

## Multiplication végétative *in vitro* de *Nauclea diderrichii* (De Wild & T. Durand) Merrill, une espèce forestière de bois d'œuvre rare et menacée de disparition au Togo

### [ *In vitro* vegetative multiplication of *Nauclea diderrichii* (De Wild & T. Durand) Merrill, an endangered forest species in Togo ]

Pitekelabou Rassimwai<sup>1-2</sup>, Aidam Atsou Vincent<sup>2</sup>, Kokou Kouami<sup>3</sup>, Kokoutsè Adzo Dzifa<sup>3</sup>, Etsè Kodjo Djidjolé<sup>2</sup>, Adjonou Kossi<sup>3</sup>, Glato Kodjo<sup>2</sup>, and Aliaki Esozima<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institut Togolais de Recherche Agronomique, Centre de Recherche Agronomique du Littoral (ITRA/CRAL), Laboratoire de Défense des Cultures et Biosécurité, Lomé, Togo

<sup>2</sup>Laboratoire de Physiologie et Biotechnologie Végétales, Faculté des Sciences, Université de Lomé, Lomé, Togo

<sup>3</sup>Laboratoire de Botanique et Ecologie Végétale, Faculté des Sciences, Université de Lomé, Lomé, Togo

Copyright © 2015 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**ABSTRACT:** *Nauclea diderrichii*, is a forest species whose seeds germination is difficult in its biotope. Its overexploitation for its very resistant wood against the attacks leads to its disappearance in Togo. *In vitro* micropropagation trials were carried out for his faster and massive regeneration. *In vitro* seedlings apexes had been cultivated on four media (MS, ½ MS, WPM and ½ WPM). The high ionic concentration in macroelements in the culture medium is harmful to *N. diderrichii*'s seedlings development. Complete Woody Plant Medium (WPM) (41,54mM) allowed a better growth of the seedlings during initiation phase. Among both cytokinins (BAP and Kinetin) used, BAP at 2 mg/L, has gave a better multiplication rate ( $13,65^d \pm 5.71$  nodes/seedling). Among three auxins (IBA, NAA and 2,4-D) used at 0,1mg/L, IBA has gave seedlings with vigorous roots which are better appropriate for weaning, that those obtained with NAA. 2,4-D produced only calluses. The weaning of the seedlings, realized on vermiculite was succeeds at 100%. Thus fast and massive multiplication of *N. diderrichii* can be done *in vitro* on WPM added with BAP at 2 mg/L. IBA at 0,1mg/L is the auxin which is better appropriate for improvement of seedlings' rooting.

**KEYWORDS:** Togo, Litimé, *Nauclea diderrichii*, *in vitro* micropropagation, cytokins, auxins.

**RESUME:** *Nauclea diderrichii*, est une espèce forestière dont la germination de ses graines est difficile dans son biotope. Sa surexploitation pour son bois très résistant aux attaques entraîne sa disparition au Togo. Pour sa régénération rapide et en masse les essais de sa micropropagation *in vitro* ont été entrepris. Les apex des plants issus de la germination *in vitro* des graines ont été repiqués sur quatre milieux différents (MS, ½MS, WPM et ½WPM). La concentration ionique élevée en macroéléments dans le milieu de culture est nuisible au développement des plantules de *N. diderrichii*. Le milieu WPM complet (41,54mM) a permis une meilleure croissance des plantules pendant la phase d'initiation.

Parmi les deux cytokinines (BAP et Kinétine) utilisées, la BAP à 2 mg/L, a permis d'avoir un meilleur taux de multiplication ( $13,65^d \pm 5,71$  nœuds/plant). Dès 3 auxines (AIB, ANA et 2,4-D) utilisées tous à 0,1mg/L, l'AIB a permis d'avoir des plantules avec des racines plus vigoureuses qui conviennent mieux au sevrage, que celles obtenues avec l'ANA. Le 2,4-D n'a produit que des cals. Le sevrage des plants, réalisé sur de la vermiculite a été réussi à 100%.

Ainsi la multiplication rapide et en masse de *N. diderrichii* peut se faire *in vitro* sur le milieu WPM additionné de la BAP à 2 mg/L. L'AIB à 0,1mg/L est l'auxine qui convient mieux pour l'amélioration de l'enracinement des plantules.

**MOTS-CLES:** Togo, Litimé, *Nauclea diderrichii*, micropropagation *in vitro*, cytokines, auxines.

## ABBREVIATIONS:

NAA: Naphthaleneacetic acid; 2,4-D: 2,4 dichlorophenoxyacetic acid  
IBA: Indol-3-butyric acid; BAP: benzylaminopurine; GA<sub>3</sub>: gibberellic Acid A<sub>3</sub>  
WPM: woody Plant Medium; MS: Murashige and Skoog

## ABBREVIATIONS:

ANA : acide naphthalène-acétique ; 2,4-D : acide 2,4 dichlorophénoxyacétique  
AIB : acide indole-3-butyrique ; BAP : benzyladéninepurine ; GA<sub>3</sub> : acide gibbérellique A<sub>3</sub>  
WPM: woody plant medium; MS: Murashige et Skoog

## 1 INTRODUCTION

Les espèces forestières ligneuses se multiplient souvent par leurs graines [1]. Cependant, il arrive que les graines produites soient dormantes. Dans ce cas la régénération des plants de ce type d'espèce pose problème. *N. diderrichii* fait partie de ces espèces dont les graines ne germent pas sous les semenciers car ces dernières sont dormantes [2]. C'est une espèce forestière atteignant 35 à 40 m de haut, appartenant à la famille des Rubiaceae, qui se retrouve dans la forêt tropicale africaine depuis la Sierra-Léone jusqu'en Ouganda en passant par l'Afrique centrale et certaines parties de l'Afrique de l'Est [3].

Au Togo, cette espèce se rencontre seulement dans la plaine du Litimé en zone forestière du Togo [4]. Dans cette forêt du Litimé, [5] et [6] ont observé que les semenciers de cet arbre produisent un grand nombre de fruits renfermant chacun de nombreuses petites graines. Mais, malgré ce grand nombre de semences, aucune jeune pousse n'est rencontrée sous les semenciers.

