

Régénération *in vitro* de plants à partir des bourgeons axillaires et de l'apex de plantules sexuées de *Dacryodes edulis* (Don) Lam.

Emmanuel Youmbi^{a*}, Abdelatif Benbadis^b

^a Université de Yaoundé I,
Faculté des Sciences,
département de Biologie
et physiologie végétales,
BP 812, Yaoundé,
Cameroun

^b Université Pierre
et Marie Curie,
laboratoire d'Histophysiologie
végétale,
12 rue Cuvier, 75005 Paris,
France

crbp@camnet.cm

In vitro regeneration of plants from axillary buds and shoot tips of seedlings of *Dacryodes edulis* (Don) Lam.

Abstract — Introduction. The bush butter or plum tree (*Dacryodes edulis*, Burseraceae) produces fruit that is very popular with the people in its distribution area. It is an allogamous tree and its multiplication by seeds induces a progeny which is not in conformity with the selected tree. The present study's principal objective was to develop a technique of *in vitro* regeneration from axillary buds and shoot tips taken from young seedlings resulting from seed germination, for adapting this technique to the cloning of adult trees using regrowths developed after rejuvenation cuttings. **Materials and methods.** Buds and shoot types taken from seedlings of *Dacryodes edulis* resulting from seed germination were put in *in vitro* culture on a Murashige and Skoog medium, half diluted (MS 1/2). The effects of the activated carbon and benzylaminopurine (BAP) on the bursting of explant buds were studied, as well as the naphthalenetic acid influence (ANA) and the photoperiod on the rooting. **Results.** MS 1/2 medium added with activated carbon to $2 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$ and with BAP at $2,22 \mu\text{M}$ or $4,44 \mu\text{M}$ caused the best bursting of the axillary buds and a good growth of the plantlets. The ANA at $5,37 \mu\text{M}$ supported the rooting. A period of 7 d in the darkness appeared favorable to the root induction. Two types of roots were obtained: newly formed roots (resulting from calli) and adventitious roots. Acclimatization was carried out successfully on substrate made up of peat and vermiculite. The regeneration of the vitroplants starting from the buds and the shoot types makes it possible to distinguish along the young plant an acropetal morphogenetic gradient. **Discussion and conclusion.** These results could be exploited for developing a clonal micropropagation from young regrowths resulting from the rejuvenation cutting of a *D. edulis* tree presenting interesting characteristics.

Cameroun / *Dacryodes edulis* / cloning / micropropagation / culture media / plant growth substances / activated carbon / explants / *in vitro* regeneration

Régénération *in vitro* de plants à partir des bourgeons axillaires et de l'apex de plantules sexuées de *Dacryodes edulis* (Don) Lam.

Résumé — Introduction. Le safoutier (*Dacryodes edulis*, Burseraceae) est un arbre dont les fruits sont très appréciés par les populations de son aire de répartition. Plante allogame, la multiplication par semis ne permet pas d'effectuer une multiplication conforme de l'arbre sélectionné. La présente étude a eu pour principal objectif de mettre au point une technique de régénération *in vitro* des bourgeons axillaires et apex prélevés sur de jeunes plants issus de la germination de graines, afin d'adapter ultérieurement cette technique au clonage d'arbres adultes par utilisation de repousses formées après recépage. **Matériel et méthodes.** Des nœuds et apex prélevés sur des plants de *Dacryodes edulis* issus de la germination de graines ont été mis en culture *in vitro* sur un milieu Murashige et Skoog dilué de moitié (MS 1/2). Les effets du charbon actif et de la benzyleadéninepurine (BAP) sur le débournement des explants ont été étudiés, de même que l'influence de l'acide naphthalénétique (ANA) et de la photopériode sur l'enracinement. **Résultats.** Le milieu MS 1/2 additionné de charbon actif à $2 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$ et de BAP à $2,22 \mu\text{M}$ ou $4,44 \mu\text{M}$ a provoqué le meilleur débournement des bourgeons axillaires et une bonne croissance des tiges. L'ANA à $5,37 \mu\text{M}$ a favorisé l'enracinement. Une période de 7 j à l'obscurité s'est révélée favorable à l'induction racinaire. Deux types de racines ont été observés : les racines néoformées (issues de cal) et les racines adventives. L'acclimatation a été faite avec succès sur substrat constitué de tourbe et vermiculite. La régénération des vitroplants à partir des nœuds et apex permet de distinguer le long de la jeune plante un gradient morphogénétique acropétale. **Discussion et conclusion.** Ces résultats pourront être exploités pour la mise au point d'une micropropagation conforme à partir de jeunes repousses formées après la taille d'un safoutier présentant des caractéristiques intéressantes.

Cameroun / *Dacryodes edulis* / clonage / micropropagation / milieu de culture / substance de croissance végétale / charbon actif / explant / régénération *in vitro*

* Correspondance et tirés à part

Reçu le 25 novembre 2000
Accepté le 10 avril 2001

Fruits, 2001, vol. 56, p. 333–343
© 2001 Cirad/EDP Sciences
All rights reserved

RESUMEN ESPAÑOL, p. 343

1. Introduction

Le safoutier (*Dacryodes edulis*) est un arbre dont les fruits sont largement consommés au Cameroun et en Afrique centrale. La plante étant allogame, la multiplication par semis ne permet pas d'obtenir, 5 ans après la plantation, des fruits ayant les mêmes caractéristiques (goût, grosseur, épaisseur du mésocarpe) que celles qui ont guidé le choix du planteur. La reproduction conforme de tels arbres pourrait être obtenue par multiplication végétative en utilisant la culture *in vitro*, à la condition de disposer d'une parfaite connaissance des potentialités des tissus de l'arbre, dont le rajeunissement préalable conditionne la réussite de la multiplication [1]. Les méthodes de rajeunissement des ligneux préconisent soit l'utilisation des repousses formées après recépage, soit la récupération de plants issus de la germination de graines [1-3].

La culture du safoutier est restée longtemps traditionnelle. Les travaux traitant de l'amélioration de cette plante sont récents [4-7]. Les potentialités organogènes du nœud cotylédonaire cultivé *in vitro* ont été mises en évidence en 2000 [8]. Cependant, pour être exploités avec efficacité, ces résultats devaient être complétés par une meilleure maîtrise des capacités organogènes *in vitro* des bourgeons axillaires et des apex caulinaires prélevés sur des jeunes plants issus de semis.

