Material y métodos.** Se cultivaron explantes de plántulas de dos meses, con ablación de todos o una parte de los cotiledones, y se estudio su comportamiento en cuanto a la regeneración de brotes de los nudos cotiledóneos. Se probaron los efectos de diferentes concentraciones de citoquininas y auxinas añadidas a un medio de cultivo Murashige y Skoog diluido a la mitad (MS 1/2) en la regeneración de los explantes y su enraizamiento. **Resultados.** En medio MS 1/2, los nudos cotiledóneos que han conservado uno o dos lóbulos cotiledóneos realizan la apertura de yemas mejor que en aquellos en los que se suprimieron todos los cotiledones. Las concentraciones de 2,22 y 4,44 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP fueron las más eficaces para provocar la apertura de yemas de los explantes, mientras que la adición de 2,68 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA en medio de cultivo indujo 50 a 70% de enraizamiento en los explantes. En nudo cotiledóneo ofrece interesantes capacidades de propagación por esquejes que han podido confirmarse con explantes tomados en los ejes de rango 2 y 3. **Discusión y conclusión.** Los resultados obtenidos permiten considerar posibilidades de multiplicación conforme de *Dacryodes edulis*. © Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS

Dacryodes edulis / propagación vegetativa / cultivo in vitro / micropropagación / explantes / nudos / cotiledones