Partant de cette remarque, la régénération *in situ* pose alors des problèmes et par là celui de la sylviculture de l'espèce. Ce déficit de germination *in situ* est très préoccupant quand on sait que l'espèce est abusivement exploitée par les scieurs locaux qui de surcroît, ne pensent pas à son reboisement. En effet, cette espèce fournit du bois d'œuvre très résistant aux champignons (*Coriolus versicolor*), aux Lyctus, aux termites (*Reticulitermes santonensis*) et aux foreurs marins [7]. En Afrique et particulièrement dans le bassin du Congo, le bois de *N. diderrichii* est très recherché pour sa qualité [8] et plusieurs organes de l'arbre sont utilisés en médecine traditionnelle [9], [10]. D'après, [11], la pulpe du fruit mûr est comestible par les Hommes et les animaux sauvages comme les éléphants.

Compte tenu de ses usages multiples (médicinale, bois d'œuvre), l'utilisation de l'espèce en sylviculture devient urgent; surtout que cette essence est considérée comme espèce rare au Togo [12] à cause de sa faible répartition géographique. Sa sylviculture, doit passer par la disponibilité du matériel de plantation, or la germination de ses graines pose problème.

[13], ont montré que les graines de *N. diderrichii* ont une viabilité courte et leur extraction des fruits est difficile. Selon [14], face au problème d'extinction de cette espèce, sa régénération artificielle devient nécessaire. Pour [15], il est important de mettre en place d'autres méthodes de multiplication rapide qui permettront d'avoir du matériel de plantation à grande échelle. Pour [16], la multiplication végétative était la seule alternative en foresterie pour fournir un grand stock du matériel de plantation et la multiplication du génotype désiré. En effet il existe quatre principales méthodes de multiplication végétative: le bouturage, le greffage, le marcottage et la culture *in vitro*. Parmi ces quatre méthodes, la culture *in vitro* est appliquée avec succès à plusieurs plantes comme c'est le cas ici avec *N. diderrichii*. Cette technique permet d'avoir en un temps court non seulement un grand nombre de plants mais aussi des plants génétiquement homogènes [17]. C'est dans cette optique que cette étude est réalisée pour mettre en place une technique de production rapide et en masse des plants de *N. diderrichii*. Il s'agit spécifiquement de trouver le meilleur milieu de culture, la meilleure cytokinine pour la multiplication végétative rapide *in vitro*, la meilleure auxine pour l'enracinement des plants et le meilleur milieu pour l'acclimatation des plants.

## 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le matériel végétal utilisé est constitué des segments uninodaux des jeunes pousses issues de la germination *in vitro* des graines de *N. diderrichii*. La culture a été initiée à partir des graines extraites des fruits au laboratoire en délayant ces dernières dans l'eau. Elles sont ensuite tamisées et séchées à l'air du climatiseur pendant 7 jours. Ces graines séchées sont ensuite désinfectées superficiellement en les trempant successivement dans l'alcool éthylique à 70° pendant 4 minutes, dans

de l'hypochlorite de sodium à 75% v/v pendant 3 minutes, dans l'alcool éthylique à 95° pendant 2 minutes, puis dans l'eau distillée pendant 3 minutes trois fois.

L'initiation de la culture a été faite dans les Boîtes de Pétri sur le milieu complet de [18]. Ce milieu a été supplémenté au saccharose à 30 g/L et solidifié avec de l'agar-agar à 8 g/L; le pH étant ajusté entre 5,6 et 5,7 avec du NaOH à 1N ou du HCl à 1N puis autoclavé à 120°C sous une pression de 1 bar pendant 20 minutes. Les graines désinfectées et lavées sont mises à germer sur ce milieu. Après germination les apex sont prélevés et cultivés sur deux milieux complets : celui de [18] et de [19] et sur leur dilution de moitié (½MS et ½WPM). Ces quatre milieux sont différenciés par seulement, le type et la concentration des macroéléments (macroéléments MS et WPM) (tableau 1). Les microéléments, les vitamines et le Fer chélaté MS ont été communs à tous les milieux. Ils ont été supplémentés au saccharose à 30 g/L et solidifiés avec de l'agar-agar à 8 g/L; le pH étant ajusté entre 5,6 et 5,7 avec du NaOH à 1N ou du HCl à 1N. Le milieu est ensuite reparti dans des tubes de 20 x 150 mm puis autoclavé à 120°C sous une pression de 1 bar pendant 20 minutes. Les tubes contenant le matériel repiqué sont placés dans une chambre de culture avec une photopériode de 16 heures, une température de 27 ± 2°C et une intensité lumineuse de 120 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. L'éclairage est fourni par des tubes fluorescents. Les plantes issues de la culture des apex sont découpées en segments uninodaux et chacun est repiqué sur le même milieu que celui des explants primaires, les conditions de culture restant identiques. Les repiquages ont été effectués toutes les six semaines. A la fin de chaque semaine, il a été relevé le nombre de racines, de pousses et de nœuds; l'allongement de la tigelle de chaque plantule a été mesuré. Chaque mesure a été faite sur vingt individus, avec 2 répétitions par traitement.

**Tableau 1 : Composition et concentration ionique des macroéléments des milieux utilisés**

	MS		½MS		WPM		½WPM	
	mg/L	mM	mg/L	mM	mg/L	mM	mg/L	mM
Macroéléments								
CaCl <sub>2</sub>	332,02	2,99	166,01	1,495	72,50	0,65	36,25	0,325
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	471,26	2,35	235,63	1,175
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,00	1,25	85,00	0,625	170,00	1,25	85,00	0,625
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	-	990,00	5,68	495,00	2,84
MgSO <sub>4</sub>	180,54	1,50	90,27	0,75	180,54	1,50	90,27	0,75
KNO <sub>3</sub>	1900,00	18,79	950,00	9,395	-	-	-	-
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650,00	20,61	825,00	10,305	400,00	5,00	200,00	2,50
Concentration ionique totale (mM)		93,27		46,64		41,54		20,77

MS: milieu de Murashige et Skoog, ½MS : dilution de moitié de MS, WPM : woody plant medium, ½WPM : dilution de moitié de WPM.