La présente étude constitue une première phase de la multiplication conforme du safoutier. Elle a eu pour principal objectif de mettre au point une technique de régénération *in vitro* des bourgeons axillaires et apex prélevés sur de jeunes plants issus de la germination de graines. Lors d'une seconde phase à venir, les travaux chercheront à adapter cette technique au clonage d'arbres adultes en utilisant du matériel rajeuni obtenu après recépage.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel végétal

Du fait de la forte variabilité inter-arbre observée chez le safoutier, les fruits de type

long [9] utilisés pour cette étude ont été récoltés sur un même arbre dans la région de Yaoundé (République du Cameroun).

2.2. Méthodes

2.2.1. Stérilisation

Les graines extraites des fruits ont été stérilisées selon la méthode décrite par Youmbi et Benbadis [10].

2.2.2. Culture

Des graines ont été mises à germer pendant 2 mois sur un milieu constitué d'eau gélifiée ($7 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$). Les bourgeons axillaires et les apex caulinaires issus des plants obtenus après germination ont été mis en culture sur un milieu Murashige et Skoog dilué de moitié (MS 1/2 [11]).

Un deuxième milieu MS 1/2 enrichi en benzylaminopurine (BAP) utilisée à différentes concentrations (0,44, 0,88, 2,22, 4,44, 8,88 μM) a permis d'étudier l'influence de cette cytokinine sur le débourrement des bourgeons axillaires.

De la même façon, un troisième milieu constitué de MS 1/2 additionné de charbon actif à 0,5, 1, 2, 3 et 4 $\text{g} \times \text{L}^{-1}$ a été testé vis-à-vis de l'élongation des tiges et de l'indice foliaire qui correspond au nombre de nœuds portés par le rameau axillaire.

Les jeunes tiges formées ont ensuite été séparées de l'explant mis en culture et transférées sur un milieu MS 1/2 enrichi en acide naphthalèneacétique (ANA) à 5,37 μM ou en acide indolebutyrique (AIB) à 4,9 μM afin de faciliter l'induction racinaire. Cette phase a été conduite soit en photopériode de 12 h / 12 h, soit en obscurité totale. Les observations ont été faites après (2 et 7) j d'expérimentation.

Après induction racinaire, les explants ont été placés dans un milieu MS 1/2 dépourvu de cytokinines et d'auxines, contenant ou non du charbon actif, afin de favoriser alors la différenciation et le développement des racines. Les observations ont été faites après 1 mois de culture.

Le pourcentage de débourrement des bourgeons axillaires a été déterminé en

fonction de leur position le long de l'axe. La taille de l'explant mis en culture au début de l'expérimentation étant très réduite, l'effet de sa dimension sur sa croissance a été testé. Les cultures ont alors été réalisées dans un milieu MS 1/2 contenant de la BAP à $4,44 \mu\text{M}$ et du charbon actif à $2 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$.

Chaque expérimentation a été réalisée avec 72 explants et une répétition. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel SAS et du test du khi-deux ; la comparaison des moyennes a été effectuée par les tests de Newman et Keuls et du *t* de Student, au seuil de 5 %.

2.2.3. Acclimatation

Les jeunes plantes enracinées ont été transférées, à raison d'une plante par pot, dans des pots contenant soit de la vermiculite, soit un mélange de vermiculite, tourbe et perlite en parts égales, préalablement stérilisées à l'autoclave à $110 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 1 h. Chacun des pots a été recouvert d'une cloche de plastique permettant de confiner l'atmosphère et de réduire la déshydratation, puis il a été placé en chambre de culture maintenue à $23 \text{ }^\circ\text{C}$, 70 % à 75 % d'humidité relative et photopériode de 12 h / 12 h. L'acclimatation a été réalisée en réduisant progressivement l'humidité ambiante de la plantule par diminution régulière du confinement. Les plantes ont été arrosées à l'eau stérile durant les premiers jours d'acclimatation, puis, après 1 à 2 semaines, ils ont reçu en alternance de l'eau stérile et une solution minérale de Knop [12] diluée de moitié.

3. Résultats

3.1. Évolution des bourgeons axillaires

En présence de différentes concentrations de BAP, le taux de débourrement des bourgeons axillaires a varié significativement (seuil de 5 %) de 43 %, observé avec $0,44 \mu\text{M}$ de BAP, à 78 % pour des explants mis sur milieu à $4,44 \mu\text{M}$ de BAP. Sur un milieu à $8,88 \mu\text{M}$ de BAP, le taux de bourgeons débourrés est passé à 50 % (*figure 1*).

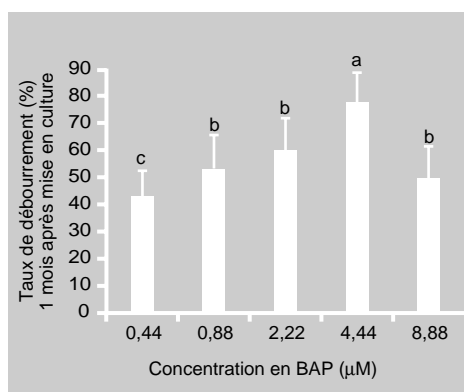


Figure 1. Effet de la concentration en benzylaminopurine (BAP), ajoutée à un milieu de base Murashige et Skoog dilué de moitié et enrichi en charbon actif à $2 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$, sur le taux de débourrement des bourgeons axillaires de *Dacryodes edulis* (moyenne de 72 explants observés pour chacune des concentrations). a, b, c : moyennes significativement différentes au seuil de 5 %, selon le test de Newman et Keuls.

