

COMMUNAUTÉ FRANÇAISE DE BELGIQUE  
ACADÉMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE  
UNIVERSITÉ DE LIÈGE - GEMBLoux AGRO-BIO TECH

**Mise au point d'un protocole de multiplication *in vitro* de  
*Jatropha curcas* L. en vue d'une application  
à grande échelle**

**Samson Daudet MEDZA MVE**

Dissertation originale présentée en vue de l'obtention du grade de  
Docteur en Sciences Agronomiques et Ingénierie Biologique

**Promoteur : André TOUSSAINT**

**2013**

© Samson Daudet MEDZA MVE, 2013

**Copyright.** Aux termes de la loi belge du 30 juin 1994, sur le droit d'auteur et les droits voisins, seul l'auteur a le droit de reproduire partiellement ou complètement cet ouvrage de quelque façon et forme que ce soit ou d'en autoriser la reproduction partielle ou complète de quelque manière et sous quelque forme que ce soit. Toute photocopie ou reproduction sous autre forme est donc faite en violation de la dite loi et de des modifications ultérieures.

## Résumé

**MEDZA MVE Samson Daudet (2013).** Mise au point d'un protocole de multiplication *in vitro* de *Jatropha curcas* L. en vue d'une application à grande échelle. **Thèse de Doctorat. Belgique : Université de Liège, Gembloux Agro-Bio Tech, 99 p., 16 fig., 6 tab.**

*Jatropha curcas* L. est une plante sauvage, source potentielle de biodiesel grâce à son huile qui n'entre pas en compétition avec les huiles alimentaires. De ce fait, une méthode de régénération *in vitro* est établie pour une application à la production massale de clones élites. Des explants nodaux de *J. curcas* sont prélevés sur de jeunes plantes de deux accessions originaires du Cameroun et du Sénégal. Les cultures sont initiées sur le milieu de Murashige et Skoog (1962) (MS) supplémenté de 8,87  $\mu\text{M}$  de BA (Benzyladénine), 4,92  $\mu\text{M}$  d'AIB (Acide-3-indole butyrique), 30 g/l de saccharose et 0,7% d'agar, avec un pH de  $5,7 \pm 0,1$ . Les pousses sont ensuite transférées sur des milieux de bourgeonnement axillaire constitués du milieu MS complétés de 2,21 à 8,9  $\mu\text{M}$  de BA ou de 2,21 à 8,9  $\mu\text{M}$  de kinétine en combinaison avec 2,46  $\mu\text{M}$  d'AIB, 12,2  $\text{mg.l}^{-1}$  de sulfate d'adénine et 25  $\text{mg.l}^{-1}$  de glutamine. Les meilleurs taux de multiplication sont obtenus sur MS additionné de 6,65  $\mu\text{M}$  de BA et 2,46  $\mu\text{M}$  d'AIB avec une moyenne de 8,1 pousses/explant établie sur les 7 premières subcultures. Les pousses feuillées sont enracinées sur un milieu  $\frac{1}{2}$  macroéléments, plus les microéléments MS additionné de 5,7  $\mu\text{M}$  d'AIB, puis acclimatées avec un taux de survie de 97%.

Pour accroître les performances de multiplication et réduire les coûts de production, un système de multiplication impliquant la formation d'agrégats de bourgeons a été établi. Ceux-ci sont induits à partir d'explants nodaux cultivés sur le milieu MS additionné de 25  $\text{mg.l}^{-1}$  d'acide citrique, 12,2  $\text{mg.l}^{-1}$  de sulfate d'adénine, 15  $\text{mg.l}^{-1}$  de L-arginine et 2,46  $\mu\text{M}$  d'AIB, en combinant différentes concentrations de BA et de glutamine. Les coupes histologiques réalisées montrent que des bourgeons adventifs sont régénérés en même temps que se développent les bourgeons axillaires. Le milieu MS contenant 6,65  $\mu\text{M}$  de BA, 2,46  $\mu\text{M}$  d'AIB, 25  $\text{mg.l}^{-1}$  de glutamine, 30 g  $\text{l}^{-1}$  de saccharose, additionné de 25  $\text{mg.l}^{-1}$  d'acide citrique, 12,2  $\text{mg.l}^{-1}$  de sulfate d'adénine et 15  $\text{mg.l}^{-1}$  de L-arginine, donne les meilleurs résultats avec un taux de multiplication moyen de 13,1 pousses/explant/subculture toutes les trois semaines. Les bourgeons sont allongés et les pousses feuillées enracinées sur milieu MS contenant 2,46  $\mu\text{M}$  d'AIB et 2% saccharose. Le processus complet de la mise en culture de l'explant initial à l'obtention de plantules nécessite 14 semaines pour un taux de survie de 98% en acclimatation. Ce qui rend ce protocole performant avec des possibilités d'application à grande échelle.

**Mots clés :** *Jatropha curcas* L. - culture *in vitro* - taux de multiplication - induction - agrégat de bourgeons - explant nodal.



**Abstract**

**MEDZA MVE Samson Daudet (2013).** Development of protocol for *in vitro* propagation of *in vitro* de *Jatropha curcas* L. for a large-scale application. **Philosophiae Doctor (PhD) Thesis. Belgium: Liège University, Gembloux Agro-Bio Tech, 99 p., 16 fig., 7 tab.**

*Jatropha curcas* L. is a wild plant, that emerged as a source of energy for biodiesel production. It has acquired significant economic potential as it does not compete with the edible oil supplies. Realizing its importance, *in vitro* multiplication methods have been established to meet the demand of large scale supply of superior clones. In order to improve the *in vitro* multiplication rate (number of shoots/explant/subculture/three weeks) of *J. curcas*, axillary nodes taken from young plants of two accessions (originating from Cameroon and Senegal) have been cultivated for three weeks on a Murashige and Skoog (1962) medium (MS) supplemented with 8.87  $\mu\text{M}$  BAP, 4.92  $\mu\text{M}$  IBA, and 30 g/l sucrose at pH  $5.7 \pm 0.1$ , and solidified with 0.7% agar. The shoots obtained from each original explant were then transferred to a multiplication media consisting of MS medium supplemented with 2.21 to 8.9  $\mu\text{M}$  BA or 2.21 to 8.9  $\mu\text{M}$  kinetin in combination with 2.46  $\mu\text{M}$  IBA. Each combination was completed with 12.2  $\text{mg.l}^{-1}$  adenine sulfate and 25  $\text{mg.l}^{-1}$  of glutamine. The best multiplication rate was obtained for the PM medium containing 6.65  $\mu\text{M}$  BA and 2.46  $\mu\text{M}$  IBA. The mean multiplication rate is 8.1 shoots per explant during the 7 following subcultures. Leafy shoots obtained have been rooted in a medium containing half of the major mineral and minor mineral components of MS supplemented with 5.7  $\mu\text{M}$  IBA, then acclimated with a survival rate of 97%.

With the aim of finding a more efficient production protocol practicable on a large-scale, an alternative method has been developed to regenerate whole plants of *J. curcas* from nodes via the induction of buds aggregates. Histological observation shows that bud aggregates are simultaneously formed through axillary budding and adventitious regeneration of buds. These buds are elongated in MS medium supplemented with 2.21  $\mu\text{M}$  BA, 5.70  $\mu\text{M}$  IAA (indole-3-acetic acid) and 15  $\text{mg.l}^{-1}$  L-arginine. The leafy stems are then rooted on MS containing 2.46  $\mu\text{M}$  IBA, 2% sucrose, and 0.7% agar. The entire process takes 14 weeks with 98% plants survival after acclimatization. We obtain a multiplication rate of 13 buds per explant per subculture. This protocol is more efficient than previously known protocols.