Pour améliorer le taux de multiplication, des explants ont été repiqués sur un nouveau milieu WPM complet additionné de la BAP ou de la Kinétine à (0,05-0,1-1-2 et 5 mg/L); ou de la BAP à 2 mg/L combiné à différentes concentrations (0,1- 0,5- 1 mg/L) de GA<sub>3</sub>.

L'amélioration de l'enracinement des explants est faite en repiquant des explants sur un nouveau milieu WPM complet additionné soit de l'AIB, de l'ANA, ou du 2,4-D; tous à 0,1 mg/L ou de AIB à différentes concentrations (0,1-0,2-0,3-0,4-0,5 et 1 mg/L).

Le sevrage a été fait dans les bacs de sevrage sur de la vermiculite. Les racines des plantules sorties des tubes ont été lavées pour les débarrasser de toute trace de gélose. Elles ont été ensuite repiquées dans de petits pots contenant de la vermiculite, puis le tout a été mis dans les bacs de sevrage hermétiquement fermés et laissés dans la salle de culture. Les plants ont été arrosés chaque 2 jours avec de l'eau de robinet pour maintenir constante l'humidité pendant 2 semaines.

Après ces 2 semaines les plants ont été transférés dans la serre dans les sachets contenant certains du terreau simple et d'autres du mélange de  $\frac{2}{3}$  terreau et de  $\frac{1}{3}$  des fèces des moutons. Leur croissance a été suivie pendant 3 mois avant leur transfert en champs.

Les données recueillies ont été saisies et les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel STATISTICA version10.

### 3 RESULTATS

#### 3.1 PHASE D'INITIATION

##### 3.1.1 DEVELOPPEMENT DES PLANTULES SUR MILIEU MS, $\frac{1}{2}$ MS, WPM ET $\frac{1}{2}$ WPM

Le pourcentage des explants ayant émis des racines, sur ces différents milieux était de 75% sur le MS et 100% sur les autres milieux. Les plantules obtenues sur le milieu WPM complet ont des entre-nœuds plus longs, des feuilles plus larges et des pousses plus grosses que sur les trois autres milieux (photo 1). Ces plantules ont eu une meilleure croissance par rapport aux plantules des trois autres milieux. Par contre, aucune différence significative selon le test de Newman et keuls au seuil de 5%, n'est observée en ce qui concerne, le nombre de racines, de nœuds et celui de pousses par plantule, entre les quatre milieux (tableau 2). Les plantules de tous les milieux ne poussent pas assez de racines secondaires. Cette absence de racines secondaires sur celles primaires est plus marquée au niveau des plantules du milieu MS complet.

**Tableau 2 : Comportement des plantules sur milieu MS,  $\frac{1}{2}$ MS, WPM et  $\frac{1}{2}$ WPM, après six semaines de culture**

Milieux	Racines/plant	Nœuds/plant	Pousses/plant	Taille d'un plant (cm)
WPM	3,10 <sup>a</sup> ± 1,52	5,45 <sup>a</sup> ± 1,54	3,00 <sup>a</sup> ± 1,34	3,44 <sup>c</sup> ± 0,96
MS	1,65 <sup>b</sup> ± 1,23	4,70 <sup>a</sup> ± 2,15	3,25 <sup>a</sup> ± 1,59	1,52 <sup>b</sup> ± 1,08
WPM/2	2,65 <sup>a</sup> ± 1,53	5,45 <sup>a</sup> ± 2,04	3,25 <sup>a</sup> ± 1,62	2,20 <sup>a</sup> ± 0,86
MS/2	3,15 <sup>a</sup> ± 1,14	4,90 <sup>a</sup> ± 1,83	3,05 <sup>a</sup> ± 1,47	2,46 <sup>a</sup> ± 1,20

Moyenne ± écart-type sur 20 explants en deux répétitions. Les valeurs affectées de la même lettre dans la même colonne, ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman-Keuls à  $P < 0,05$ .

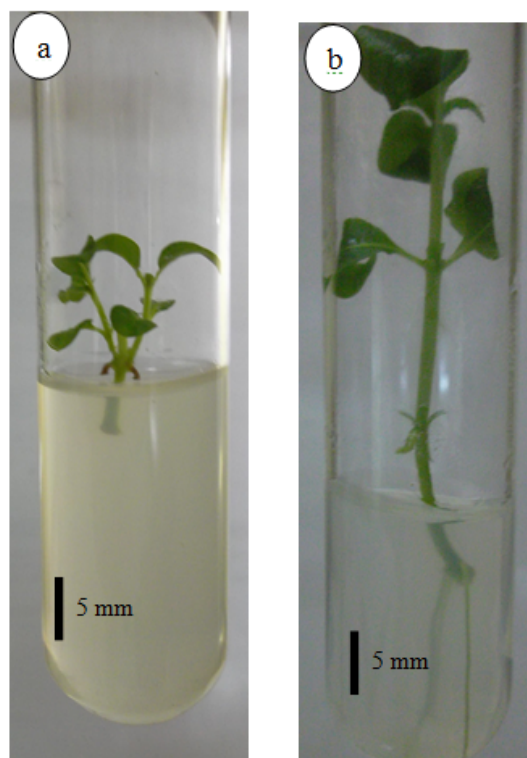


Photo 1 : Plantules de 6 semaines sur milieu MS (a) et WPM (b)

### 3.2 PHASE DE MULTIPLICATION

#### 3.2.1 AUGMENTATION DU TAUX DE MULTIPLICATION SOUS L'EFFET DE LA BAP ET DE LA KINETINE

Le nombre de pousses et de nœuds par plantule a été fonction de la concentration de la BAP ou de la Kinétine. La BAP à 2mg/L, a favorisé mieux la prolifération en donnant  $13,65^d \pm 5,71$  nœuds et  $9,30^d \pm 4,26$  pousses par plantule. A cette même concentration, la kinétine n'a donné que  $4,90^{ab} \pm 1,55$  nœuds et  $2,55^{ab} \pm 0,60$  pousses par plantule (tableau 3 et photo 2). Cependant, il y a eu formation des cals à la base des plantules en fonction de la concentration en phytohormone dans le milieu. A la même concentration, les cals formés en présence de la BAP sont plus gros que ceux formés en présence de la Kinétine. En présence de la BAP, les entre-nœuds des plantules sont courts avec de petites feuilles, l'inverse est observé avec la Kinétine.

