

African Crop Science Journal by African Crop Science Society is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Uganda License. Based on a work at www.ajol.info/ and www.bioline.org.br/cs
DOI: <https://dx.doi.org/10.4314/acsj.v31i4.7>



INFLUENCE DU CHARBON ACTIF SUR LA CALLOGENESE DES FEUILLES IMMATURES DU PALMIER A HUILE

H.K. KOUAMÉ^{1,2}, M. TOURÉ², S. SIMARO^{1,2}, D.F. TRAORÉ^{1,2} et B.A. AHOUTY³

¹Université Alassane Ouattara, UFR Sciences et Technologies, 01 BPV 18, Bouaké, Côte d'Ivoire

²Centre d'Entomologie Médical et Vétérinaire, 01 BPV 18 Bouaké, Côte d'Ivoire

³Université Jean Lorougnon Guédé, UFR Agroforesterie, BP 150 Daloa, Côte d'Ivoire

Auteur correspondant : honoreigname@gmail.com

(Received 20 October 2023; accepted 29 November 2023)

RESUME

La production *in vitro* de plants issus de cultures tissulaires est un moyen de production massive des plants végétatifs exempts de maladies en vue d'une production commerciale rapide de jeunes plants de palmiers à huile (*Elaeis gumeensis* Jacquin.) en Afrique de l'Ouest. Cependant, ces dernières années, on a observé un arrêt croissant du taux de multiplication des cals et de la production d'embryons à partir des cals régulièrement induits. L'objectif de cette étude a été d'étudier l'efficacité de la granulométrie du charbon actif sur l'induction des cals chez des vitro plants de palmier à huile (*Elaeis gumeensis* Jacquin.). Les feuilles immatures de palmier à huile ont été désinfectées et mis en culture sur les milieux 164, 166 et 034. A ces milieux de culture, cinq lots de 2000 mg l⁻¹ chacun, de charbon actif (1 = 36f0719, 2 = 54H0545, 3 = 03120, 4 = 20K0244 et 5 = 129H0017) ont été additionnés à l'exception le milieu 034, qui est le contrôle. Les résultats révèlent que le charbon actif référencé 54H0545 a été le plus favorable à la formation des cals quelque soit le milieu de culture auquel il est additionné. De plus, la période d'incubation de 20 semaines a été la plus favorable à l'apparition de cals, par rapport aux périodes d'incubation de 12 et 16 semaines. Enfin, le taux de contamination moyen a été de 24,13 %.

Mots Clés : Cal, *Elaeis gumeensis*, Embryogenèse, 2,4-D

ABSTRACT

In vitro cultural production of tissue culture based seedlings in West Africa is attributed to the growing means of massive production of disease free vegetative planting materials for rapid generation of commercial production of oil palm (*Elaeis gumeensis* Jacquin.) seedlings. In recent years, however, there has been growing cessation in callus multiplication rate and embryo production from regularly induced calluses. The objective of this study was to investigate the efficacy of particle size of activated carbon on the induction of calluses *in vitro* oil palm plants. Immature leaflets of oil palm were disinfected and cultured on media 164, 166 and 034. Treatments included five batches of activated carbon (1 = 36f0719, 2 = 54H0545, 3 = 03120, 4 = 20K0244 and 5 = 129H0017) were added to the media, with the

exception of medium 034, which was the control. Treatments included 2000 mg l⁻¹ activated carbon for each of the 166 and 164 media. Results showed that the activated carbon code 54H0545 was the most favourable for the formation of calluses, regardless of the culture medium to which it was added. In addition, the 20-week incubation period was the most favourable for the appearance of calluses, compared to the weeks 12 and 16 incubation periods. The average contamination rate was 24.13%.

Key Words: Calluse, *Elaeis guineensis*, Embryogenesis, 2,4-D

INTRODUCTION

La production *in vitro* de plants issus de cultures tissulaires est un moyen de plus en plus utilisé pour produire massivement des plants végétatifs exempts de maladies en vue d'une production commerciale rapide de palmiers à huile (*Elaeis guineensis* Jacquin.) en Afrique de l'Ouest. Les stratégies d'amélioration des variétés de palmier à huile sont basées sur des schémas de sélection récurrente réciproque (Meunier et Gascon, 1972). Ces stratégies ont donné des résultats satisfaisants et encourageants en augmentant la variabilité génétique et ont permis d'obtenir des croisements à hauts rendements (Jacquemard *et al.*, 1981; Bhattacharya *et al.*, 2010). Ces schémas de sélection, du fait de la forte hétérozygotie des géniteurs et les contraintes liées aux caractéristiques biologiques du palmier à huile, entraînent une forte hétérogénéité de production chez les descendants issus du matériel amélioré. En effet, certains individus dits d'élites peuvent produire jusqu'à 60 % de plus que la moyenne des arbres de leur croisement (Adjadi, 2012).