**Keywords:** *Jatropha curcas* L. - *in vitro* culture - multiplication rate – induction - bud aggregates - nodal explant



« A la mémoire de ma mère **Joséphine ASSOUMOU EBOTO** et de mon père **Antoine MVE OBAME** disparus trop tôt. Les efforts et sacrifices consentis pour l'élaboration de ce travail ont été stimulés par une pensée empreinte de gratitude à l'endroit de ceux qui n'ont reculé devant aucun obstacle pour assurer l'épanouissement et l'édification de ma personne.

Merci, qu'ils en soient remerciés par cette modeste dédicace »





---

**Avant-propos**

---

Cette passionnante partie de ma vie que fut mes études de Doctorat est arrivée à son terme. Tant de labeur jalonné de moments de joie, de bonheur, de passions, entrecoupées parfois de tristesse et de découragement. En accomplissant ce devoir, je souhaite de tout mon cœur que ce document contribue à un avenir meilleur et puisse participer à l'amélioration des conditions de vie des populations sur cette terre en souffrance.

Cette thèse est présentée sous forme d'une thèse à articles. Elle est constituée de cinq sections. Une introduction générale présentant le contexte général de la recherche et la problématique justifiant la thématique. Elle est suivie de trois parties qui présentent les résultats des différentes investigations réalisées de manière à cerner la problématique. La dernière partie présente une conclusion générale et des perspectives.

Je tiens à remercier le Ministère de l'Education Nationale de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, le Ministère des Finances et des Comptes Publics, l'Université des Sciences et Techniques de Masuku, l'Institut National Supérieur d'Agronomie et de Biotechnologies et le Programme d'Appui Institutionnel au Développement des Ressources Humaines de la République Gabonaise pour le financement de ces travaux.

Je remercie le Royaume de Belgique, l'Université de Liège et, en particulier, Gembloux Agro-Bio Tech qui a accepté mon inscription en thèse. Cette dernière institution a mis à ma disposition tous les moyens nécessaires pour la réalisation de mes travaux de recherche.

Je remercie tout particulièrement le Pr André Toussaint, promoteur de mon travail. Merci de votre disponibilité, vos orientations, critiques et suggestions. Merci de votre soutien qui n'a jamais failli et toutes les facilités que vous m'avez offertes pour l'accomplissement de ce travail. Travailler avec vous a été toute une école dans laquelle l'apprentissage a été enrichissant.

J'exprime ma gratitude au Pr Guy Mergeai grâce à qui j'ai intégré le projet *Jatropha* dans le cadre de la réalisation de ma thèse et qui a accepté d'être rapporteur interne de cette thèse. Merci pour tous vos conseils, orientations et encouragements.

Ma gratitude au Pr Jean-Pierre Baudoin, chef de l'Unité de Phytotechnie Tropicale et Horticulture, pour avoir accepté de m'accueillir au sein de son unité.

Mes remerciements vont aussi au Dr Philippe Druart du Centre Wallon de Recherche Agronomique (CRA-W) pour ses conseils avisés qui ont considérablement amélioré la qualité et la pertinence de ce travail, ainsi qu'au Dr Pascal Geerts (CRA-W), rapporteur extérieur de cette thèse.

Je remercie aussi le Pr Jean-Louis Doucet d'avoir accepté d'être membre de mon jury. Merci pour toutes les occasions que vous m'avez données de présenter l'état d'avancement de mes travaux dans le cadre de votre cours.

J'exprime ma gratitude à Didier Leurquin, technicien au laboratoire de Phytotechnie Tropicale et Horticulture, pour sa contribution dans la réalisation de mon travail. Merci à Luc Bolyn pour son concours dans l'entretien des plantes.

Mes remerciements à tout le personnel de l'unité, plus particulièrement à Valérie Jaumin et Marie Malice.

Toute ma gratitude au Dr Isaac Mouaragadja, recteur de l'Université des Sciences et Techniques de Masuku (USTM)

Merci au Pr Bertrand Mbatchi pour tous ses encouragements et conseils durant ma thèse.

Je remercie certaines personnalités notamment le Pr Benoît Boukila vice-recteur de l'USTM, le Pr Alain Souza Directeur Général de l'Institut National Supérieur d'Agronomie et de Biotechnologies (INSAB), le Dr Paul Ondo Ovono secrétaire général de l'INSAB, le Pr Crépin Ella Missang et le Dr Patrick Mickala.

Merci aussi M. Guy Roger Kambogo, Pierre Marie Mboula et l'ensemble du personnel du PAI-DRH de la République Gabonaise qui se sont investis pour nous assurer les meilleures conditions de vie et de travail.

Merci à Mariette Verbrugghe, Hélène Cawoy et Pierre Dumortier pour tous leurs conseils.

Merci enfin à ma famille pour tout le soutien dont j'ai bénéficié pour ne citer que, Josie Assoumou Medza, Wammi Rick Mve Medza, Gloire Samivia Aduane Medza, Damia Léa Medza Mve, Thomas Medza Mve, Obame Séraphin, Dr Touré Abdourhamane Ibrahim, Julie Oye, Nkoa Germain, Judith Nyabindo'o, Jean Paul Endameyo, Laurence Ntore, Ella Ngwa Patrice.

Hayet malgré toutes les difficultés que nous avons vécues, tu m'as toujours encouragé à aller de l'avant, merci.

A toi mon amour Juju, pour ton soutien et tout le bonheur que tu as apporté dans ma vie.



---

**Publications réalisées dans le cadre de la thèse**

---

CHAPITRE 1 : Culture *in vitro* de *Jatropha curcas* L.

Samson Daudet Medza Mve, Guy Mergeai, Jean-Pierre Baudoin et André Toussaint

Publié dans *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2011, **15**(4), 567-574

CHAPITRE 2 : Amélioration du taux de multiplication *in vitro* de *Jatropha curcas* L.

Samson Daudet Medza Mve, Guy Mergeai, Jean-Pierre Baudoin et André Toussaint

Publié dans *Tropicultura* 2010, **28**(4), 200-204

CHAPITRE 3: *In vitro* multiplication of *Jatropha curcas* L. from bud aggregates

Samson Daudet Medza Mve, Guy Mergeai, Philippe Druart, Jean-Pierre Baudoin, André Toussaint

Accepté par le *Journal of Technology Innovations in Renewable Energy* 2013, **2**, 145-154



---

**Conférences internationales ayant accepté l'exposé de résultats obtenus dans le cadre de cette thèse**

---

Fifth International Conference on Renewable Resources and Biorefineries (RRB5), 10-12 June 2009, Ghent, Belgium (Poster).

Developing Countries facing Global Warming : a Post-Kyoto Assessment, 12 et 13 juin 2009, à l'Académie Royale des Sciences d'Outre-Mer, Bruxelles, Belgium (Poster).

Colloque International et Interdisciplinaire sur les plantes alimentaires, médicinales et cosmétiques en zone sahélienne : Biotechnologies et valorisation du patrimoine végétal sous-exploité en zone sahélienne et soudano-sahélienne, 20 au 22 Octobre 2010 Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal (Communication orale).