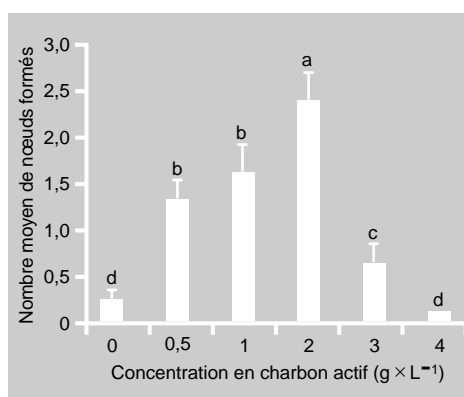


Figure 2. Effet de différentes doses de charbon actif, ajoutées à un milieu de base Murashige et Skoog dilué de moitié et enrichi de benzylaminopurine à $4,44 \mu\text{M}$, sur le nombre de nœuds formés à partir de bourgeons débourrés de *Dacryodes edulis*. a, b, c, d : moyennes significativement différentes au seuil de 5 %, selon le test de Newman et Keuls.

Sur milieu MS 1/2 sans régulateurs de croissance mais enrichi de charbon actif, le nombre moyen de nœuds formés à partir des bourgeons débourrés a été faible pour les explants mis sur milieu témoin sans charbon, mais significativement plus élevé (seuil de 5 %) en présence d'une dose de charbon actif de $2 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$. Les doses de (3 et 4) $\text{g} \times \text{L}^{-1}$ ont considérablement réduit l'émission (*figure 2*).

Le débourrement a été vigoureux (*figure 3a*) sur milieu MS 1/2 contenant de $0,54 \mu\text{M}$ d'ANA, $4,44 \mu\text{M}$ de BAP et 1 g de charbon actif $\times \text{L}^{-1}$; alors qu'il a été faible sur MS 1/2 contenant : $0,54 \mu\text{M}$ d'ANA et $0,44 \mu\text{M}$ de BAP sans charbon actif ; le bourgeon axillaire s'est alors présenté sous forme de rosette (*figure 3b*). En présence de charbon actif, la croissance des apex caulinaires a été continue (*figure 3a, 3c*) alors que les explants se sont desséchés sur milieu sans charbon (*figure 3b, 3c*).

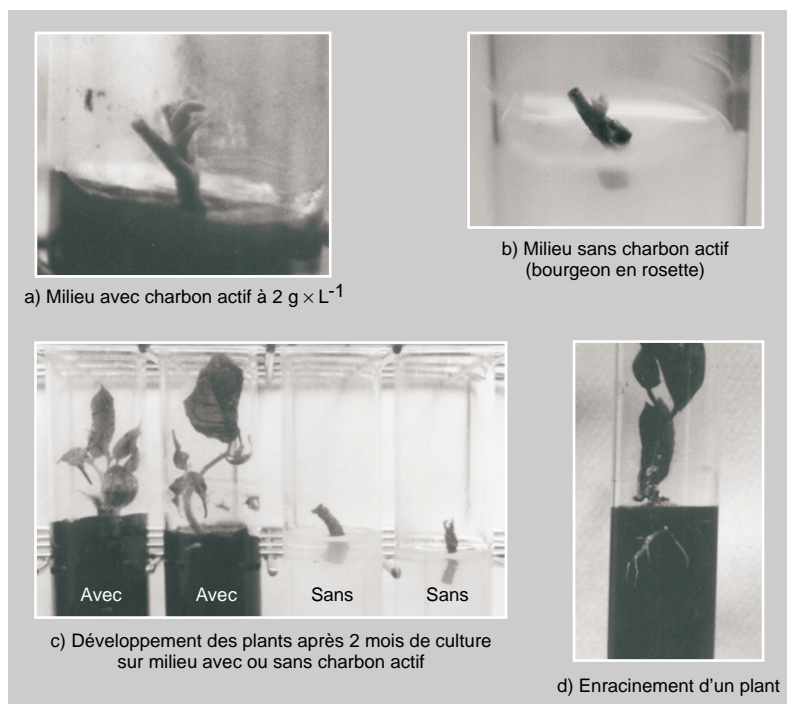


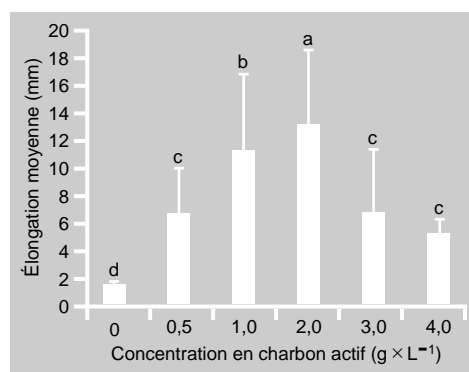
Figure 3. Effet du charbon actif sur le développement de bourgeons caulinaires de *Dacryodes edulis* cultivés *in vitro*.

L'élongation des tigelles développées à partir d'explants placés sur milieux avec différentes doses de charbon actif a été analogue en présence de concentrations à (0,5, 3 ou 4) $g \times L^{-1}$ de charbon actif (6,67, 6,87 et 5,20 mm, respectivement). L'élongation maximale de 13,12 mm a été obtenue avec $2 g \times L^{-1}$ de charbon actif qui serait donc la concentration apte à favoriser au mieux l'élongation des tigelles (figure 4).

3.2. Induction racinaire

Les résultats obtenus pendant la phase d'induction racinaire ont mis en évidence qu'il

Figure 4. Influence de la concentration en charbon actif sur l'élongation de tiges de *Dacryodes edulis* formées à partir de la régénération de plantules *in vitro*. a, b, c, d : moyennes significativement différentes au seuil de 5 %, selon le test de Newman et Keuls.



se formait un cal cicatriciel à la base de l'explant. Cette callogenèse, non visible lors des observations effectuées après 2 j de mise en culture, a été plus intense à l'obscurité qu'en condition de photopériode 12 h / 12 h (tableau I).

3.3. Différenciation racinaire

Un mois après transfert des explants sur milieux testant l'enracinement des tigelles, l'enracinement s'est révélé être le plus actif sur le milieu enrichi en ANA et placé à l'obscurité pendant 7 j (tableau I). Certains des explants n'ayant pas formé de cal ont pu s'enraciner, mais leur pourcentage a été assez faible.