Pour augmenter la production du palmier à huile, l'idéal serait d'accroître les plantations homogènes composées uniquement d'individus d'élites, afin d'optimiser les rendements. Pour atteindre cet objectif, il faudra cloner ces individus exceptionnels à grande échelle (Verdeil, 1993). C'est dans cette optique qu'un procédé de multiplication des cultivars, suggère la possibilité de disposer à volonté de matériel juvénile. Malheureusement, il a été observé ces dernières années, une baisse du taux de multiplication des cals et de l'arrêt

de la production d'embryons à partir des cals régulièrement induites (Aholoukpé *et al.*, 2013).

La granulométrie du charbon actif, la dose de 2,4-D et la température ambiante des salles de conservation seraient les facteurs à l'origine de la variation du taux de multiplication des cals et l'arrêt de production d'embryons (Besse, 1992). Le charbon actif, est utilisé en culture *in vitro* comme antioxydant (Aholoukpé *et al.*, 2015). Il est devenu nécessaire de résoudre le problème d'oxydation pendant la phase d'initiation de culture, où une oxydation rapide des méristèmes incubés sur le milieu d'initiation est apparente (Aholoukpé *et al.*, 2015). Plus spécifiquement, le charbon actif est utilisé pour réduire la durée de la phase d'enracinement (Dassou, 2011) ; en plus d'absorber les substances nocives associées aux minéraux entrant dans la composition du milieu de culture (Benderradji *et al.*, 2007).

Dassou (2011) a rapporté que l'ajout du charbon actif au milieu de croissance améliore le développement du système racinaire et de l'organogénèse. On peut donc conclure que le charbon actif joue un rôle important dans la culture. En revanche, il revient de noter que le charbon actif a un effet inhibiteur sur la durée de la phase d'enracinement, dû à l'adsorption des régulateurs de croissance tels que les auxines et cytokinines contenus dans le milieu de culture (Desjardins *et al.*, 1987). Les facteurs suspectés d'être les sources de variation du taux de multiplication des cals et de l'arrêt de la production d'embryons seraient la granulométrie du charbon actif, la dose de 2,4-D et la température ambiante des salles de conservation (Besse, 1992). L'objectif de ce

travail est d'étudier l'efficacité de la granulométrie du charbon actif sur l'induction de cals *in vitro* chez le palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacquin.).

MATERIEL ET METHODES

Matériel végétal. Des folioles immatures ont été prélevées dans les plantations de palmier à huile de la station de recherche de La Mé en Côte d'Ivoire. Il s'agit de palmier provenant des plantations numéro I71, ligne 50, arbre 15 (I71 : 50-15), n° I71, ligne 61, arbre 12 (I7 : 61- 12) et n° H44, ligne 21, arbre 15 (H44 : 21-15). Ces palmiers avaient respectivement 13 et 12 ans et mesuraient environ 10 m pour les peuplements I71 : 50-15 et I7 : 61-12 et 9,5 m pour le peuplement H44 : 21-15. Un numéro de clone a été attribué aux pieds de palmier par ordre d'entrée au laboratoire. L'arbre I71 : 50-15 devient le clone 559 ; I71 : 61-12 ; tandis que le clone 560 et H44 : 21-15 devient le clone 561.

Charbon actif utilisé. Cinq lots de charbon actif provenant du Centre de Coopération International en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD) de Montpellier ont été utilisés pour ces travaux. Il s'agit des lots 36f0719 (Lot 1), 54H0545 (Lot 2), 03120 (Lot 2), 20K0244 (Lot 4) et 129H0017 (Lot 5). La gamme de concentration du charbon actif a été de 2 g l⁻¹ pour les milieux 164 et 166 et absent dans le témoin.