---

**Abréviations - Abbreviations**

---

- *Français*

°C : Degré Celsius

μM : Micromole

μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> : Micromole par mètre carré par seconde

**2-iP** : N6-[2- Isopenty] adenine

**AIA** : Acide-3-indole acétique

**AIB** : Acide-3-indole butyrique

**ANA** : Acide naphtalène acétique

**BA** : Benzyladénine

**BAP** : 6-Benzylaminopurine

**CM-Bad** : Centre méristématique associé au bourgeonnement adventif des tissus sous-jacents

**CM-BAx** : Centre méristématique associé au bourgeonnement axillaire

**CO<sub>2</sub>** : Dioxyde de carbone

**CRA-W** : Centre Wallon de Recherche Agronomique

**CuSO<sub>4</sub>** : Sulfate de cuivre

**E** : Longitude Est

**EM** : Elongation medium

**GA<sub>3</sub>** : Acide gibbérellique

**GOGAT** : Glutamate Synthase

**GS** : Glutamine Synthétase

**INSAB** : Institut National Supérieur d'Agronomie et de Biotechnologies

**L** : Litre

**MC** : Milieu de culture d'établissement des explants nodaux

**Mel** : Milieu d'élongation

**MI** : Milieu d'induction

**Moy** : Moyenne

**MP** : Milieu de multiplication

**MS** : Milieu de Murashige et Skoog (1962)

**Mtep** : Million de tonnes équivalent pétrole

**N** : Latitude Nord

**O** : Longitude Ouest

**PAI-DRH** : Programme d'appui Institutionnel au Développement des Ressources Humaines

**pH** : Potentiel Hydrogène

**S** : Subculture

**TDZ** : Thidiazuron

**USTM** : Université des Sciences et Techniques de Masuku

• *English*

**$\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$**  : Micromole per square meter and second

**E** : Longitude East

**EM** : Elongation medium

**GM** : Growth medium

**IAA**: Indole-3-acetic acid

**IBA**: Indole-3-butyric acid

**ISSR** : Inter Simple Sequence Repeats

**N** : Latitude North

**NAA** : Naphthalene acetic acid

**O** : Longitude West

**PCR** : Polymerase chain reaction

**PPO** : Polyphénol-oxydase

**SNP** : Single nucleotide polymorphism

**SSR** : Single-sequence repeat

---

**Table des matières**


---

<b>Résumé .....</b>	<b>I</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>III</b>
<b>Dédicace .....</b>	<b>V</b>
<b>Avant-propos .....</b>	<b>VII</b>
<b>Publications réalisées dans le cadre de la thèse .....</b>	<b>XI</b>
<b>Conférences internationales ayant accepté l'exposé de résultats obtenus dans le cadre de cette thèse .....</b>	<b>XIII</b>
<b>Abréviations – Abbreviations .....</b>	<b>XV</b>
<b>Table des matières .....</b>	<b>1</b>
<b>Introduction générale .....</b>	<b>3</b>
1. Les biocarburants .....	5
2. <i>Jatropha curcas</i> L. et culture <i>in vitro</i> .....	7
3. Objectifs et structure de la thèse .....	9
Références bibliographiques .....	11
<b>CHAPITRE I : Culture <i>in vitro</i> de <i>Jatropha curcas</i> L. ....</b>	<b>13</b>
Résumé .....	17
Abstract .....	17
1. Introduction .....	18
2. <i>Jatropha curcas</i> L. ....	19
3. Culture <i>in vitro</i> de <i>Jatropha curcas</i> L. ....	23
4. Discussion et conclusion .....	32
Références bibliographiques .....	34
<b>CHAPITRE II : Amélioration du taux de multiplication <i>in vitro</i> de <i>Jatropha curcas</i> L. ...</b>	<b>41</b>
Résumé .....	45
Summary .....	46

1. Introduction .....	46
2. Matériel et méthodes .....	47
3. Résultats .....	50
4. Discussion .....	55
5. Conclusion .....	57
Références bibliographiques .....	57
<b>CHAPITRE III: <i>In vitro</i> micropropagation of <i>Jatropha curcas</i> L. from bud aggregates ....</b>	<b>61</b>
Abstract .....	65
Résumé .....	66
1. Introduction .....	66
2. Material and methods .....	67
3. Results .....	70
4. Discussion .....	75
5. Conclusion .....	79
Références .....	80
<b>Synthèse et discussion générale .....</b>	<b>83</b>
1. Mise au point d'un protocole de micropropagation et amélioration du taux de multiplication .....	85
2. Régénération des plantes entières par induction d'agrégats de bourgeons à partir d'explants nodaux .....	86
3. Rôle et effets des suppléments d'hormones et d'acides organiques dans l'induction d'agrégats de bourgeons .....	87
4. Taux de multiplication et d'enracinement par rapport aux objectifs poursuivis .....	90
Références bibliographiques .....	91
<b>Perspectives .....</b>	<b>95</b>
Références bibliographiques .....	99

## **Introduction Générale**



## Introduction générale

### 1 Les biocarburants

L'augmentation des prix du pétrole au cours de la dernière décennie a suscité un intérêt de plus en plus croissant pour les énergies renouvelables, en général, et les biocarburants en particulier (Yang et al., 2012). Leur croissance rapide est soutenue par la baisse de coûts des technologies et surtout, le maintien des subventions au niveau mondial qui s'élevaient à 88 milliards de dollars en 2011. Selon les prévisions, ces subventions seront d'environ 240 milliards de dollars en 2035 (FAO, 2008). De plus, les perspectives d'épuisement des réserves de pétrole militent en faveur de l'utilisation des biocarburants comme substituts aux énergies fossiles.

L'huile de *J. curcas* utilisée dans les lampes brûle sans dégagement de fumée et contient plus d'oxygène comparativement aux énergies fossiles comme le diesel. Sa qualité de combustion est propre, non toxique et écologique. Cette huile peut également être utilisée comme lubrifiant et carburant pour le moteur diesel ou trans-estérifiée en biocarburant avec la production de glycérine comme sous-produit (Datta et al., 2007; Heller, 1996). C'est un biodiesel très performant qui, contrairement aux autres biocarburants, peut être utilisé sans mélange ou modification des moteurs (Mofijur et al., 2012). Les perspectives qu'offre l'huile de *J. curcas* sont plus avantageuses que tous les autres biodiesels et alcools pour se substituer au diesel fossile. Cette huile ne contribue pas à une augmentation du niveau de CO<sub>2</sub> de carbone dans l'atmosphère (Chel and Kaushik, 2011; Yang et al., 2012). Chisti (2007) estime que pour combler seulement la moitié des besoins en carburants de transports des Etats-Unis, avec des cultivars de *J. curcas* produisant 1850 L d'huile/ha/an, il faudrait 140.10<sup>6</sup> ha de culture. Ce qui nécessite entre 210 et 350 milliards de plants pour couvrir cette superficie avec les densités respectives de 1500 à 2500 plants/ha. L'extension rapide de la culture de *J. curcas* en vue d'une production de biocarburant nécessite donc la mise à disposition du monde agricole, d'un très grand nombre de plantes performantes en un laps de temps très restreint.