Tableau 3: Effet de la BAP et de la Kinétine sur le taux de multiplication de *N. diderrichii*, après six semaines de culture

Milieux	Nœuds/plant	Pousses/plant	Taille d'un plant (cm)
Témoin	$4,85^{ab} \pm 1,39$	$2,90^{ab} \pm 1,12$	$3,48^{bc} \pm 1,56$
BAP 0,05 mg/L	$2,80^a \pm 0,83$	$1,50^a \pm 0,51$	$2,76^{ab} \pm 1,36$
BAP 0,1 mg/L	$3,80^{ab} \pm 0,83$	$2,10^{ab} \pm 0,55$	$3,53^{bc} \pm 1,04$
BAP 1 mg/L	$10,35^c \pm 2,83$	$7,15^c \pm 2,72$	$2,92^{ab} \pm 0,70$
BAP 2 mg/L	$13,65^d \pm 5,71$	$9,30^d \pm 4,26$	$2,35^a \pm 0,66$
BAP 5 mg/L	$10,50^c \pm 5,62$	$7,75^c \pm 3,95$	$2,08^a \pm 0,57$
Kiné 0,05 mg/L	$3,30^{ab} \pm 0,66$	$1,55^a \pm 0,51$	$4,03^c \pm 1,69$
Kiné 0,1 mg/L	$2,80^a \pm 0,52$	$1,45^a \pm 0,51$	$3,10^{abc} \pm 1,26$
Kiné 1 mg/L	$4,05^{ab} \pm 1,79$	$2,65^{ab} \pm 1,09$	$2,49^{ab} \pm 1,33$
Kiné 2 mg/L	$4,90^{ab} \pm 1,55$	$2,55^{ab} \pm 0,60$	$2,80^{ab} \pm 1,15$
Kiné 5 mg/L	$5,55^b \pm 2,09$	$3,50^b \pm 1,47$	$2,99^{ab} \pm 0,97$

Moyenne  $\pm$  écart-type sur 20 explants en deux répétitions. Les valeurs affectées de la même lettre dans la même colonne, ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman-Keuls à  $P < 0,05$ .



Photo 2: Effet de BAP (a) et de Kiné (b), tous à 2 mg/L

### 3.2.2 AMELIORATION DE LA LONGUEUR DES ENTRE-NŒUDS DES PLANTULES SOUS L'EFFET DE LA BAP ET DU GA<sub>3</sub>

L'observation après six semaines de repiquage a montré qu'à faible concentration, GA<sub>3</sub> améliore la croissance des plantules. En effet avec la BAP 2 mg/L + GA<sub>3</sub> 0,1 mg/L, la taille des plantules (3,59 cm) est significativement différente de celle des plantules (2,35 cm) sur milieu à BAP 2 mg/L + GA<sub>3</sub> 0 mg/L. A l'inverse lorsque la concentration du GA<sub>3</sub> augmente dans le milieu, l'effet bénéfique de la BAP sur le taux de multiplication diminue. Ainsi sur le milieu à BAP 2 mg/L + GA<sub>3</sub> 0 mg/L, il a été obtenu un taux de multiplication de 13,65<sup>d</sup> ± 5,71 nœuds et 9,30<sup>d</sup> ± 4,26 pousses par plant; contre seulement 5,45<sup>a</sup> ± 2,61 nœuds et 3,20<sup>a</sup> ± 1,64 pousses par plant sur le milieu à BAP 2 mg/L+GA<sub>3</sub> 0,1 mg/L. L'augmentation de la concentration du GA<sub>3</sub> dans le milieu n'a pas eu d'effet significatif sur l'organogénèse des plantules (tableau 4).

Tableau 4: Effet de la BAP 2 mg/L combiné à différentes concentration du GA<sub>3</sub>, après six semaines de culture

Milieux	Nœuds/plant	Pousses/plant	Taille d'un plant (cm)
BAP 2 mg/L	13,65 <sup>b</sup> ± 5,71	9,30 <sup>b</sup> ± 4,26	2,36 <sup>a</sup> ± 0,66
BAP 2 mg/L + GA <sub>3</sub> 0,1 mg/L	5,45 <sup>a</sup> ± 2,61	3,20 <sup>a</sup> ± 1,64	3,59 <sup>b</sup> ± 1,17
BAP 2 mg/L + GA <sub>3</sub> 0,5 mg/L	5,50 <sup>a</sup> ± 3,49	3,70 <sup>a</sup> ± 2,20	2,61 <sup>a</sup> ± 1,13
BAP 2 mg/L + GA <sub>3</sub> 1 mg/L	5,05 <sup>a</sup> ± 3,12	3,00 <sup>a</sup> ± 2,05	2,32 <sup>a</sup> ± 0,99

Moyenne ± écart-type sur 20 explants en deux répétitions. Les valeurs affectées de la même lettre dans la même colonne, ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman-Keuls à P < 0,05.

### 3.3 PHASE D'ENRACINEMENT

#### 3.3.1 CHOIX DE LA MEILLEURE AUXINE

Après six semaines de culture, les plantules sur le milieu contenant l'ANA ont produit plus de racines ( $10,10^d \pm 3,35$  racines/plantule). Mais ces racines ne sont pas vigoureuses comme celles produites sur le milieu contenant l'AIB. Aucune racine n'a été initiée sur le milieu contenant 2,4-D (tableau 5). Tous les explants repiqués sur le milieu contenant 2,4-D, n'ont formé que de gros cals blanchâtres. Il a été observé également de gros cals à la base des plantules sur le milieu à ANA avec 85% des plantules vitrifiées. Par contre sur le milieu à AIB, il n'y a eu que des cals cicatriciels à base des plantules avec seulement 15% des plantules vitrifiées.