Milieu de culture de base. Trois différents milieux de culture ont été utilisés pour la germination des cals, à savoir les milieux codés 164, 165 et 034. Les milieux de base utilisés, 164 et 165, ont été constitués de sels minéraux et de vitamines de Morel (Murashige et Skoog, 1962), avec l'ajout d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) auxine à une concentration de 75 mg l⁻¹. Le milieu 164 a été enrichi par 55 mg l⁻¹ d'acide 2, 4, 5-Trichlorophénoxypropionique (TCPP) ; tandis que le milieu 165 en est dépourvu. Le milieu

témoin 034 contenait 0,26 mg l⁻¹ de 2,4-D et a été enrichi avec 40000 mg l⁻¹ de glucose. Ces milieux ont été répartis dans 32 tubes à essais chacun et stérilisés à l'autoclave à 113°C pendant 20 minutes.

Prélèvement des jeunes feuilles. Les feuilles immatures situées au cœur des clones ont été soigneusement coupées et placées dans des tubes en plastique. Le prélèvement a été effectué le matin et les feuilles coupées ont été désinfectées contre les insectes ravageurs en utilisant 50g l⁻¹ de Lambda-Cyhalothrine. Ensuite, des mesures de la feuille adulte la plus proche des feuilles immatures (feuille n° 1) ont été effectuées. Les mesures comprennent la longueur du pétiole et du limbe, la largeur et le nombre de folioles, et l'épaisseur du rachis. Les feuilles échantillonnées ont été livrées au laboratoire dans un tube en plastique.

Mise en culture. Après avoir effectué les mesures sur les folioles comme décrit ci-dessus, les nervures principales ont été extraites en utilisant le protocole décrit par Pannetier *et al.* (1981). Ensuite, les folioles ont été découpées tout en conservant la seconde nervure par intervalle de 1 cm. Un total de 12 niveaux (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 et 12) de tronçons a été découpé. Pour les essais, les niveaux 6 et 7 ont été utilisés comme explants à cause de la faible contamination de ces tronçons (Pannetier *et al.*, 1981). Les morceaux de feuilles découpées sur les clones ont été désinfectés dans l'hypochlorite de sodium à 45 % pendant 10 minutes ; suivis de leur rinçage dans de l'eau distillée, stérile et glucosée pendant 10 minutes. Les folioles ont été détachées une à une pour constituer les clones ; et chaque clone a été cultivé dans un milieu séparé. Dans chacun des milieux de cultures, 164 et 165, ont été additionnés 2 g de chaque lot de charbon actif, constituant les différents traitements. Le milieu 034 sans charbon actif a servi de milieu témoin. Les détails concernant les traitements sont présentés dans le Tableau 1. Pour chaque test

TABLEAU 1. Milieux utilisés pour l'induction des cals à partir de trois clones de palmier à huile en culture *in vitro* en Côte d'Ivoire

Lot charbon actif	Lot 1 (2g)	Lot 2 (2g)	Lot 3 (2g)	Lot 4 (2g)	Lot 5 (2g)	Témoinsans charbon actif
Milieu	164	164	164	164	164	034
Clone	559,560,561	559,560,561	559,560,561	559,560,561	559,560,561	559,560,561

ou traitement, 147 tubes à essai, répartis dans trois casiers, ont été utilisés. Chaque test a été considéré en double. Les traitements ont été réalisés selon le schéma expérimental en blocs de Fischer et la conception expérimentale randomisé. Ce système a été réalisé à l'aide d'une expérience de type factoriel dans laquelle chaque niveau ou variante a été étudié seul (effets principaux) ou en interaction avec un autre (effets d'interaction). Les cultures ont été conservées dans une salle sombre à 27 °C pendant les périodes de traitement respectives (12, 16 et 20 semaines). Les paramètres ont été déterminés à ces périodes à partir de l'apparition de cals et de racines nouvellement induits. Les niveaux de contamination et de prolifération des racines ont également été déterminés après observation.

Analyse statistique. Le modèle d'analyse de la variance a été utilisé, le modèle statistique étant le croisement aléatoire à quatre critères de classification. Les données ont été soumises aux tests non paramétriques de KOLMOGOROV-SMIRNOV et de normalité ainsi qu'à un ajustement. Les moyennes de traitement significatives ont été séparées à l'aide du Chi carré au niveau de signification de 5 %.

RESULTATS

Multiplication des cals après 12 semaines d'incubation. Le Tableau 2 présente les résultats des taux de multiplication de cals après 12 semaines de traitement. Les résultats ont révélé qu'aucun cal n'a été observé sur les milieux 166 et 164 du CA 1, 166 du CA 4 et 166 et 164 du CA 5. Cependant, un seul tube en cal a été observé sur les 48 tubes mis en culture sur CA 2, CA 3, le milieu 164 du CA 4 et le témoin. Le plus grand pourcentage de callogénèse soit 3,70 % a été obtenu avec un écart de variance de 5,23 %, sur le milieu 166 du lot 2 du charbon actif. Dans l'ensemble, le plus grand taux d'induction de cals soit 2,77 % a été observé sur le lot 3 de charbon actif avec les milieux 166 et 164.