Des technologies de conversion avancées et efficaces permettent aujourd'hui d'obtenir des biocarburants essentiellement à partir des trois filières faisant intervenir l'huile, l'alcool et le biogaz

comme matière première. Les huiles couramment utilisées sont le colza en Europe et le soja au Brésil et aux États-Unis d'Amérique. Dans les pays tropicaux et subtropicaux, on utilise l'huile de palme, de coprah et de *J. curcas* L. (Lorne, 2012). En 2010, la consommation mondiale des biocarburants représentait 3 % de la consommation totale de carburants, soit 55 millions de tonnes équivalent pétrole (Mtep). Parmi ces biocarburants, on retrouve 73 % de bioéthanol produit de la fermentation du sucre, utilisable dans les moteurs à essence, et 27 % de biodiesel produit à partir d'huiles végétales pour les moteurs diesels. Les échanges internationaux de biocarburants se sont élevés à 3,5 Mtep à travers le monde. Sous l'impulsion des États-Unis, l'Europe, l'Australie et le Brésil, la production mondiale de biocarburant a doublé en moins de six ans pour atteindre 140 milliards de litres en 2011. L'Union Européenne s'est engagée à ce que 10 % de ses besoins en carburants soient satisfaits par des ressources renouvelables d'ici 2020 principalement au moyen des biocarburants. Un pays comme l'Inde envisage un taux d'incorporation de 20% en 2020, soit l'équivalent de 20 milliards de litres de biodiesel. L'Agence Internationale de l'Energie prévoit une demande intérieure en biocarburants pour les pays africains d'environ 3,5 Mtep en 2030, soit environ deux milliards de litres de biodiesel (FAO, 2008).

À l'heure actuelle, le biodiesel est obtenu majoritairement à partir de produits alimentaires, ce qui pose un problème pour la sécurité alimentaire. Il est donc indispensable de se tourner vers des plantes qui n'entrent pas dans les consommations humaines et qui se cultivent sur d'autres terres que celles qui conviennent aux productions alimentaires (Reijnders, 2006). Les pays intertropicaux disposent d'un grand potentiel de plantes oléagineuses non-alimentaires qui restent largement sous-exploitées. Leur valorisation pourraient contribuer à une croissance économique durable, améliorer les revenus et conditions de vie des populations rurales (Janaun and Ellis, 2010; Misra and Murthy, 2011). Il serait donc particulièrement intéressant pour ces pays de tirer le meilleur parti de certaines de ces plantes. Parmi celles-ci, *J. curcas* L., est actuellement considéré comme une source importante d'huile susceptible de produire de grandes quantités de biodiesel (Jain and Sharma, 2012; Pandey et al., 2012a).



En condition optimale, une exploitation de *J. curcas* peut avoir une densité de plantation à l'hectare de 2 500 plants, soit un rendement moyen en graines de 10 tonnes par hectare (à partir de la cinquième année) et fournir 3700 litres d'huile brute équivalent au gasoil conventionnel (Heller, 1996; Openshaw, 2000). Il faudrait donc plus de 7 milliards de plants pour couvrir les 2.837.837 d'hectares en vue de satisfaire les seuls besoins de l'Union Européenne en 2012 et plus de 13 milliards de plants pour les besoins de l'Inde en 2020. De nombreux pays africains comme le Sénégal, le Mali, l'Ethiopie se sont aujourd'hui lancés dans la culture de *J. curcas* afin de diminuer leurs dépendances vis-à-vis des énergies fossiles mais également pour favoriser leur développement économique. Au regard de la demande mondiale toujours croissante en biocarburants, ces pays ont initié des programmes ambitieux de production de biodiesel à partir de *J. curcas*. En 2007, le Sénégal a initié une vaste campagne pour la plantation de 312.000 hectares de *J. curcas* à l'horizon 2013, ce qui nécessite 780.000.000 plants pour couvrir cette superficie. Le Gouvernement malien a approuvé en 2006, l'élaboration d'un document de politique énergétique unifiée qui retient au nombre des objectifs assignés au sous-secteur des Energies Renouvelables, celui de développer la culture *J. curcas*. En termes quantitatifs, il s'agit d'aboutir à une réduction significative des volumes d'hydrocarbures importés de l'ordre de 10% à la fin du premier quinquennat, 15% à la fin du second quinquennat et 20% à la fin du troisième. Ces objectifs correspondraient à des productions annuelles d'huile de *J. curcas* estimées à 39,2 millions de litres à l'horizon 2012, 56 millions de litres en 2017 et 84 millions de litres en 2022. Le matériel végétal nécessaire pour obtenir cette production est de 56.756.756 plants pour couvrir à terme 227.703 hectares de culture. Le marché de la production du matériel végétal de plantation pour l'extension de la culture de *J. curcas* est donc potentiellement intéressant.

## **2 *Jatropha curcas* L. et culture *in vitro***

*J. curcas* est une plante arbustive de la famille des *Euphorbiaceae* pouvant atteindre 8 m de hauteur (Sunil et al., 2013). Il ne nécessite aucun entretien particulier et a besoin d'au moins 400 à 600 mm de précipitations annuelles pour bien fructifier. *J. curcas* trouve son centre d'origine en Amérique centrale (Sunil et al., 2009). Il a été distribué par des marins portugais dès le 16<sup>ème</sup> siècle, des Caraïbes via le Cap-vert et la Guinée Bissau dans d'autres pays d'Afrique et d'Asie. Aujourd'hui, on le trouve

dans presque tous les pays tropicaux et subtropicaux du globe (Heller, 1996). Il pousse à l'état sauvage ou semi-cultivé en Amérique centrale et du Sud, en Afrique, en Inde et en Asie du Sud-Est (Singh et al., 2013).

Les différentes parties de *J. curcas* sont utilisées dans la médecine traditionnelle des zones intertropicales. Cette espèce est employée comme purgatif, vomitif et possède en outre des propriétés astringentes. Son latex contient de la jatrophine qui est un alcaloïde aux propriétés anti-cancéreuses. L'écorce, riche en tannins, est utilisée dans la coloration de tissus. Les tourteaux peuvent, après leur détoxification, servir d'aliment pour le bétail. Ces tourteaux sont aussi riches en azote, phosphore et potassium donc d'excellents fertilisants. Les plantations de *J. curcas* peuvent favoriser l'apiculture, car les fleurs attirent les insectes (Heller, 1996). Par ailleurs, cette plante est capable de séquestrer sept à huit tonnes de CO<sub>2</sub> par an et par hectare en conditions d'ensoleillement, d'humidité et de sols favorables (Pandey et al., 2012b). Ses rendements en huile combustible sont de 1800 L/ha/an en moyenne. Dix tonnes de graines de *J. curcas* pressées donnent théoriquement 3700 L d'huile brute (Chisti, 2007).

La mise en place des plantations actuelles est réalisée par le semis et le bouturage (Yang et al., 2012). Ces deux méthodes présentent autant d'avantages que d'inconvénients. Le semis en place donne des plantes plus résistantes à la sécheresse avec une croissance rapide, des rendements plus élevés, une meilleure concurrence vis-à-vis des adventices au cours des premières années et une plus grande résistance aux maladies. Mais, compte tenu du caractère allogame de l'espèce, la multiplication sexuée ne donne pas de plantes génétiquement identiques aux pieds-mères. Elles sont hétérogènes au niveau du port et des rendements avec une entrée en production seulement à partir de la 3<sup>ème</sup> ou 4<sup>ème</sup> année. Le bouturage permet d'obtenir des individus génétiquement identiques aux pieds-mères. Les plantes obtenues sont plus précoces ; leur 1<sup>ère</sup> production en graines apparaît dès la 2<sup>ème</sup> année (Sujatha et al., 2005). Toutefois, elles développent un système racinaire superficiel qui les rend sensibles à la verse et moins résistantes à la sécheresse. Leur durée de vie économique est aussi moindre comparativement aux plantes issues du semis (Nyamai and Omuodo, 2007).