**Tableau 5 : Effet de 3 auxines sur l'enracinement des vitroplants de *N. diderrichii*, après six semaines de culture**

Auxines (0,1mg/L)	Vitrification	Racines/plant	Nœuds/plant	Taille d'un plant (cm)
ANA	85,00%	$10,10^d \pm 3,35$	$3,45^a \pm 1,10$	$4,00^a \pm 1,85$
AIB	15,00%	$4,30^c \pm 1,53$	$4,35^c \pm 1,35$	$5,05^a \pm 1,61$
2,4-D	-	$0,00^a \pm 0,00$	$0,00^b \pm 0,00$	$0,00^b \pm 0,00$
Témoin	0,00%	$2,95^b \pm 1,23$	$3,50^a \pm 1,10$	$4,14^a \pm 1,54$

Moyenne  $\pm$  écart-type sur 20 explants en deux répétitions. Les valeurs affectées de la même lettre dans la même colonne, ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman-Keuls à  $P < 0,05$ .

#### 3.3.2 EFFET DE LA CONCENTRATION D'AIB SUR L'ENRACINEMENT DES VITROPLANTS

Il a été observé que les plantules ont produits à leur base des cals dont la taille a augmenté avec la concentration d'AIB. La présence de ces gros cals à la base des plantules ne favorise pas un bon sevrage, car les racines se cassent au cours des manipulations pour le sevrage. Cependant, il a été noté que les racines produites avec des concentrations élevées d'AIB sont plus petites, moins vigoureuses mais plus nombreuses par plantule. A 0,1 mg/L d'AIB, il a été obtenu  $5,60^{ab} \pm 1,35$  racines vigoureuses par plantule qui s'apprêtent mieux au sevrage que  $25,00^f \pm 0,00$  racines fragiles par plantule obtenues en présence de 1 mg/L d'AIB (tableau 6)

**Tableau 6: Effet de différentes concentrations d'AIB sur l'enracinement des vitroplants, après six semaines de culture**

Concentration en AIB	Vitrification	Racines/plant	Nœuds/plant	Taille d'un plant (cm)
0,00 mg/L	0,00 %	$3,65^d \pm 1,42$	$2,90^a \pm 0,79$	$4,12^c \pm 1,03$
0,10 mg/L	15,00%	$5,60^{ab} \pm 1,35$	$3,90^b \pm 1,12$	$5,26^{ac} \pm 1,29$
0,20 mg/L	20,00%	$5,15^a \pm 1,53$	$3,80^b \pm 1,15$	$6,49^{ab} \pm 1,94$
0,30 mg/L	30,00%	$6,15^{bc} \pm 1,09$	$3,75^b \pm 0,91$	$6,44^{ab} \pm 2,14$
0,40 mg/L	30,00%	$6,70^c \pm 1,41$	$4,60^c \pm 1,19$	$7,23^b \pm 1,47$
0,50 mg/L	30,00%	$20,00^e \pm 0,73$	$3,05^a \pm 0,69$	$6,15^{ab} \pm 1,74$
1,00 mg/L	35,00%	$25,00^f \pm 0,00$	$2,75^a \pm 0,72$	$4,28^c \pm 1,74$

Moyenne  $\pm$  écart-type sur 20 explants en deux répétitions. Les valeurs affectées de la même lettre dans la même colonne, ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman-Keuls à  $P < 0,05$ .

### 3.4 PHASE D'ACCLIMATATION

Il a été obtenu un taux de réussite de 100% lors de l'acclimatation des vitroplants. Les plants sur le substrat constitué du mélange du terreau et des fèces des moutons se sont mieux développés que ceux se trouvant sur du terreau simple (figure 1).

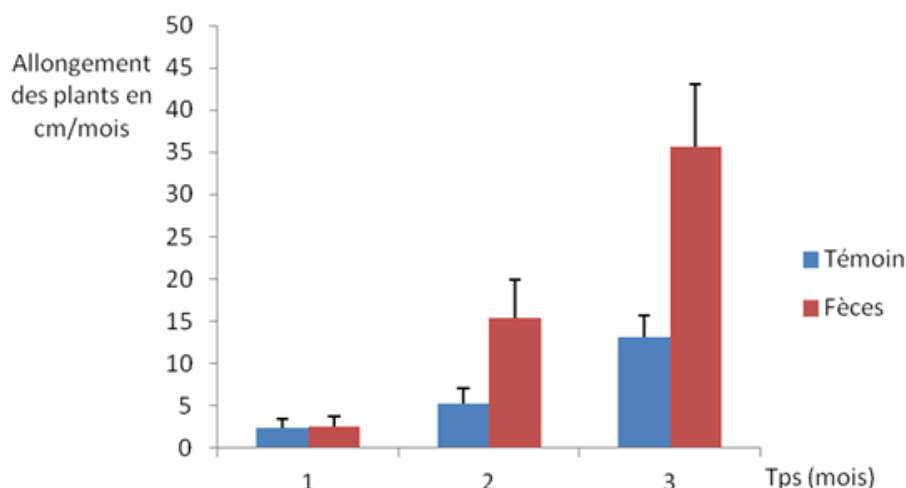


Figure 1: Croissance des vitroplants sevrés dans la serre en présence ou non des fèces des moutons