TABLEAU 2. Taux moyens de cals par traitement après 12 semaines.

Charbon actif (CA)	CA 1		CA 2		CA 3		CA 4		CA 5		Témoïn
	166	164	166	164	166	164	166	164	166	164	
Milieu	166	164	166	164	166	164	166	164	166	164	034
Effectif de tubes à T0	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	96
Nombre de tubes contaminés	12	8	20	9	9	15	10	12	12	12	4
Nombre de tubes non contaminés	36	40	28	39	39	33	38	36	36	36	92
Nombre de tubes en cals	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1
Pourcentage en cal	0	0	3,7	0	2,5	3,33	0	3,33	0	0	2,08
Ecart de variation (%)	0	0	5,23	0	3,62	4,71	0	3,62	0	0	2,94

CA = charbon actif

Prolifération des cals après 16 semaines d'incubation. Après 16 semaines de traitement, les plus grands nombres de tubes en cals soit 2 / 48 tubes ont été obtenus respectivement ; sur le lot 1 de charbon actif, le milieu 164 du lot 4 de charbon actif et le témoin (Tableau 3). Le taux le plus élevé de cal induit (6,64 %) a été observé avec un écart de variance de 5 %, sur le milieu 166 du lot 1 de charbon actif. Egalement, le lot 1 de charbon actif a présenté le taux le plus élevé de cals induit avec une valeur de 5,50 %. Le taux le plus faible d'induction de cals, soit 1,42 %, a été observé sur le lot 5 de charbon actif. Dans l'ensemble, le milieu 164 présente le taux le plus élevé de multiplication de cals dans chaque lot de charbon actif, excepté le lot 1.

Prolifération des cals après 20 semaines d'incubation. Après 20 semaines d'administration des traitements (Tableau 4), le plus grand nombre de tubes de cals, soit 28/96, a été obtenu sur le milieu témoin (milieu 164 du lot 2 de charbon actif). Ce taux a été estimé à 31,1 %, avec un écart de variance de 15,8 %. Dans l'ensemble, le taux le plus élevé de cals induits (35,04 %) et le plus faible (14,39 %) ont été observés, respectivement, sur le lot 2 et le lot 5 de charbon actif.

Facteurs d'induction des cals. Le facteur clones, charbon actif et milieu de culture de base n'ont pas été significatifs ($P > 0,05$) sur l'induction de cals (Tableau 5). De même, l'interaction du charbon actif avec les milieux de culture n'a pas modifié la réponse ($P > 0,05$) des clones à l'induction de cals. En outre, l'interaction entre le milieu de culture et les périodes d'apparition des cals n'a pas montré de différence significative dans la réponse des clones à induire des cals. Enfin, l'interaction des clones, du charbon actif et des périodes d'apparition des cals n'a pas non plus montré de différence significative ($\chi^2 = 1,05$; $P = 0,5008$) dans la réponse des explants à induire des cals. En revanche, les réponses obtenues en fonction des périodes d'apparition des cals présentent des valeurs très significatives

TABLEAU 3. Différences entre les traitements après 16 semaines

Charbon actif (CA)	— CA 1 —	— CA 2 —	— CA 3 —	— CA 4 —	— CA 5 —	Témoin					
Milieu	166	164	166	164	166	164	166	164	166	164	34
Nombre de tubes à T0	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	96
Nombre de tubes contaminés	14	10	24	9	10	16	11	12	14	12	7
Nombre de tubes non contaminés	34	38	24	39	38	32	37	36	34	36	89
Nombre de tubes en cals	2	2	1	1	1	1	0	2	0	1	2
Pourcentage en cal	6,64	4,76	5,0	6,06	2,56	3,33	0	6,11	0	2,77	2,08
Ecart de variation (%)	5	7	8	8,5	3,62	4,71	0	4,37	0	3,92	2,94