En vue d'une industrialisation de la culture de *J. curcas*, il s'avère donc nécessaire de trouver une méthode de production du matériel végétal de plantation qui serait adaptée et performante. L'utilisation des biotechnologies et plus particulièrement des techniques de micropropagation de type conforme pourraient permettre d'obtenir une production en masse de plantes élites sur des périodes très courtes. Ces techniques de clonage assureraient entre autre une homogénéité culturelle et la stabilité génétique des plantes. Elles permettraient en outre de garantir l'état sanitaire du matériel de plantation (Yang et al., 2012). Plusieurs publications récentes font état de la mise au point de techniques de multiplication *in vitro* de *J. curcas*. Deux équipes indiennes ont établi des protocoles de micropropagation de *J. curcas* à partir d'apex et de bourgeons axillaires (Rajore and Batra, 2007; Sujatha et al., 2005). La seconde équipe a également obtenu du bourgeonnement adventif direct sur des explants foliaires. La propagation *in vitro* de clones de *J. curcas* à partir d'explants nodaux a été réalisée par Datta et al. (2007). Les techniques d'explants foliaires ont été adaptées par Deore and Johnson (2008). Ils ont mis au point un protocole simple et reproductible permettant la régénération de plantules à partir de disques foliaires. Bien que la micropropagation de *J. curcas* soit réalisée à partir de différents types d'explants, les taux de multiplication sont souvent insuffisants pour des applications à grande échelle.

### **3 Objectifs et structure de la thèse**

Les biocarburants actuellement commercialisés sont des produits de technologies, dites de première génération, obtenus à partir de la conversion de cultures destinées à l'alimentation. Leur développement se trouve donc essentiellement limité par la disponibilité des ressources agricoles et les usages alimentaires de la matière première. Il est donc nécessaire de privilégier le développement de biodiesel à partir de cultures non-alimentaires, susceptibles d'être cultivées en dehors des zones agricoles traditionnelles ou tout au moins de manière complémentaire, c'est le cas notamment de *J. curcas*. Au regard du caractère allogame de cette espèce et en l'absence de matériel végétal de plantation stabilisé ou certifié, il est nécessaire de mettre au point un protocole d'obtention intensif de plants à partir d'accessions et/ou d'écotypes présentant les caractéristiques agronomiques recherchées

ou les gènes d'intérêts correspondants. Ce matériel pourrait servir à l'établissement de parcs à bois, voir même à l'extension rapide des superficies cultivées en vue de la production du biodiesel.

L'objectif du présent travail est de développer un protocole de micropropagation simple, reproductible, et applicable à grande échelle. Ce protocole vise la production massale du matériel végétal de plantation de *J. curcas*. Il doit permettre des taux de multiplication élevés pour un processus performant par rapport à d'autres systèmes de multiplication végétative. Pour atteindre cet objectif, la thèse se fonde sur un ensemble de trois articles dont deux publiés et un accepté.

- Article 1 : Culture *in vitro* de *Jatropha curcas* L. (publié dans BASE).

Il s'agit d'une revue bibliographique décrivant les différentes formes de cultures *in vitro* de *J. curcas* L. et de comparer les multiples protocoles de multiplication de cette plante. Cette partie conduit à l'identification des pistes de recherche prioritaires.

- Article 2 : Amélioration du taux de multiplication *in vitro* de *Jatropha curcas* L. (publié dans TROPICULTURA).

Cette partie vise à augmenter le nombre de pousses par explant au cours de la micropropagation à partir de nœuds.

- Article 3: *In vitro* micropropagation of *Jatropha curcas* L. from bud aggregates (publié dans JOURNAL OF TECHNOLOGY INNOVATIONS IN RENEWABLE ENERGY).

Le chapitre est axé sur l'optimisation du protocole de micropropagation à partir d'explants nodaux en vue de son application à grande échelle. Il porte sur la recherche de la balance hormonale la plus efficace avec une combinaison adéquate d'acides aminés pour induire les agrégats de bourgeons.

Les trois articles sont suivis d'une synthèse et discussion générale des résultats. Enfin, les perspectives sont formulées en fin de document pour préciser les pistes de recherches utiles à la suite des travaux.

### Références bibliographiques

- Chel, A., and Kaushik, G. (2011). Renewable energy for sustainable agriculture. *Agronomy Sustainable Development* **31**, 91-118.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* **25**, 294-306.
- Datta, M. M., Mukherjee, P., Ghosh, B., and Jha, T. B. (2007). *In vitro* clonal propagation of biodiesel plant (*Jatropha curcas* L.). *Current Science* **93**, 1438-1442.
- Deore, A., and Johnson, T. (2008). High-frequency plant regeneration from leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L.: an important biodiesel plant. *Plant Biotechnology Reports* **2**, 7-11.
- FAO (2008). Situation mondiale de l'alimentation et de l'agriculture dans le monde : Les biocarburants: perspectives, risques et opportunités. *Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture* **1**, 11-26.
- Heller, J. (1996). Physic nut. *Jatropha curcas* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops *Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome*. **1**, 1-66.
- Jain, S., and Sharma, M. P. (2012). Correlation development between the oxidation and thermal stability of biodiesel. *Fuel* **102**, 354-358.
- Janaun, J., and Ellis, N. (2010). Perspectives on biodiesel as a sustainable fuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **14**, 1312-1320.
- Lorne, D. (2012). Le point sur les biocarburants : progression des marchés nationaux et internationaux. *Panorama* **2012**, 1-7.
- Misra, R. D., and Murthy, M. S. (2011). *Jatropha* – the future fuel of India. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **15**, 1350-1359.
- Mofijur, M., Masjuki, H. H., Kalam, M. A., Hazrat, M. A., Liaquat, A. M., Shahabuddin, M., and Varman, M. (2012). Prospects of biodiesel from *Jatropha* in Malaysia. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **16**, 5007-5020.
- Nyamai, D. O., and Omuodo, L. O. (2007). "*Jatropha curcas* : the untapped potential in eastern and central Africa," Vanilla-*Jatropha* Development Foundation, Nairobi, Kenya 49 p.

- Openshaw, K. (2000). A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. *Biomass Bioenergy* **19**, 1-15.
- Pandey, R. K., Rehman, A., and Sarviya, R. M. (2012a). Impact of alternative fuel properties on fuel spray behavior and atomization. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **16**, 1762-1778.
- Pandey, V. C., Singh, K., Singh, J. S., Kumar, A., Singh, B., and Singh, R. P. (2012b). *Jatropha curcas*: A potential biofuel plant for sustainable environmental development. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **16**, 2870-2883.
- Rajore, S., and Batra, A. (2007). An alternative source for regenerable organogenic callus induction in *Jatropha curcas* L. *Indian Journal of Biotechnology* **6**, 545-548.
- Reijnders, L. (2006). Conditions for the sustainability of biomass based fuel use. *Energy Policy* **34**, 863-876.
- Singh, B., Singh, K., Rejeshwar Rao, G., Chikara, J., Kumar, D., Mishra, D. K., Saikia, S. P., Pathre, U. V., Raghuvanshi, N., Rahi, T. S., and Tuli, R. (2013). Agro-technology of *Jatropha curcas* for diverse environmental conditions in India. *Biomass and Bioenergy* **48**, 191-202.
- Sujatha, M., Makkar, H. P. S., and Becker, K. (2005). Shoot bud proliferation from axillary nodes and leaf sections of non-toxic *Jatropha curcas* L. *Plant Growth Regulation* **47**, 83-90.
- Sunil, N., Kumar, V., Sujatha, M., Rajeswara Rao, G., and Varaprasad, K. S. (2013). Minimal descriptors for characterization and evaluation of *Jatropha curcas* L. germplasm for utilization in crop improvement. *Biomass and Bioenergy* **48**, 239-249.
- Sunil, N., Sivaraj, N., Anitha, K., Babu, A., Vinod, K., Sudhir, E., Vanaja, M., and Varaprasad, K. S. (2009). Analysis of diversity and distribution of *Jatropha curcas* L. germplasm using geographic information system. *Genetic Resources and Crop Evolution* **56**, 115-119.
- Yang, C.-Y., Fang, Z., Li, B., and Long, Y.-f. (2012). Review and prospects of *Jatropha* biodiesel industry in China. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **16**, 2178-2190.