#### 4 DISCUSSION

La réussite de la culture *in vitro* d'une espèce végétale est influencée par plusieurs facteurs dont le milieu de culture [20] et les phytohormones [21]. En effet la richesse du milieu en sels minéraux influence le développement des plantules. Au cours de ce travail, il a été observé que le milieu MS avec une concentration ionique plus élevée (93,27 mM) n'a pas favorisé une bonne croissance des plants. En effet, les vitroplants de *N. diderrichii* obtenus sur le milieu WPM à concentration ionique moyenne (41,54 mM) se sont mieux développés que ceux obtenus sur milieu MS complet. Ce résultat est similaire à celui obtenu par [22], [23] chez *Ceratonia siliqua* L. A l'inverse, [24], [25], [26], ont montré que les macroéléments MS donnaient de meilleurs résultats que ceux de WPM respectivement chez *Zanthophyllum zanthoxyloides* Lam., *Malus sieboldii* et *Vitis rotundifolia*. Par contre [27] n'ont remarqué aucune différence dans le développement des vitroplants de *N. latifolia* sur milieu MS et WPM. La dilution de moitié du milieu MS (46,64mM) a amélioré significativement l'enracinement et la croissance des plantules par rapport au MS complet (93,27 mM). Donc la concentration ionique élevée en macroéléments dans le milieu de culture est nuisible au développement des plantules de *N. diderrichii*. Cependant dès quatre milieux utilisés, le milieu WPM complet (41,54 mM) a favorisé une meilleure croissance des plantules car la taille des plantules sur ce milieu est significativement différente de la taille des plantules des trois autres milieux.

L'effet comparé des deux cytokinines (BAP et Kinétine) à différentes concentrations a révélé qu'à la même concentration, la BAP donnait un fort taux de multiplication que la Kinétine. En effet en présence de 2 mg/L, la BAP a donné jusqu'à  $13,65^d \pm 5,71$  nœuds et  $9,30^d \pm 4,26$  pousses/plant, contre seulement  $4,90^{ab} \pm 1,55$  nœuds et  $2,55^{ab} \pm 0,60$  pousses/plant pour Kinétine.

La BAP paraît être la meilleure cytokinine pour la micropropagation de *N. diderrichii*. Ce résultat est en accord avec ceux de [28], [29] qui ont travaillé sur divers Chênes et avec celui de [30] sur *Actinidia deliciosa*. Cette phytohormone a permis à [31] d'obtenir un fort taux de régénération *in vitro* de *Bacopa monneiri* (L) Penn. [32], a également montré que la BAP à 2 mg/L a permis d'obtenir un bon taux de multiplication chez *Sterculia setigera* Del. Il souligne par ailleurs que la Kinétine n'a favorisé que la meilleure croissance caulinaire avec une plus grande vigueur des vitroplants.

De leur côté, [33] ont trouvé que la BAP à 5 mg/L favorisait le développement des différents explants mis en culture comparativement à la kinétine à 5 mg/L en présence de 2 g/L de charbon actif sur milieu MS. Par contre [34], [35] ont montré que c'est la combinaison de la BAP et de la Kinétine qui leur a permis d'augmenter le taux de multiplication respectivement chez *Terminalia bellerica* Roxb. et *Dalbergia sissoo*.

Par ailleurs il a été observé que la micropropagation *in vitro* de *N. diderrichii* peut se faire avec ou sans phytohormone dans le milieu de culture car l'initiation et le développement des pousses sur ce milieu a pu se faire. Par contre pour [36], la présence de la BAP dans le milieu est indispensable pour l'initiation et le développement des bourgeons de *Quercus suber*. Si à 2 mg/L, la Kinétine n'a aucun effet sur les vitroplants de *N. diderrichii*, la BAP à cette concentration dans le milieu de culture augmente le potentiel de formation de pousses et nœuds chez cette espèce. A cette dose, [37], ont obtenu une meilleure multiplication de *Melissa officinalis* L.



L'effet de la BAP sur les vitroplants de *N. diderrichii* est contraire à celui trouvé par [38], qui n'ont trouvé aucune différence significative sur le milieu GD [39] en testant plusieurs concentrations de la BAP (0 ; 0,44 ; 0,88 ; 1,76 ; 2,64 ; 3,52 et 4,4  $\mu\text{M}$ ) sur le débourrement des bourgeons axillaires de *Quercus robur*.

Selon les travaux de [22], la phase de multiplication de *Ceratonia siliqua* L. est optimale avec la BAP à (2,22 et 4,44  $\mu\text{M}$ ). Ils notent cependant que, la combinaison de la BAP (2,22  $\mu\text{M}$ ) et  $\text{GA}_3$  à 1,44  $\mu\text{M}$  donne des pousses plus chlorophylliennes.

Cependant, [40], ont montré chez plusieurs Chênes que la forte concentration en BAP (8,8  $\mu\text{M}$ ) dans le milieu conduisait à la formation des pousses anormales ou au développement de cals qui couvrent l'explant, empêchant le développement normal des pousses.

Les concentrations de la BAP utilisées au cours de ce travail, ont entraîné la formation des cals à la base des pousses dont la taille était fonction de la concentration de la BAP. Ce résultat similaire a été trouvé chez *Quercus robur* cultivé sur le milieu GD en présence de 1  $\mu\text{M}$  de la BAP [41].

La combinaison de la BAP à 2 mg/L et  $\text{GA}_3$  à différentes concentrations (0,1- 0,5 et 1 mg/L) dans le milieu de culture, a eu un effet inhibiteur sur la formation des pousses. En effet en présence de 2 mg/L de la BAP + 0,1 mg/L de  $\text{GA}_3$ , il a été obtenue que  $3,20^a \pm 1,64$  pousses/plant contre  $9,30^b \pm 4,26$  en présence de 2 mg/L de la BAP sans  $\text{GA}_3$ . La combinaison avec  $\text{GA}_3$  à 0,1 mg/L a permis néanmoins d'améliorer la croissance des plants. Ce qui est en désaccord avec les résultats obtenus chez *Quercus robur* par [42]. Cependant en présence de la concentration élevée (0,5 et 1 mg/L) de  $\text{GA}_3$ , la croissance des pousses est ralentie.