Au cours des transferts entre cultures, certains explants se sont enracinés dès le passage sur le milieu de débourement, après 4 à 6 semaines de culture. Cet enracinement a aussi été observé sur le milieu d'élongation et enfin sur celui d'induction racinaire (figure 3d). Les taux d'enracinement sur ces milieux ont été respectivement de 18 %, 27 % et 30 %. Le pourcentage de formation des racines a varié, bien que plus élevé pour les cultures maintenues assez longtemps (2 mois) sur ces milieux. En revanche, ce taux a été faible par rapport à celui obtenu après passage des tigelles à la phase d'induction en l'absence de lumière.

3.4. Dynamique de la capacité de débourement des bourgeons axillaires le long de la tige

Durant nos expérimentations, le débourement des bourgeons axillaires s'est effectué selon un gradient apico-basal ; en effet, le taux de débourement a été nul au niveau de l'apex, faible lorsque l'apex était accompagné d'une ébauche foliaire et maximal au niveau du nœud cotylédonnaire. Des tests réalisés sur des apex de différentes tailles correspondant à différents stades de développement de la plantule régénérée ont montré que le développement du bourgeon terminal n'était possible que si celui-ci comportait au moins deux feuilles (tableau II). La présence de feuilles jouerait

Tableau I.

Influence des acides naphthalène acétique (ANA) et indolebutyrique (AIB) et de la photopériode sur l'induction et le développement racinaire de jeunes plants issus d'explants de *Dacryodes edulis*, 1 mois après transfert sur un milieu de Murashige et Skoog dilué de moitié et enrichi soit en ANA à 5,37 μM , soit en AIB à 4,9 μM , sans charbon actif (moyenne pour 72 explants mis en culture par type d'expérimentation).

Auxine	Photopériode 12 h / 12 h				Obscurité totale			
	Après 2 j de photopériode		Après 7 j de photopériode		Après 2 j d'obscurité		Après 7 j d'obscurité	
	Callogenèse à la base	Cals enracinés (%)	Callogenèse à la base	Cals enracinés (%)	Callogenèse à la base	Cals enracinés (%)	Callogenèse à la base	Cals enracinés (%)
ANA	Nulle	16,6	Présente	50,0	Nulle	25,0	Importante	75,0
AIB	Nulle	16,6	Présente	33,3	Nulle	25,0	Importante	41,6

Tableau II.

Capacité de débourrement de bourgeons axillaires de *Dacryodes edulis* distribués le long de la tige, à partir d'explants de 10 à 30 mm mis en culture sur un milieu Murashige et Skoog dilué de moitié et additionné d'acide naphthalène acétique (0,54 μM), de benzylaminopurine (4,44 μM) et de charbon actif à $2 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$ (mesures faites sur 72 explants de chaque type).

Type d'explant	% d'explants débourrés	Nature de la croissance
Apex	0	Nulle
Apex avec ébauche foliaire	12	Faible
Apex avec ébauche foliaire + feuille épanouie	50	Moyenne
Bourgeon axillaire	70	Forte
Nœud cotylédonaire	87	Très forte

Tableau III.

Éléments ajoutés à un milieu de Murashige et Skoog lors de la constitution de différents milieux utilisés pour la régénération optimale d'explants prélevés sur des plantules de *Dacryodes edulis* (pH ajusté à 5,6).

Destination du milieu	ANA (μM)	BAP (μM)	Charbon actif ($\text{g} \times \text{L}^{-1}$)
Régénération directe à partir des nœuds cotylédonaire	2,68	4,44	–
Débourrement des nœuds supérieurs	0,54	4,44	1
Élongation	–	–	2
Induction racinaire	5,37	–	–
Différenciation racinaire	–	–	1

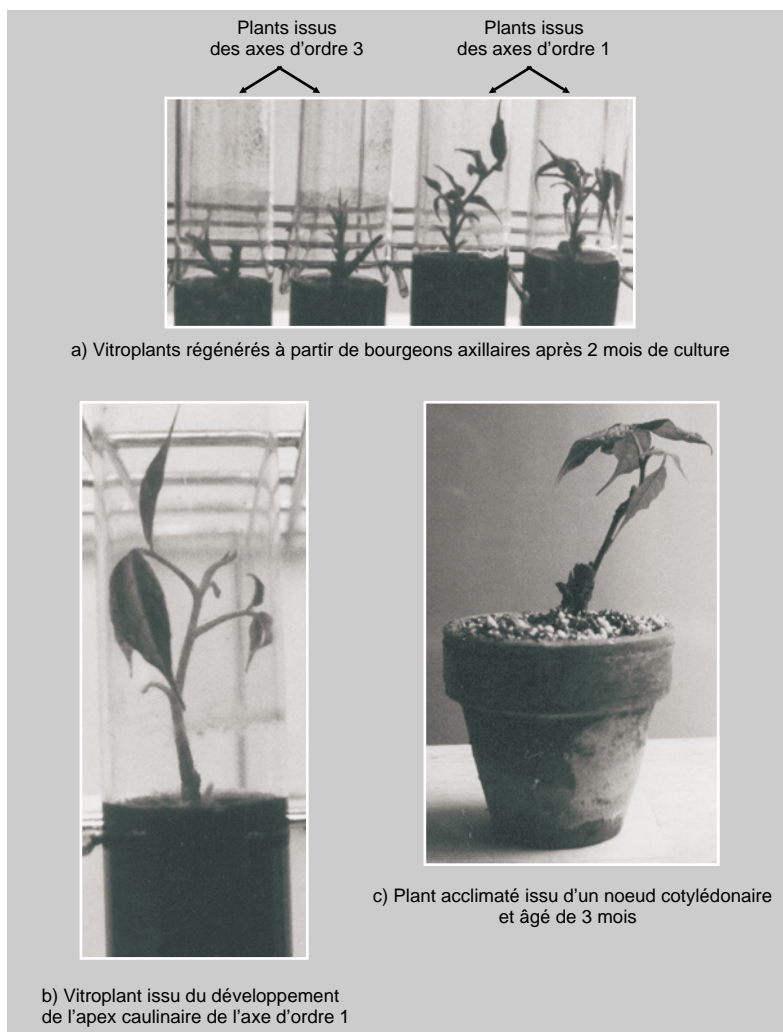
un rôle important dans le processus de débourrement des bourgeons axillaires puisque les nœuds portant des feuilles ont présenté un pourcentage de débourrement supérieur à ceux qui en étaient dépourvus.