**CHAPITRE I**

***Culture in vitro de Jatropha curcas L.***

Medza Mvé Samson Daudet, Guy Mergeai, Jean-Pierre Baudoin, André Toussaint

Publié dans *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2011, **15**(4), 567-574

*Reçu le 18 janvier 2011, accepté le 14 avril 2011.*

Le texte de cet article a été adapté et complété pour répondre aux besoins de la présente thèse.





**Objectifs du chapitre**

La culture de tissus végétaux est un puissant outil qui vient souvent en complément des méthodes classiques de production du matériel végétal de plantation. L'objet de ce chapitre est la présentation des différentes méthodes de culture *in vitro* de *Jatropha curcas* L., ainsi que les différents protocoles mis au point, en vue d'une multiplication en masse de cette plante. Ce chapitre conduit à l'identification des pistes prioritaires de recherche nécessaires à la suite des travaux. Il ouvre des perspectives pour améliorer les protocoles susceptibles de mettre à la disposition des exploitants de la filière, un matériel végétal de plantation homogène adapté aux conditions de culture choisies et performant du point de vue des rendements.



## Culture *in vitro* de *Jatropha curcas* L.

Samson Daudet MEDZA MVE<sup>1</sup>, Guy MERGEAI<sup>1</sup>, Jean-Pierre BAUDOIN<sup>1</sup>, André TOUSSAINT<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Univ. Liège-Gembloux Agro-Bio Tech. Unité de Phytotechnie tropicale et Horticulture. 2, Passage des Déportés, B-5030 Gembloux (Belgique). E-mail : [medzamve@yahoo.fr](mailto:medzamve@yahoo.fr)

Reçu le 18 janvier 2011, accepté le 14 avril 2011.

### Résumé

L'extension de la culture de *Jatropha curcas* L. comme espèce productrice de biocarburant nécessite la mise à la disposition des producteurs d'un très grand nombre de plantes en un laps de temps très court. Ces plantes doivent pouvoir donner un haut rendement en huile, être morphologiquement et phénotypiquement homogènes afin de faciliter les opérations culturales. Si les fortes teneurs en huile peuvent être obtenues par sélection variétale, l'obtention de matériel homogène passe par la propagation *in vitro*. Diverses méthodes de production massive par culture axénique ont été publiées. La présente étude passe en revue les protocoles de multiplication *in vitro* connus de *J. curcas* et discute de leurs possibilités d'application à l'échelle industrielle.

**Mots-clés.** *Jatropha curcas* L, micropropagation, explant, désinfection, embryogenèse somatique, culture de tissu.

### Abstract

***In vitro* culture of *Jatropha curcas* L.** The extension of *Jatropha curcas* L. cultivation as a biofuel feedstock species requires the distribution of a very large number of plants to the producers in a very short period of time. These plants have to be able to give a high oil yield and be morphologically and phenotypically homogeneous to facilitate cultural operations. If high oil content can be obtained by varietal selection, the achievement of homogeneous material passes by the *in vitro* propagation. Various methods of mass production of plant material by axenic culture have been published. This study reviews the protocols published for *in vitro* propagation of *J. curcas* and discusses their applicability to an industrial scale.

**Keywords.** *Jatropha curcas* L, micropropagation, explants, disinfection, somatic embryogenesis, tissue culture.

## 1 INTRODUCTION

Parmi les cultures potentiellement utilisables pour fournir la matière première indispensable pour la production de biocarburant, *Jatropha curcas* L., de la famille des *Euphorbiaceae*, est celle qui suscite le plus d'intérêt pour divers organismes de développement dans les régions tropicales et subtropicales (Leela et al., 2011; Singh et al., 2013). Ses graines contiennent 30 à 40 % d'une huile non comestible. Il est largement distribué à l'état sauvage ou semi-cultivé en Amérique Centrale et du Sud, en Afrique subsaharienne, en Inde et en Asie du Sud-Est (Cano-Asseleih, 1986; Cano-Asseleih et al., 1989). *J. curcas* est présent dans les climats tropicaux semi-arides et subtropicaux chauds. Il se développe à des altitudes de 0 à 1 500 m au-dessus du niveau de la mer. Il ne nécessite aucun entretien particulier pour fructifier, demande au moins 400 à 600 mm de précipitations annuelles mais supporte mal des précipitations supérieures à 2000 mm. C'est une plante héliophile, se développant bien sous des températures moyennes allant de 20 à 32°C (Kumar and Sharma, 2008). Elle est décrite comme résistante à des sécheresses pouvant durer jusqu'à 7 mois et tolérante des températures basses voire même un gel de très courte durée (Katwal and Soni, 2003). *J. curcas* peut pousser sans beaucoup de soins sur des sols salins, infertiles ou marginaux. Si toutes les parties de *J. curcas* sont utilisées en médecine traditionnelle pour des usages très variés, il a été montré, entre autres, que le latex contient de la jatrophine, un alcaloïde aux propriétés anti-cancéreuses (Parsons, 2005).

Contrairement à d'autres plantes oléagineuses, cet arbuste commence généralement à produire des fruits à partir de la deuxième année et sa durée de production serait de 40 à 45 ans sans replantation. Utilisé depuis longtemps comme haie dans les régions sahéliennes, ses fruits accumulent de l'huile qui brûle sans dégagement de fumée. Cette huile sert généralement de matière première pour la fabrication du savon. Elle peut également être utilisée dans les moteurs diesel sans transformation ou être trans-estérifiée en biocarburant et remplacer partiellement ou totalement le diesel (Bhering et al., 2013; Datta et al., 2007). La qualité de l'huile de *J. curcas* est idéale pour une utilisation en tant que biodiesel. De plus, selon Prabakaran and Sujatha (1999), cette huile est économique en termes de bilan carbone par rapport au carburant fossile.

Différentes sources bibliographiques affirment que *J. curcas* est une plante unique, parmi les cultures énergétiques, si l'on considère le nombre d'avantages qui peuvent être attendus de sa culture à grande échelle. Son utilisation pour la production de biocarburant pourrait être d'un intérêt majeur pour pallier les pénuries d'énergie, accélérer la réduction des émissions de gaz à effet de serre par un bilan carbone neutre et contribuer à l'augmentation des revenus des agriculteurs (Openshaw, 2000). Cependant, plusieurs défis technologiques subsistent pour son exploitation commerciale. La diffusion de sa culture à large échelle demande notamment la production massale, en un laps de temps court, d'un matériel végétal de plantation de qualité, phénotypiquement homogène, adapté aux conditions de culture des zones d'implantation, à mettre à la disposition des paysans et autres exploitants. Sa multiplication se fait classiquement par graines ou par boutures au champ ainsi que par semis et bouturage en pépinière. Toutefois, ces méthodes de multiplication présentent toutes des inconvénients. Jha et al. (2007) affirment que la multiplication de *J. curcas* par semis permet de cultiver au champ des plantes qui sont hétérogènes et dont les graines contiennent des quantités variables en huile. D'autre part, dans le cas des cultures en pépinière, la nécessité de transporter les plants produits vers le lieu de transplantation rend la méthode onéreuse. En ce qui concerne la culture par bouturage, les plants obtenus développent un système racinaire superficiel qui les rend sensibles à la verse et constitue un obstacle majeur pour leur maintien sur des sols pauvres ou lessivés (Nyamai and Omuodo, 2007). Face à ces différentes solutions, la culture *in vitro* apparaît comme une voie alternative permettant de produire à la fois massivement et rapidement des plantes d'un clone productif sélectionné, voire amélioré. Plusieurs protocoles ont été mis au point pour la micropropagation de *J. curcas*. Leur application à l'échelle industrielle pourrait permettre de multiplier massivement et à un prix compétitif, de nouveaux cultivars plus productifs en vue de l'extension de la culture pour la production d'agrocarburants.