Le 2,4-D utilisé pour l'amélioration de l'enracinement des vitroplants de *N. diderrichii* n'a permis aucun débourrement, tous les explants se sont transformés en cals. Les deux autres auxines (ANA et AIB), ont permis d'améliorer l'enracinement des vitroplants de *N. diderrichii*. Ce résultat est l'inverse de celui trouvé par [35] chez *Dalbergia sissoo*. Cependant les racines obtenues en présence d'ANA ( $10,10^d \pm 3,35$ /plant), ne sont pas vigoureuses comme celles obtenues en présence d'AIB ( $4,30^c \pm 1,53$ /plant). Ainsi l'AIB paraît être l'auxine convenable pour l'amélioration de l'enracinement des vitroplants de *N. diderrichii*. Cette auxine, à des doses élevées (0,2-0,3-0,4-0,5 et 1 mg/L) augmente considérablement le nombre de racines (petites) par plant, de vitrification de plants et entraîne la formation de gros cals. Ce résultat est contraire à celui obtenu par [43] chez *Hibiscus cannabinus* L. où l'utilisation de 2 mg/L d'AIB n'a entraîné aucune formation des cals au niveau des plantules.

## 5 CONCLUSION

La multiplication végétative *in vitro* des plants de *N. diderrichii* a été possible au cours de ce travail. Le milieu WPM additionné de la BAP à 2 mg/L peut être recommandé pour la phase de multiplication. L'AIB à 0,1mg/L est l'auxine qui convient mieux pour l'amélioration de l'enracinement des plantules. Sans difficulté, les plants multipliés et enracinés sont acclimatés et transférés en champs.

Ainsi la régénération rapide et en masse des plants de *N. diderrichii* peuvent se faire par la technique de culture *in vitro* permettant de contourner les difficultés rencontrées dans la germination des graines de cette espèce.

## REFERENCES

- [1] A. Martin, Germination et dispersion des grains chez *Glaucium Flavum crantz* (Papaveraceae), Acta Botanica Malacitana, 21:71-78, 1996.
- [2] W.D. Hawthorne, Ecological profiles of Ghanaian forest trees. Oxford Forestry Institute: Oxford. Pp.345, 1995(a).
- [3] R. Wagenfuhr, Holzatlas 5. Auflage, Fachbuchverlag Leipzig im Carl Hanser Verlag, Munchen 707, 2000.
- [4] H. Ern, Die Vegetation Togos, Gliederung, Gefährdung, Erhaltung, Willdenovia, 9: 295- 312, 1979.
- [5] K. Kokou, Y. Nuto, et K. Adjonou, Restaurer les forêts tropicales ouest africaines avec les espèces locales: cas de *Nauclea diderrichii* dans le Litimé (Sud-ouest des monts du Togo). Rev Sc. Env. Univ., Lomé(Togo) n°04 : 24p, 2008.
- [6] K. Adjonou, Y. Nuto, P. Bosu, S. Adu-Bredu, A.D. Kokutse, K. Kokou, Natural Distribution of *Nauclea diderrichii* (Rubiceae) in Semi Deciduous Forest of Togo (West Africa) and Implementation of Integrated Silviculture. American Journal of Plant Sciences, 5 : 1220-1235, 2014.
- [7] J. Gérard, A. Edi Kouassi, C. Daigremont, P. Détienne, D. Fouquet, M. Vernay, Synthèse sur les caractéristiques technologiques des bois commerciaux africains. Série FORAFRI, Document 11, 1998.