CA = charbon actif

TABLEAU 4. Différences entre les traitements après 20 semaines

Charbon actif (CA)	— CA 1 —	— CA 2 —	— CA 3 —	— CA 4 —	— CA 5 —	Témoin					
Milieu	166	164	166	164	166	164	166	164	166	164	34
Nombre de tubes à T0	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	96
Nombre de tubes Contaminés	14	11	24	9	10	16	11	12	14	12	7
Nombre de tubes non contaminés	34	37	24	39	38	32	37	36	34	36	89
Nombre de tubes en cals	8	8	5	14	6	8	9	6	5	7	28
Pourcentage en cal	25,4	21,21	25%	35,04	17,2	25,5	22,7	16,97	14,39	18,78	31,1
Ecart de variation (%)	12,8	0,91	20,41	7,71	14,9	10,0	9,6	2,34	10,05	14,96	15,8

CA = charbon actif

TABLEAU 5. Résultat de l'analyse de variances effectuée sur la variable cal

Source	Degré de liberté	Type III SS	Coefficient estimé	χ^2	P-value
Clone	2	0,02418183	0,01209092	1,86	0,1976
Charbon actif	4	0,03855648	0,00963912	1,48	0,2677
Milieu de culture	1	0,00351666	0,00351666	0,54	0,4759
Période d'observation	2	0,52588470	0,26294235	40,49	<0,0001
Clone*Charbon actif	8	0,09379003	0,01172375	1,81	0,1718
Clone*Milieu de culture	2	0,04695175	0,02347588	3,61	0,0591
Clone*Période d'observation	6	0,06620840	0,01103473	1,70	0,2045
Charbon actif *Milieu de culture	4	0,00764129	0,00191032	0,29	0,8762
Milieu de culture*Période d'observation	2	0,00226883	0,00113441	0,17	0,8418
Clone*Charbon actif *Milieu de culture *Période d'observation	60	0,40736520	0,00678942	1,05	0,5008

(Tableau 5), avec la période de 20 semaines ayant le taux de multiplication des cals le plus élevé et la période de 12 semaines ayant le taux de multiplication des cals le plus faible.

Facteurs d'induction de la racine. Les résultats des variables racinaires ont révélé que les facteurs clones et charbon actif ont des effets très significatifs ($P < 0,0001$) sur le taux induction racinaire (Tableau 6). Cependant, les milieux de culture ($P = 0,0105$) et les périodes d'incubation ($P = 0,0191$) ont donné des réponses faiblement significatives sur le taux des racines induites. Les effets combinés respectifs du clone avec le charbon actif ($P = 0,0003$), du charbon actif avec le milieu de culture ($P = 0,001$) et du clone avec milieu de culture ($P = 0,001$) ont eu un impact significatif sur le taux des racines induites. Enfin, la combinaison des quatre facteurs à savoir clone, charbon actif, milieu de culture et période d'incubation a également montré un effet significatif ($P < 0,05$) sur le taux des racines induites.

Taux de contamination. Le taux moyen de contamination observé est de 24,13 % (Tableau 7), tandis que, le maximum a été de 46,87 % et le plus faible de 7,29 % (Tableau 7). Le plus grand taux de contamination a été observé avec le clone 560, sur le milieu charbon actif lot 1. Cependant, aucune contamination n'a été observée avec le clone 561 sur le milieu témoin. D'une manière générale, c'est le milieu 034 qui présente le plus faible taux de contamination (7,29 %). Après 12, 16 et 20 semaines d'incubation, le plus grand nombre de tube contaminé a été observé sur le milieu 166 du lot 2 du charbon actif.

DISCUSSION

Période d'incubation des cals. La période d'incubation de 20 semaines de traitement a induit un grand nombre de tube en cals (Tableau 4) qui diffère fortement des périodes de 12 et 16 semaines. Ainsi, la période de 20 semaines pourrait être recommandée pour la

TABLEAU 6. Résultats de l'analyse de variance effectuée sur la variable racine

Source	Degré de liberté	Type III SS	Coefficient estimé	χ^2	P-value
Clone	2	0,13222921	0,06611460	61,22	<0,0001
Charbon actif	4	0,12047863	0,03011966	27,89	<0,0001
Milieu de culture	1	0,00990952	0,00990952	9,18	0,0105
Période d'observation	2	0,01210622	0,00605311	5,61	0,0191
Clone*Charbon actif	8	0,08323330	0,01040416	9,63	0,0003
Clone*Milieu de culture	2	0,01233089	0,00616544	5,71	0,0181
Clone*Période d'observation	6	0,01191785	0,00198631	1,84	0,1737
Charbon actif *Milieu de culture	4	0,04148276	0,01037069	9,60	0,0010
Milieu de culture*Période d'observation	2	0,00167043	0,00083521	0,77	0,4831
Clone*Charbon actif*Milieu de culture*Période d'observation	60	0,18696902	0,00311615	2,89	0,0237