## **2 JATROPHA CURCAS L.**

### **2.1 Botanique**

*J. curcas* est un petit arbre ou grand arbuste d'une hauteur de trois à cinq mètres, mais dans des conditions favorables, il peut atteindre une hauteur de 8 ou 10 m (Kumar and Sharma, 2008). Le genre

*Jatropha* est morphologiquement diversifié et englobe plus de 200 espèces qui sont distribuées principalement dans les régions tropicales sèches d'Amérique, d'Afrique et d'Asie (Heller, 1996). Dehgan and Webster (1979) reconnaissent deux subdivisions de l'espèce, avec 10 sections et sous-sections, en fonction de leur morphologie et leurs relations inter-génériques. Il englobe les arbres, les rhizomateux, les sous-arbustes, et les géophytes facultatifs annuels (Dehgan, 1984). *J. curcas* est la forme la plus primitive de ce genre. Il peut former des hybrides somatiques et naturels (Datta et al., 2007).

## 2.2 Reproduction sexuée

*J. curcas* est une plante monoïque à fleurs diclines et, exceptionnellement, il possède parfois des fleurs hermaphrodites. La floraison se produit au cours de la saison des pluies et peut être permanente toute l'année dans les régions à pluviométrie régulière. Elle dure 15 à 20 jours pour chaque grappe et un mois pour la plante entière. La maturation des anthères se fait avant celle des stigmates (Solomon Raju and Ezradanam, 2002). L'inflorescence est à cyme ombelliforme terminale ou axillaire, souvent en paire, les fleurs femelles solitaires terminent chaque axe principal, et de nombreuses fleurs mâles se trouvent sur les rameaux latéraux. Le ratio de fleurs mâles et femelles varie de 24 : 1 à 29 : 1. Les fleurs sont jaunâtres à verdâtres et de petite taille.

Les stigmates sont réceptifs pendant trois jours après l'ouverture de la fleur. Les fleurs mâles s'ouvrent le premier ou le second jour de la vie de l'inflorescence. L'ouverture de 60% de fleurs femelles s'effectue entre le deuxième et le cinquième jour. La viabilité du pollen diminue considérablement deux ou trois jours après la dispersion. La pollinisation est croisée et essentiellement entomophile. Dans le cas d'arbre isolé, la pollinisation se fait entre fleurs de la même plante (geitonogamie) (Solomon Raju and Ezradanam, 2002). Le butinage est réalisé à 61% par les fourmis, 34% par les abeilles (*Apis mellifica* L., *A. dorsata*, *A. florea*, *A. mellifera*) et 5% par les mouches (Chang-wei et al., 2007). Les rares fleurs hermaphrodites peuvent être auto-pollinisées, les fruits qui proviennent de cette auto-pollinisation sont peu nombreux et 25% n'atteignent pas la maturité (Solomon Raju and

Ezradanam, 2002). Les plantes issues de l'autofécondation ont une croissance moins vigoureuse, de faibles rendements en graines et en huile (Stacy, 2001).

Chaque inflorescence donne environ dix fruits ovoïdes ou plus. Le fruit est une capsule de couleur verte qui devient jaunâtre à brunâtre quand elle arrive à maturité 60 à 90 jours après floraison (Ratree, 2004). Elle contient 2 à 3 graines d'environ 2 cm de long. Les graines sont noires et leur poids est de 727 g pour 1000 graines, soit 1375 graines/kg en moyenne (Kumar and Sharma, 2008). L'embryon de la graine est exalbuminé, recouvert d'un tégument noirâtre. Généralement cinq racines sont formées à partir de la graine, une racine pivotante et quatre racines latérales (Achten et al., 2008).

### **2.3 Multiplication végétative par bouturage**

Les boutures de 1,5 à 3 centimètres de diamètre, 12 à 15 cm de long et contenant 2 à 5 nœuds, sont prélevées sur des pieds-mères robustes de *J. curcas*, âgés de 10 ans ou moins, indemnes de maladies et de parasites. Elles peuvent aussi être prélevées sur des branches semi-lignifiées des arbres âgés d'un ou deux ans. Les racines se forment sur la partie pointue de la bouture et sont moins nombreuses quand la coupe est oblique. Si elle est droite, elles se forment d'une façon uniforme tout autour du plan de coupe. Les racines sont cependant de formes inégales et de tailles différentes. Cette différence morphologique vis-à-vis des plantes issues de semis entraîne souvent une moins bonne résistance aux conditions difficiles comme la sécheresse (Domergue, 2008). Dans un environnement favorable (principalement l'humidité), les plantes issues de boutures se développent plus vite que celles issues de graines.

### **2.4 Phénologie**

C'est une espèce à feuilles caduques dont la chute a lieu en saison sèche (Kumar and Sharma, 2008). De courtes périodes de sécheresse peuvent induire la floraison une fois que le sol est de nouveau humide (Heller, 1996).

## 2.5 Ressources et diversité génétiques chez *J. curcas*

Des études menées sur différentes accessions et/ou génotypes de *J. curcas* collectés en Afrique, en Amérique et en Asie, ont montré qu'il y avait une faible diversité génétique entre les populations (Sharma et al., 2011). Pamidimarri et al. (2009) et Sun et al. (2008) ont également montré par AFLP (amplified fragment length polymorphism) que la variabilité génétique entre les individus d'accessions de *J. curcas* toxique et non toxique originaire du Mexique était faible.

Avec les marqueurs AFLP, Tatikonda et al. (2009) ont évalué la diversité génétique de 48 accessions de *J. curcas* d'origine indienne. Ils ont trouvé 680 fragments polymorphes fournissant un pouvoir discriminant qui a permis de classer ces accessions en cinq groupes principaux. Nielsen et al. (2007) indiquent de faibles niveaux de diversité génétique sur les variétés locales africaines. Basha and Sujatha (2009b) placent généralement dans le même groupe les accessions et/ou écotypes de *J. curcas* d'origine africaines et asiatiques. Toutefois, l'introduction nouvelle ou l'amplification de cette variabilité génétique pourrait être effectuée par des croisements intraspécifiques et/ou interspécifiques. Des essais ont été réalisés entre *J. curcas* et le *J. gossypifolia* L., *J. glandulifera* Roxb., *J. integerrima* Jacq., *J. multifida* L., *J. villosa* (Forssk.) Müll. Arg., ainsi que *J. maheshwarii* Subr. & M.P. Nayar. Les hybrides F1, F2 et F3 doivent encore être évalués sur leurs performances agronomiques plus particulièrement les rendements en graines et en huile (Basha and Sujatha, 2009a).