- [8] V. Kimpouni, Etude du marché préliminaire sur les produits forestiers non ligneux commercialisés dans les marchés de Pointe-Noire (Congo Brazaville). In Les produits forestiers non ligneux en Afrique centrale: Recherches actuelles et perspectives pour la conservation et le développement. FAO, Rome
- [9] V. Alexis, F. Mustofa, V.P. Benoit, P. Yves, and M. Michele, Antiplasmodial activity of plant extracts used in west African traditional medicine, *Journal of Ethno pharmacology*, 73(1-2): 145 -151, 2000.
- [10] O. Ndoye, M. Ruiz Perez, A.M. Mamoun, D. Lema Ngono, Les effets de la crise économique et de la dévaluation du francs CFA sur l'utilisation des plantes médicinales au Cameroun: implication pour la gestion durable des forêts, 1998.
- [11] J. Vivien, et J.J. Faure, *Fruitiers sauvages d'Afrique – Espèces du Cameroun*, Editions NGUILA-KEROU, France : 416p, 1995.
- [12] PNUE, GEF Volta Project, Analyse Diagnostique Transfrontalière du bassin versant de la Volta, Rapport National Togo. UNEP/GEF/Volta/NR Togo 1/2010.
- [13] G.R. Caspa, L. Kuoudiekong, A.B. Nwegueh, T.S. Njeudeng, J.C Lahjou, and J. Onana, Effect of different substrates on rooting and shoot development of juvenile stem cuttings of *Nauclea diderrichii* (De Wilds & T. Durand) Merrill. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 3(5): 1124-1132, 2009.
- [14] J.C. Onyekwelu, H. Kateb, B. Stimm, R. Mosanddl, Growth characteristics of *Nauclea diderrichii* (De Wild & T. Durand) Merr. in unthinned plantation in south-Western Nigeria, 2003. [Online] Available : [muenchen.de/~waldbau/litorg0/314.pdf](http://muenchen.de/~waldbau/litorg0/314.pdf)
- [15] Q. Meunier, R. Bellefontaine, J.M. Boffa, and N. Bitahwa, Low-cost vegetative propagation of trees and shrubs: Technical handbook for Ugandan rural communities, 36, 2006.
- [16] B. Zobel, and J.A. Talbert, *Applied Forest Tree Improvement*. Wiley: New York, 1984.
- [17] R. García-González, K. Quiroz, B. Carrasco, and P. Caligari, Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges, *Ciencia e investigación agraria*, 37(3):5- 30, 2010.
- [18] T. Murashige, and F. Skoog, A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture, *Plant Physiology*, 15(3): 473-497, 1962.
- [19] G. Lloyd, and B. McCown, *International Plant Propagation Society Proceedings*, 30: p421, 1980.
- [20] A.R. Leva, R. Petrucceli, and M. Panicucci, Ruolo di alcuni microelementi carboidrati nella proliferazione *in vitro* di cv Di olivo (*Olea europea* L). *Atti quattita olio extravergine di oliva*, Firenze, 1-3: p. 333, 1992.
- [21] M. Mencuccini, Micropropagazine e miglioramento genetico *in vitro* dell'olivo. Stato dell'arte e prospective future. *Riv. Fruttic. Ortofloricolt.* 57(12) : 73-82, 1995.
- [22] A. Lamarti, et R. Saidi, Le caroubier (*Ceratonia siliqua* L.): valorisation des gousses et micropropagation. Xles Journées Scientifiques du réseau "Biotechnologies végétales / Amélioration des plantes et sécurité alimentaire" de l'Agence universitaire de la Francophonie 30 juin-3 juillet 2008, Agrocampus Rennes. Rennes, France, 2008.
- [23] N. Gharnit, et A. Ennabili, Essais préliminaires de culture *in vitro* du caroubier (*ceratonia siliqua* L.) originaire du nord-ouest du Maroc, *Biomatec Echo*, Vol.3, n°6 : 18–25, 2009.
- [24] K.D. Etsè , A.V. Aïdam, C. de Zouza, J. Crèche and A. Lanoue, *In vitro* propagation of *Zanthoxylum zanthoxyloides* Lam., an endangered African medicinal plant, *Acta Botanica Gallica*, 158(1) : 47-55, 2011.
- [25] A.M. Ciccotti, C. Bisognin, I. Battocletti, A. Salvadori, M. Herdemertens, and W. Jarausch, Micropropagation of apple proliferation-resistant apomictic *Malus sieboldii* genotypes, *Agronomy Research*, 6(2): 445–458, 2008.
- [26] D.J. Gray and C.M. Beton, *In vitro* micropropagation and plant establishment of muscadine grape cultivars (*Vitis rotundifolia*), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 27: 7-14, 1991.
- [27] R. Pitekelabou, D. K. Etse, et A.V. Aïdam, Micropropagation et rhizogenèse *in vitro* chez *Nauclea latifolia* smith (Rubiaceae). *European Scientific Journal*, 9 (24) : 296- 307, 2013.
- [28] B. Juncker, et J.M. Favre, Long-term effects of culture establishment from shoot-tip explants in micropropagating oak (*Quercus robur* L.), *Annals of Forest Science*, 51(6): 581-588, 1994.
- [29] A. Romano, C. Noronha, et M.A Martins-Loução, Influence of growth regulators on shoot proliferation in *Quercus suber* L., *Annals of Botany (London)*, 70(6): 531-536, 1992.
- [30] A.F. Akbaş, Ç. İşikalan, S. Namli, and D. Başaran, Micropropagation of Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*), *International Journal of Agriculture & Biology*, vol.9, n°3: 489– 493, 2007.
- [31] C. Gurnani, V. Kumar, S. Mukhija, A. Dhingra, S. Rajpurohit, and P. Narula, *In vitro* regeneration of brahmi (*bacopa monneiri* (L.) penn.) - a threatened medicinal plant, *Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology*, vol. 8, no.1: 97- 99, 2012.
- [32] D. Bassirou, Etude du potentiel morphogénétique *in vitro* de *Sterculia setigera* Del. In Xles Journées Scientifiques du réseau "Biotechnologies végétales / Amélioration des plantes et sécurité alimentaire" de l'Agence universitaire de la Francophonie 30 juin-3 juillet 2008, Agrocampus Rennes. Rennes, France, 2008.

- [33] M.A.N. Sambe, A.L. N'doye, M. Sagna, et M.O. Sy, Apport d'un outil biotechnologique à la conservation du germplasma de baobab (*Adansonia digitata* L., Bombacaceae). Xles Journées Scientifiques du réseau "Biotechnologies végétales / Amélioration des plantes et sécurité alimentaire" de l'Agence universitaire de la Francophonie 30 juin-3 juillet 2008, Agrocampus Rennes. Rennes, France, 2008.
- [34] J. Mehta, M. Sain, L.B. Mathuriya, R. Naruka, A. Kavia, and R.D. Sharma, Rapid micropropagation and callus induction of *Terminalia bellerica* Roxb. -An endangered plant. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 2 (3): 364-368, 2012.
- [35] A. Ali, M. Rizwan, A. Majid, A. Saleem, and H.N. Naveed, Effect of media type and explants source on micropropagation of *Dalbergia sissoo*: A tree of medicinal importance, *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 6(9):1742-1751, 2012.
- [36] J.A. Manzanera, et J.A. Pardos, Micropropagation of juvenile and adult *Quercus suber* L., *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 21(1) : 1-8, 1990.
- [37] N. Mohebalipour, S. Aharizad, A.S. Mohammadi, R.A. Motallebiazar, and M.H. Arefi, Effect of plant growth regulators BAP and IAA on micropropagation of Iranian lemon balm (*Melissa officinalis* L.) landraces, *Journal of Food, Agriculture & Environment* Vol.10 (1): 280-286, 2012.
- [38] I.J. Puddephat, P.G. Alderson, N.A. Wright, Influence of explants source, plant growth regulators and culture environment on culture initiation and establishment of *Quercus robur* L. *in vitro*, *Journal of Experimental Botany*, 48(309): 951-962, 1997.
- [39] P.M. Gresshoff, and C.H. Doy, Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (Tomato), *Planta*, 107(2): 161-170, 1972.
- [40] M.G. Ostrolucka and M. Bezo, Utilization of meristem cultures in propagation of oak (*Quercus* sp.), *Genetica Polonica*, 35(3): 161-169, 1994.
- [41] B. Pevalek-Kozlina, and S. Jelaska, The regeneration ability in common oak (*Quercus robur* L.) callus cultures, *Acta Pharmaceutica*, 45(2, suppl. I): 165-398, 1995.
- [42] M.C. San-José, A.M. Vieitez, et E. Vieitez, Establecimiento y multiplicación *in vitro* de brotes del género *Quercus*, *Phyton* (Buenos Aires), 45(1) : 31-40, 1985.
- [43] S. Arbaoui, B. Campanella, R. Paul, et T. Bettaieb, Micropropagation *in vitro* d'une plante à fibres : le kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.), *Revue « Nature & Technologie »*. B- Sciences Agronomiques et Biologiques, n° 09 : 41 - 47, 2013.