La régénération à partir des bourgeons axillaires issus de l'axe épicotylé a conduit à distinguer cinq types de milieux de culture (*tableau III*). Le protocole de régénération ainsi établi a mis en évidence qu'il

existait, le long de la plantule issue de la germination d'une graine, un gradient de capacités morphogénétiques. Trois types d'explants ont été obtenus :

- le nœud cotylédonaire permet la régénération directe des plantes dès l'établissement des cultures primaires sur milieu de Murashige et Skoog seul et dilué de moitié ;
- les autres nœuds répartis sur la tigelle donnent des explants permettant une régénération indirecte ; ils nécessitent un passage par les phases de débourement et d'élongation caulinaire, d'induction et de développement racinaire ; ils permettent cependant d'obtenir un faible taux de régénération directe lors du passage sur les trois premières phases ;

Figure 5. Morphologie et acclimatation de vitroplants obtenus à partir de la régénération *in vitro* d'explants de *Dacryodes edulis*.



- le bourgeon terminal diffère des autres explants car sa régénération nécessite que la taille de l'explant soit plus grande que celle utilisée dans le cas des autres types et que l'explant lui-même comporte un primordium foliaire et une feuille bien épanouie.

Les plants régénérés à partir des bourgeons axillaires et de l'apex ont montré les caractéristiques suivantes :

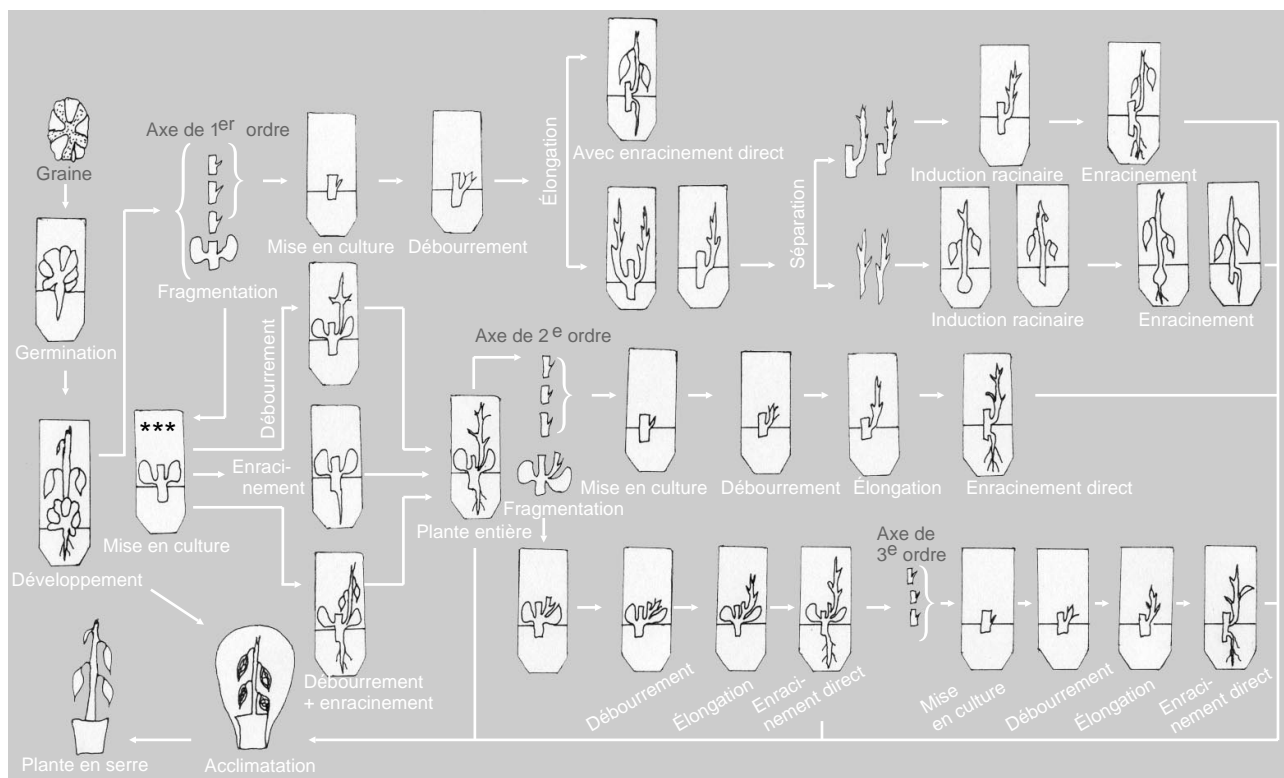
- l'élongation des tiges a été moins rapide que celle observée chez les plantes issues de semis et de nœuds cotylédonaires ;
- la dimension des feuilles a été réduite et cela d'autant plus lorsque les plantes régénérées étaient issues des axes d'ordre 3 ; les plantes issues des axes d'ordre 1 présentaient des feuilles de taille normale (*figure 5a, 5b*) ;
- les racines formées se sont développées abondamment dans les 2 à 3 semaines qui ont suivi leur différenciation ; cette croissance rapide des racines a souvent fait suite à un dessèchement des plants.

3.5. Acclimatation

Les résultats obtenus ont varié selon la nature du substrat et le mode d'enracinement.

Après différenciation et développement des racines, la reprise en conditions confinées et contrôlées a été observée sur mélange tourbe-vermiculite-perlite. Après 1 semaine de repiquage en pot placé en conditions contrôlées, 70 % des plants ensemencés sur ce substrat avaient repris leur croissance et 50 % d'entre eux ont finalement atteint la fin de sevrage (*figure 5c*). En revanche, sur milieu constitué exclusivement de vermiculite, les plantes n'ont présenté qu'un faible taux de reprise de croissance (20 %) et aucune n'est parvenue en fin sevrage.

Les jeunes plantes issues des nœuds cotylédonaires munies d'un enracinement vertical, perpendiculaire à la section de la tige, ont rapidement repris leur croissance. Ces plantes ont des racines vigoureuses, souvent semblables aux racines pivotantes des plantes issues de la germination des semis. Les plants régénérés à partir de l'axe



épicotylé, présentant des racines soit issues des cals, soit formées perpendiculairement à l'axe, ont eu une très faible reprise.