TABLEAU 7. Taux de contamination des explants en fonction des lots de charbon actif et des clones étudiés

Effectif initial clone	Lots de charbon actif					Témoin 0 CA	Total
	CA1	CA2	CA3	CA4	CA5		
	32	32	32	32	32	32	192
559	12,5 % (4/32)	31,25 % (10/32)	21,87 % (7/32)	9,37 % (3/32)	18,75 % (6/32)	15,62 % (5/32)	18,22 % (35/192)
560	46,87 % (15/32)	37,5 % (12/32)	34,37 % (11/32)	37,5 % (12/32)	31,25 % (10/32)	6,25 % (2/32)	32,29 % (62/192)
561	15,62 % (5/32)	34,37 % (11/32)	25 % (8/32)	25 % (8/32)	31,25 % (10/32)	0 % (0/32)	21,87 % (42/192)
Total	25 % (24/96)	34,37 % (33/96)	27,08 % (26/96)	23,95 % (23/96)	27,08 % (26/96)	7,29 % (7/96)	24,13 % (139/192)

CA = charbon actif

multiplication rapide des cals de palmier à huile en Côte d'Ivoire, avec un raffinement supplémentaire du processus. Cependant, la période minimale de traitement nécessaire pour induire des cals à la suite d'une culture *in vitro*, de palmier à huile, semble être de 16 semaines. (Duval *et al.*, 1988). Des études antérieures ont également révélé qu'à 20 semaines d'incubation, les taux de cals obtenus augmentent brusquement et atteignent parfois 50 % dans certains traitements (Aberlenc-Bertossi *et al.*, 2006). Cela implique que le pic d'induction des cals chez le palmier à huile est variable, bien que les facteurs à l'origine de cette variation doivent faire l'objet d'une étude plus approfondie.

Facteur induction des cals. L'interaction du charbon actif avec les milieux de culture a modifié la réponse de certains clones à induire des cals (Tableau 5). Cette perturbation pourrait s'expliquer par la quantité de 2,4-D libre dans le milieu de culture. Le 2,4-D est une substance qui adsorbe les régulateurs stimulant l'organogénèse (auxines et cytokinines) du milieu de culture (Weathered *et al.*, 1978). En effet, selon Besse (1992), après 21 jours de la confection du milieu de culture la quantité du 2,4-D libre est 0,48 mg l⁻¹. L'équilibre 2,4-D libre et 2,4-D fixé est atteint 2 à 3 semaines après la confection du milieu ; et les cals à croissance normale se développent normalement pour certains clones à 0,48 mg l⁻¹ de 2,4-D libre ; tandis que pour d'autres clones, elle est atteinte à des doses encore plus faible de 2,4-D libre (Besse, 1992). Cela montre l'existence d'une cinétique d'adsorption du 2,4-D par le charbon actif du milieu en culture *in vitro* du palmier à huile. Selon Djillali (2008), l'obtention d'une meilleur callogenèse en réduisant la concentration d'auxine à 50 % serait possible. En effet, Djillali, (2008) a comparé chez des cultivars de palmier dattier, trois milieux contenant 100, 50 et 10 mg l⁻¹ de 2,4-D associés à 3 mg l⁻¹ de 2iP, et observe une callogenèse de 80,95 % avec 50 mg l⁻¹ de 2,4-D, contre 54,54 et 41,17 %, respectivement ; sur les milieux 100 et 10 mg

l⁻¹ de 2,4-D. Egalement, la granulométrie du charbon actif pourrait expliquer l'induction des cals. En outre, le charbon actif réduit la teneur en protéine et l'activité des peroxydases des tissus, des enzymes qui jouent un rôle important dans la différenciation et la rigidification des cellules (Lozzi *et al.*, 2015). Malheureusement, cette étude n'a pu déterminer les concentrations en protéine et en hormone de 2,4-D, pour s'assurer que les deux soient suffisantes pour déclencher la callogenèse. Enfin, la perturbation de la callogenèse observée avec les clones 166 des milieux CA 2 et CA 5 pourrait être due à une carence en auxine exogène, provoquant l'entrée en dégénérescence des cals (arrêt de croissance et mort des tissus); et la diminution globale de la teneur en hormones indispensables à la production d'embryons (Durand-Gasselin *et al.*, 2010). On peut conclure que le charbon actif joue un rôle important dans la culture *in vitro* du palmier à huile. Il permet le déroulement normal de toutes les étapes de la callogenèse grâce à l'adsorption des substances inhibitrices et toxiques.