Les différentes étapes de la micropropagation *in vitro* de *D. edulis* réalisée à partir de jeunes plantes issues de la germination de graines et aboutissant à la production de plants acclimatés ont pu être synthétisées sur un schéma (figure 6).

3.6. Discussion

Les expérimentations *in vitro* menées ont abouti au débourement des bourgeons et à l'allongement des tiges au niveau des nœuds.

Si les régénérations obtenues à partir des nœuds cotylédonaire n'ont nécessité que la présence de BAP et d'ANA, celles effectuées à partir des nœuds supérieurs ont exigé, en plus de ces régulateurs de croissance, que du charbon actif soit ajouté pour déclencher l'élongation des tiges. Les concentrations favorables ont été de 1 g et

2 g \times L⁻¹ de charbon actif ; en l'absence de cet élément, les bourgeons ont peu débourenté, se sont guère allongés et sont restés à l'état de rosette. Les concentrations élevées de 3 g et 4 g \times L⁻¹ de charbon actif se sont révélées défavorables à l'élongation de la tige. Nos résultats sont à rapprocher de ceux obtenus par Boulay [13] qui, lors de l'étude de l'élongation de la tige de *Pseudotsuga menziesii*, a montré que le charbon actif empêchait l'arrêt de croissance ; un tel effet pourrait être dû à l'action stimulante des impuretés (monophénylamines) du charbon actif. Dans le même sens, Evers [14] a montré que l'adjonction de charbon actif dans un milieu de culture avait souvent un effet sur l'organogenèse des espèces ligneuses. Il en est de même pour *Picea* [15] et pour *Psidium guajava* [16] qui ont présenté une même réponse positive en présence du charbon actif. Le charbon actif semblerait accélérer, dans le milieu, le processus d'hydrolyse du saccharose en oses facilement utilisables par l'explant [17]. Chez *D. edulis*, le charbon actif a stimulé le

Figure 6. Schéma récapitulatif des potentialités de régénération et des différentes étapes de la micropropagation du safoutier (*Dacryodes edulis*) à partir de plants issus de la germination d'une graine (***) : mode de régénération à partir du nœud cotylédonaire).

débourrement et l'élongation caulinaire qui s'est accompagnée de l'accroissement du nombre de feuilles.

Quoique l'action du charbon actif ait été indispensable pour le développement des bourgeons axillaires, l'influence de la BAP n'a pas été négligeable : en présence de charbon actif, le taux de débourrement des bourgeons axillaires a augmenté avec la concentration en BAP qui serait le régulateur de croissance dont l'action est la plus favorable au débourrement des bourgeons tant au niveau du nœud cotylédonaire qu'au niveau des nœuds et des apex [18]. Par ailleurs, en étudiant l'effet des cytokinines sur l'induction et le développement des bourgeons, Al Maarri *et al.* [19] et Linington [20] ont montré que la BAP était la cytokinine qui accroissait le taux de multiplication du poirier et des différentes espèces de *Shorea*, respectivement.

La régénération de la plante entière passe par la phase d'enracinement. Cet enracinement s'est révélé être contrôlé d'une part par l'effet de la photopériode, d'autre part par l'action des auxines. Sur des milieux contenant de l'ANA ou de l'AIB, les explants n'ont présenté de néoformation de calcs qu'après 7 j d'introduction en conditions d'induction racinaire. L'absence de callogenèse constatée après 2 j de culture révélerait que cette durée est alors relativement trop courte pour favoriser la mise en place du phénomène. La formation de calcs a été plus intense à l'obscurité qu'en photopériode 12 h / 12 h. Les meilleurs enracinements ont été liés à la présence de l'ANA. Ces résultats seraient à rapprocher de ceux obtenus par Al Maarri *et al.* [21] sur l'enracinement des microboutures de poirier cv. Passe Crassane chez lesquelles l'ANA à dose modérée aurait provoqué un meilleur enracinement. Cependant, Mohamed-Yasseen *et al.* [16] et de Belaizi *et al.* [22] auraient obtenu, respectivement, un meilleur enracinement de microboutures de *Psidium guajava* avec de l'AIB et de *Pyrus malus* L. cv. Golden Delicious avec de l'AIB et de l'AIA. L'effet de l'ANA sur l'enracinement a été plus élevé à l'obscurité totale. Les mêmes observations ont été faites par Belaizi *et al.* [22], alors que Perez-Parron *et al.* ont obtenu des résultats différents [23].

La durée d'imprégnation des explants dans le milieu de culture serait un facteur important. En effet, l'enracinement a été très élevé après 1 semaine de phase d'induction. La présence de calcs n'a pas été défavorable à la différenciation racinaire. Elle ne semble pas toutefois indispensable car même les explants qui en ont été dépourvus ont formé des racines, mais à un faible pourcentage.

À partir de la base des tigelles, deux types de racines ont été observés : des racines néoformées issues de calcs et des racines adventives formées à 1 ou 3 mm de la section basale de l'explant ; des racines adventives provenant de la division et de la différenciation des cellules issues de cambium et non des cellules méristématiques entourant les canaux sécréteurs et vasculaires comme dans le cas des nœuds cotylédonaire [6]. Ces racines seraient différenciées, directement à la base de l'explant, sans formation préalable de calcs et sous le contrôle de la même auxine et à la même concentration. L'enracinement des explants débouffés a pu être aussi observé pendant les phases de débourrement et d'élongation des bourgeons. L'obtention de plants enracinés aux différentes étapes de la culture traduit une grande capacité du matériel à s'enraciner grâce à son caractère juvénile. Le pourcentage d'enracinement des explants a varié dans l'ensemble de 16 % à 35 %. Ce taux n'est pas négligeable comparativement à certaines espèces comme *Pseudotsuga menziesii* qui a un pourcentage d'enracinement inférieur ou égal à 20 % [13] ou comme *Quercus suber* L. qui présente un enracinement ne dépassant pas 36 % [24].

L'aptitude des bourgeons axillaires à débouffés a diminué du nœud cotylédonaire à l'apex de la tige. Contrairement aux nœuds prélevés sur la tige, la régénération de *D. edulis* à partir d'un explant isolant l'apex a dépendu de la dimension du prélèvement. En effet, la culture de l'apex seul (2 à 4 mm) n'a entraîné aucun développement et la présence d'un seul primordium foliaire n'a pas amélioré le résultat. En revanche, les explants munis d'un primordium et d'une feuille ont présenté un développement normal. Ce résultat est à rapprocher de celui obtenu par Hu et Wang

[18] pour lesquels la présence de primordia foliaires paraît déterminante pour le développement de la plante. Walkey [25] n'a pu régénérer de plants qu'à partir d'explants ayant au moins trois primordia foliaires. La présence de primordia foliaires semblerait donc indispensable au développement de l'apex, leur nombre variant d'une espèce à l'autre. En effet, les expériences ont montré que, pour le pommier, le taux de réussite passe successivement à (15, 65, 75 et 90) % lorsque le dôme apical renferme respectivement (0, 2, 4 et 6) primordia foliaires [26]. Il en est de même pour les dômes méristématiques du poirier possédant 2 à 4 ébauches foliaires qui peuvent se développer sur milieu MS modifié [19]. De même, le nombre croissant d'ébauches foliaires sur le dôme méristématique du merisier améliorerait la phase de reprise [27].

La régénération à partir du bourgeon terminal de *D. edulis* a nécessité, comme chez *Tectona grandis* [28], au moins deux formations foliaires. Mais chez *D. edulis*, au lieu de deux primordia, ce sont un primordium et une feuille complètement développée qui ont été nécessaires. Cela pourrait être dû au mode de fonctionnement du méristème caulinaire, qui, excepté le cas des deux premières feuilles de la plantule, n'émet qu'un primordium à la fois ; c'est l'épanouissement de la feuille précédemment émise qui stimule alors l'émission de la feuille suivante [29].

Le nombre de primordia foliaires varie selon les espèces. Cela sous-entend que la taille des explants peut elle-même varier. En effet, si dans le cas du poirier l'explant doit mesurer au moins 1 mm, chez *D. edulis* l'apex doit avoir au moins 10 mm. La notion de taille, qui semble prendre une grande importance chez *D. edulis*, intervient aussi sur les nœuds chez d'autres espèces végétales. En effet, en étudiant la régénération de *Theobroma cacao* à partir des bourgeons axillaires issus de plantes juvéniles, Flynn et Fritz ont montré qu'en l'absence de régulateurs de croissance la réponse au bourgeonnement était influencée par la taille de l'explant [30].

4. Conclusion

Les expérimentations réalisées ont permis la régénération de plants de safoutier à partir des bourgeons axillaires et des apex de plantules issues de la germination de graines.

Cette régénération est possible sur un milieu de base de type Murashige et Skoog dilué de moitié. Le débourement est accéléré si ce milieu est enrichi avec de la benzyladénine à 4,44 μM et du charbon actif à $2 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$. La régénération a permis de mettre en évidence un gradient morphogénétique qui s'exprime le long de la plantule, du fait d'un débourement qui décroît du nœud cotylédonaire à l'apex.

La régénération à partir du bourgeon terminal nécessite, en plus du charbon actif, un explant mesurant au moins 10 mm et la présence d'une feuille complètement développée.

L'enracinement est facilité par l'adjonction d'acide naphthalèneacétique à 5,37 μM au milieu de culture de base. L'acclimatation réussit mieux sur un substrat constitué d'un mélange de tourbe-vermiculite.

La régénération à partir des nœuds et apex des jeunes plants issus de matériel jeune de *D. edulis* est donc réalisable. Ce résultat pourra être testé pour le clonage des safoutiers ayant des caractéristiques intéressantes, après rajeunissement de l'arbre par utilisation des repousses formées après recépage.

Remerciements

Les auteurs remercient M. Ndoumbé Nkeng Michel, biométricien de l'Irad, pour l'analyse statistique des données.

Références

- [1] Franclét A., Rajeunissement et propagation végétative des ligneux, in: Afocel, Annales des recherches sylvicoles, Nangis, France, 1980, pp. 12–40.

- [2] 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, in: Afocel, Annales des recherches sylvicoles, Nangis, France, 1984, pp. 111–137.
- [3] Vieitez A.M., Sanchez C.M., Amo-Marco J.B., Ballester A., Forced flushing of branch segments as a method for obtaining reactive explants of mature *Quercus robur* trees for micropropagation, *Plant Cell Tiss. Org.* 37 (1994) 287–295.
- [4] Kengue J. Le safoutier (*Dacryodes edulis* (G. Don) H.J. Lam). Premières données sur la morphologie et la biologie d'une Burseraceae fruitière et oléifère d'origine africaine, thèse 3^e cycle, Univ. Yaoundé, Camaroun, 1990, 154 p.
- [5] Kengue J., Tchio F., Ducelier D., Le marcottage aérien : une technique pour la multiplication végétative du safoutier, in: Kapseu C., Kayem G.J. (Éds), Actes du 2^e séminaire international sur la valorisation du safoutier et autres oléagineux non conventionnels, Presse univ. Yaoundé, Ngaoundéré, Cameroun, 1997, pp. 123–135.
- [6] Youmbi E., Étude histophysiologique, cytochimique de la graine ; culture *in vitro* et micropropagation du safoutier (*Dacryodes edulis* (Don) Lam.), Univ. Paris VII, France, thèse, 1991, 191 p.
- [7] Youmbi E., Benbadis A., Callogenèse et rhizogénèse sur les cotylédons de *Dacryodes edulis* (Don) Lam. cultivés *in vitro*, in: Kapseu C., Kayem G.J. (Éds), Actes du 2^e séminaire international sur la valorisation du safoutier et autres oléagineux non conventionnels, Presse Univ. Yaoundé, Ngaoundéré, Cameroun, 1997, pp. 55–60.
- [8] Youmbi E., Potentialités de régénération *in vitro* du nœud cotylédonaire chez *Dacryodes edulis* (Don) Lam., *Fruits* 55 (6) (2000) 409–419.
- [9] 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.
- [10] Youmbi E., Benbadis A., An improved method for culturing African bush butter seeds (*Dacryodes edulis* (Don) Lam.) *in vitro*, *Cameroun J. Biol. Biochem. Sci.* 8 (1) (1998) 31–39.
- [11] Murashige T., Skoog F., A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues culture, *Physiol. Plantarum* 57 (1962) 473–497.
- [12] Knop W., Bereitung einer concentrirten Nährstofflösung für pflanzen, *Landwversuhs-Sat* 30 (1884) 292–294.
- [13] Boulay M., Propagation *in vitro* du Douglas (*Pseudotsuga menziesii* Mirb. Franco) par micropropagation de germination aseptique et culture de bourgeons dormants, in: Afocel, Micropropagation d'arbres forestiers, Annales des recherches sylvicoles, Nangis, France, n° 12, 6/76, 1979, pp. 67–75.
- [14] Evers X., Growth and morphogenesis of shoot initials of Douglas, *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco, *in vitro*, Diss. Agr. Univ. Wageningen, the Netherlands, 1984, pp. 1–6.
- [15] Harry I.S., Lu C.I., Thompson M.R., Thorpe T.A., *In vitro* regeneration of plantlets from embryonic and seedling explants of red spruce (*Picea rubens* Sarg.), in: IAPTC, Abstracts VIIth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, Amsterdam, the Netherlands, 1990, p. 103.
- [16] Mohamed-Yasseen Y., Barringer S.A., Schnell R.J., Splittstoesser W.E., *In vitro* shoot proliferation and propagation of guava (*Psidium guajava* L.) from germinated seedlings, *Plant Cell Rep.* 14 (1995) 525–528.
- [17] Druart Ph., De Wulf Q., Activated charcoal catalyses sucrose hydrolysis during autoclaving, in: IAPTC, Abstracts VIIth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, Amsterdam, the Netherlands, 1990, p. 60.
- [18] 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, pp. 177–227.
- [19] 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. Agr. Fr.* 72 (5) (1986) 413–421.
- [20] Linington I.M., *In vitro* propagation of *Dipterocarpus alatus* and *Dipterocarpus intricatus*, *Plant Cell Tiss. Org.* 27 (1) (1991) 81–88.
- [21] 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.
- [22] 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., Lettres Bot.* 136 (3) (1989) 187–197.