Facteur d'induction de la racine. L'observation de l'induction des racines sur plusieurs cals des clones 559, 560 et 561 après 12 semaines de culture (Tableau 6), montrent que l'émergence spontanée de la racine apparaît précocement au cours de la période de croissance. En effet, dans la chronologie de la germination *in vitro* des embryons de palmier à l'huile, il a été observé que la racine naît toujours après l'apparition d'une première feuille en dehors du cotylédon (Dassou, 2011). D'autre part, l'apex caulinaire des cals, qui fournissent les racines, pourrait inhiber par le développement de la racine. une formation précoce de la racine entraînant une embryogénèse incomplète, a été noté pour des embryons somatiques de palmier à l'huile provenant du procédé standard et cultivés à une température supra-optimal (35°C au lieu de 27°C) (Durand-Gasselin *et al.*, 2010).

Taux de contamination. Le taux de contaminations élevés observés, malgré la

désinfection efficace et les précautions prises pour ces travaux, pourrait être attribué aux équipements du laboratoire qui serait mal entretenu. Les taux de contamination observés ont été exceptionnellement élevés toute juste deux (2) semaine après la mise en culture, ce qui implique que les contaminations *in vitro* de tissus de cultures de palmier à huile apparaissent à n'importe quelle phase de cette culture, phase d'initiation, d'élongation ou d'enracinement (Pannetier *et al.*, 1994). Les facteurs principaux étudiés, la granulométrie du charbon actif et dose de 2,4-D, ne permettent pas d'expliquer la source de contamination observée.

CONCLUSION

La multiplication du palmier à huile par embryogenèse somatique est de plus en plus importante pour l'extension et le repeuplement des palmeraies, la conservation des ressources génétiques et pour l'amélioration de l'espèce surtout en ce qui concerne la résistance aux anomalies. L'utilisation d'équilibre hormonale 2,4-D en association avec des doses de charbon actif, est important pour avoir une précision de l'action des hormones sur l'induction de cals. Aussi, la composition hormonale des milieux de culture est étroitement liée par son action sur les explants. Ainsi donc, la combinaison clone 561, le lot 2 de charbon actif et le milieu 164 donne de bons résultats pour la callogenèse. Cependant les variations étant si importantes, ces résultats doivent être pris avec beaucoup de précautions. De plus, le charbon actif n'influence pas la callogenèse et n'est pas la cause directe de la chute du taux de multiplication des cals observé en Côte d'Ivoire et, donc, de la formation des embryons. La chute du taux de multiplication des cals pourrait être due à une désorganisation de la zone pseudo cambiale par la qualité du 2,4-D. Les taux de contamination des vitroplants obtenus pourraient s'expliquer par des problèmes propres à la technique. La production de

millions de *vitro-plants* nécessite l'adaptation de la technique de laboratoire aux contingences d'une unité industrielle.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient la direction du Centre National de Recherche Agronomique (CNRA) de La Mé et plus particulièrement le Directeur Général pour avoir mis à disposition des installations de recherche pour cette étude. M. KONAN Kouakou Eugène, responsable du programme palmier à huile, a mis à disposition la salle et le matériel de culture *in vitro* pour cette étude.

RÉFÉRENCES

- Aberlenc-Bertossi, F., Sané, D., Daher, A., Borgel, A. et Duval, Y. 2006. Aptitude à la déshydratation de l'embryon zygotique de palmier à huile et de palmier dattier : étude de l'expression de gènes LEA. *Les actes du BRG* 6:401-413.
- Adjadi, E. 2012. Le développement du palmier à huile sélectionné au Bénin. Rapport d'étude. Actualisation des superficies plantées. Centre de Recherches Agricoles Plantes Pérennes (CRA-PP), Bénin, station de Pobè. 50pp.
- Aholoukpé, H.N.S., Vissoh, V.P., Amadji, G., Deleporte, P., Dubos, B., Nodichao, L., Kakai, G.R., Chotte, J.L. et Blavé, D. 2013. Typologie des plantations villageoises de palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) dans le département du plateau au Bénin. *International Journal of Biologie and Chemical Sciences* 7(3):978-999.
- Aholoukpè, H.N.S., Amadji, G.L., Blavet, D., Chotte, J.L., Deleporte, P., Dubos, B., Flori, A. et Jourdan, C. 2015. Effet de la gestion des feuilles d'élague du palmier à huile sur le stock de carbone et les propriétés physico-chimiques du sol dans les palmeraies villageoises du Bénin. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 20(2):171-182.