- [23] Perez-Parron M.A., Gonzalez-Benito M.E., Perez C., Micropropagation of *Frazinus angustifolia* from mature and juvenile plant material, *Plant Cell Tiss. Org.* 37 (1994) 297–302.
- [24] Pardos J.A., *In vitro* plant formation from stem pieces of *Quercus suber* L., in: IUFRO-Afocel (Éds.), Colloque international sur la culture *in vitro* des essences forestières, Fontainebleau, France, 1981, pp. 186–190.
- [25] Walkey D.G.A., The production of virus free rhubarb by apical tip-culture, *J. Hortic. Sci.* 43 (1968) 283–287.
- [26] Huang S.C., Millikan D.F., *In vitro* micrografting of apple shoot tips, *HortScience* 15 (1977) 741–743.
- [27] Druart Ph., Boxus P. Liard O., Deaite B., La micropropagation du merisier à partir de la culture de méristèmes, in: IUFRO-Afocel (Éds.), Colloque international sur la culture *in vitro* des essences forestières, 1981, pp. 101–108.
- [28] Umboh M.I.J., Tissue culture of some important tropical trees at biotrop laboratory, in: The application of tissue culture techniques in economically important tropical trees, Indonesia, Biotrop special publication 35, 1988, pp. 77–86.
- [29] Youmbi E., Contribution à l'étude de la germination de *Dacryodes edulis* (Burseraceae), mémoire de DEA, Univ. Paris 7, France, 1987, 74 p.
- [30] Flynn W.P., Fritz P.J., *In vitro* multiplication of juvenile shoots of *Theobroma cacao* L., in: IAPTC, Abstracts VIIth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, Amsterdam, the Netherlands, 1990, p. 100.

Regeneración *in vitro* de plantas a partir de yemas axilares y del ápice de plántulas sexuales de *Dacryodes edulis* (Don) Lam.

Resumen — Introducción. El *Dacryodes edulis* (Burseráceas) es un árbol cuyos frutos son muy apreciados por las poblaciones de su área de distribución. Planta alógama, la multiplicación por semilla no permite efectuar una multiplicación conforme del árbol seleccionado. Este estudio tuvo como objetivo principal poner a punto una técnica de regeneración *in vitro* de las yemas axilares y ápices tomados en plántulas procedentes de la germinación de semillas, para adaptar posteriormente esta técnica a la clonación de árboles adultos mediante la utilización de rebrotes formados tras corta de renovación. **Material y métodos.** Se tomaron nudos y ápices en plantas de *Dacryodes edulis* procedentes de la germinación de semillas y se cultivaron *in vitro* en un medio Murashige y Skoog diluido a la mitad (MS 1/2). Se estudiaron los efectos del carbón activo y de la benciladenina purina (BAP) en el desborre de los explantes y la influencia del ácido naftaleno acético (ANA) y del fotoperíodo en el enraizamiento. **Resultados.** El medio MS 1/2 adicionado con carbón activo a $2 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$ y con BAP a $2,22 \text{ } \mu\text{M}$ o $4,44 \text{ } \mu\text{M}$ provocó un mejor desborre de las yemas axilares y un buen crecimiento de las plúmulas. El ANA a $5,37 \text{ } \mu\text{M}$ favoreció el enraizamiento. Un periodo de 7 d en la oscuridad se mostró favorable para la inducción de raíces. Se observaron dos tipos de raíces: las raíces neoformadas (procedentes de callos) y las adventicias. La aclimatación se realizó con éxito en sustrato de turba y vermiculita. La regeneración de las vitroplantas a partir de nudos y ápices permite distinguir a lo largo de la plántula un gradiente morfogénico acrópeto. **Discusión y conclusión.** Estos resultados podrán explotarse para la puesta a punto de una micropropagación conforme a partir de rebrotes jóvenes procedentes de la corta de un *Dacryodes edulis* que presente características interesantes.

Camerún / *Dacryodes edulis* / clonación / micropropagación / medio de cultivo / sustancias de crecimiento vegetal / carbón activado / explantes / regeneración *in vitro*