- Benderradji, L., Bouzerzour, H., Ykhlef, N., Djikoun, A. et Kellou K. 2007. Réponse à la culture *in vitro* de trois variétés de l'Olivier (*Olea europaea* L.). *Sciences & Technologie* 26:27-32.
- Besse, I. 1992. Recherche du déterminisme hormonal de l'anomalie de la morphogenèse florale liée à l'embryogenèse somatique chez le palmier à huile (*Elaeis guineensis jacquins*). Thèse de Doctorat, Université Pierre et Marie curie, Paris VI, France, 104pp.
- Bhattacharya, S., Bandopadhyay, T.K. et Ghosh, P.D. 2010. Somatic embryogenesis in *Cymbopogon pendulus* and evaluation of clonal fidelity of regenerants using ISSR marker. *Scientia Horticulturae* 123:505-513.
- Carre, M., Martin, T.J., Mussillon, P. et Martinic. 1979. La culture de meristèmes et la multiplication végétative "in vitro" au service de la pépinière. Publ. INRA, ANPPF, INVUFLEC. *Bull Petits Fruits* 14 : 8-65.
- Dassou, O.S. 2011. Impact du choix de la méthode d'échantillonnage racinaire dans la détermination des paramètres de développement racinaire chez le palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) au Bénin. Mémoire d'ingénieur agronome : Université d'Abomey-Calavi, Bénin. 52pp.
- Desjardins, Y., Gosselin, A. et Yelle, S. 1987. Acclimatization of ex vitro strawberry plantlets in CO₂-enriched environments and supplementary lighting. *Journal of the American Society for Horticulture Science* 112(5):846-851.
- Djillali, Z. 2008. Régénération par embryogenèse somatique de vitroplants de palmier dattier (cultivars Deglet Nour et Akerbouch) en vue de la résistance contre le bayoud. Thèse de Doctorat, Institut National d'agronomie EL Harrach, Algé, Algérie. 97pp.
- Durand-Gasselin, T., Le Guen, V., Konan, K. et Duval, Y. 2010. Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) plantations in Côte d'Ivoire obtained through *in vitro* culture. First results. *Oléagineux* 45: 1-11.
- Jacquemard, J.C., Meunier, J. et Bonnot, F. 1981. Etude génétique de la reproduction d'un croisement chez le palmier à huile (*Elaeis guineensis*) Application à la production de semences sélectionnées et à l'amélioration. *Oléagineux* 36:343-349.
- Konan, K.E. Durand- Gasselin T., Duval Y., Jacquemard, J. C.H., Kouamé, B., Rival, A. et Noiret, J.M. 1996. La multiplication végétative du palmier à huile (*Elaeis guineensis jacquins*) par embryogenèse somatique en Côte d'Ivoire, Programme et résultats de quinze années de recherche. Palmoil Congress, 23-28 Septembre 1996, Kuala Lumpur, Malaysia.
- Lozzi, A., Abousalim, A. et Abdelwahd, R. 2015. Effet du 2,4-D sur l'induction de l'embryogenèse somatique à partir de cotylédons matures de caroubier (*Ceratonia siliqua* L.). *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaire* 3:24-29.
- Meunier, J. et Gascon, J.P. 1972. Le schéma général d'amélioration du palmier à huile à l'IRHO. *Oléagineux* 27:1-12.
- Murashige, T. et Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiological Plants* 15:473-497.
- Pannetier, C., Arthuis, P. et Liévoux, D. 1994. Néof ormation de jeunes plantes d'*Elaeis guineensis* à partir de cals primaires obtenus sur fragments foliaires cultivés *in vitro*. *Oléagineux* 36:119-22.
- Verdeil, J.L. 1993. Etude de la regeneration du cocotier (*Cocos nucifera*) par embryogenèse somatique à partir d'explants inflorescentiels. Thèse de Doctorat de l'Université Pierre et Marie curie (Paris VI), France. 156pp.
- Weathered, M., Burdow, J. et Henshaw, I. 1978. Some effects of activated charcoal as an additive to plant tissue culture media. *Z. pflanzenphysiol* 89:141-147.