La taille du génome de *J. curcas* est moins grande comparativement aux autres plantes de la famille des *Euphorbiaceae* (Carvalho et al., 2008). Il est possible que toutes les populations des accessions et/ou écotypes africains et asiatiques proviennent d'une base génétique étroite, même si le transfert de pollen sur de longues distances reste possible. Les goulots d'étranglement génétiques résulteraient de la diffusion à grande échelle du matériel végétal de plantation, par multiplication végétative sur de courtes périodes. Ces goulots sont connus chez les espèces agroforestières et d'autres cultures notamment le caféier ainsi que le bananier (Heslop-Harrison and Schwarzacher, 2007; Lopez-Gartner et al., 2009), ce qui induit des risques d'érosion génétique (Lengkeek et al., 2005).



### 3 CULTURE *IN VITRO* DE *JATROPHA CURCAS* L

Parmi les différentes techniques élaborées pour la multiplication *in vitro* de *J. curcas*, on distingue la micropropagation par bourgeonnement axillaire ou adventif et l'embryogenèse somatique. Le principe de la culture *in vitro* des végétaux est de cultiver des explants en conditions axéniques sur des milieux nutritifs qui sont également favorables au développement de microorganismes. Il convient donc d'assurer des conditions d'asepsie par la désinfection du matériel végétal ainsi que la stérilisation des milieux de culture et du matériel de travail (Boulay, 1993). Il s'agit ensuite de définir les milieux, ainsi que les conditions de culture à appliquer aux techniques de multiplication *in vitro* choisies, pour obtenir des taux de multiplication assez élevés pour rendre l'opération performante.

#### 3.1 Conditions générales de mise en culture *in vitro*

**Désinfection du matériel végétal.** Suivant la provenance des explants, deux méthodes sont classiquement utilisées : la désinfection au chlorure de mercure, généralement employée sur du matériel potentiellement infecté, et la désinfection à l'hypochlorite de calcium.

Deore and Johnson (2008), Sarika and Meenakshi (2009), (Pratibha, 2010) et Purkayastha et al. (2010) ont utilisé la première méthode pour désinfecter des explants de *J. curcas* provenant de serres, de pépinières ou du champ. Elle consiste à laver d'abord les explants à l'eau courante, les tremper ensuite dans une solution fongicide (systémique et à large spectre d'action) pendant 1 à 2 h avant de les rincer 3 à 4 fois dans de l'eau distillée. Les explants sont alors plongés dans de l'alcool à 70% pendant 30 s, puis immergés dans une solution de chlorure de mercure à 0,1%. Le temps d'immersion dans cette dernière solution varie suivant le type d'explant : de 10 à 15 min pour des explants foliaires ou des apex et de 15 à 30 min pour des explants nodaux. Après le traitement au chlorure de mercure, le matériel est rincé quatre fois avec de l'eau distillée stérile, pour éliminer toute trace de substance désinfectante.

Sujatha and Mukta (1996) ont désinfecté les explants nodaux de *J. curcas* à l'hypochlorite de calcium. Les explants sont d'abord lavés à l'eau courante, puis dans une solution de Dettol à 5% et

trempés dans l'alcool à 70% pendant 30 s. Ils sont ensuite immergés dans une solution filtrée d'hypochlorite de calcium à 10% pendant 10 à 15 min pour les feuilles, les apex et cotylédons, 20 à 30 min pour les nœuds. Enfin, on effectue trois rinçages successifs avec de l'eau distillée stérile, dont un rinçage en agitation pendant 1 min, sous une hotte à flux laminaire stérile.

**Stérilisation des milieux et du matériel de travail.** En général, les milieux de culture et le matériel de travail sont stérilisés par autoclavage pendant 20 min à une température de 121°C et sous une pression de 1,35 bar (Deore and Johnson, 2008; Purkayastha et al., 2010; Sarika and Meenakshi, 2009).

**Milieux et conditions de culture.** Quelle que soit la technique de propagation, le milieu de base généralement utilisé est le milieu de Murashige and Skoog (1962) [MS]. Le pH est ajusté à  $5,7 \pm 0,1$  et le milieu est solidifié avec de l'agar à une concentration variable (de 0,7% à 0,8%) selon la qualité du produit commercialisé par les différents fournisseurs tels que S.D. Fine, Hi-media ou Merck (Datta et al., 2007; Sarika and Meenakshi, 2009).

Après la mise en culture sous hotte à flux laminaire, les conteneurs sont placés dans des chambres conditionnées à une humidité relative de 50 à 80 %. Pour la micropropagation au sens strict, les cultures sont soumises à éclaircissement, avec une photopériode de 16 h de lumière et 8 h d'obscurité, une intensité lumineuse de  $60 \text{ à } 80 \mu\text{M m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  et  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  de température (Deore and Johnson, 2008; Khurana-Kaul et al., 2010; Singh et al., 2010). Pour l'embryogenèse somatique à partir d'explants cotylédonaire, les cals embryogènes sont induits à  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  dans l'obscurité totale continue, puis transférés à une photopériode de 14 h à  $80 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Par contre, l'embryogenèse somatique à partir d'explants foliaires est obtenue pour une photopériode de 16 h de lumière, une intensité lumineuse de  $80 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  et une température de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  (Jha et al., 2007).

### **3.2 La micropropagation**

La micropropagation se fait par bourgeonnement des axillaires, à partir d'explants nodaux de jeunes pousses, et par culture d'apex. Mais elle peut également être obtenue par bourgeonnement adventif

(organogénèse) sur des fragments de feuilles, de cotylédons ou de pousses (épicotyle ou hypocotyle) utilisés comme explants. On distingue alors l'organogénèse directe et indirecte lorsque les bourgeons apparaissent sans ou après la formation de cal.

**La micropropagation par culture des axillaires.** La multiplication clonale à partir des nœuds axillaires des pousses est une méthode de culture *in vitro* couramment utilisée chez beaucoup d'espèces végétales. Elle résulte du développement de bourgeons axillaires. La composition minérale et hormonale du milieu, ainsi que la succession de différents milieux de culture, sont des facteurs importants dans l'obtention de taux élevés de multiplication (nombre de plants/subculture). Chez *J. curcas*, les explants nodaux peuvent être prélevés sur des plantes cultivées en champ ou en conditions contrôlées (Datta et al., 2007). Les meilleurs résultats sont obtenus lorsque les explants sont cultivés sur milieu MS additionné de sulfate d'adénine (55,6  $\mu\text{M}$ ) et de diverses concentrations en cytokinines : kinétine, benzylaminopurine (BA), thidiazuron (TDZ) ou N<sup>6</sup>-[2- Isopentyl] adenine (2-iP). Les cytokinines donnent des réponses variables sur le nombre de bourgeons formés par subculture (Khurana-Kaul et al., 2010; Sarika and Meenakshi, 2009). Ainsi, la kinétine seule (2,3 à 23,2  $\mu\text{M}$ ) donne des taux faibles (2,2 à 3,5) après quatre ou six semaines (Datta et al., 2007). Le TDZ a un effet limité (Datta et al., 2007), alors qu'il favorise une bonne multiplication chez certaines plantes comme *Artemisia vulgaris* (Sujatha and Kumari, 2007) ou *Rhododendron* spp. (Pavingerova, 2009). Parmi les cytokinines, c'est la BA qui semble la plus efficace, donnant un taux de multiplication moyen de 3,4 pousses par explant après 3 semaines (Pratibha, 2010). Cet effet de la BA a également été démontré sur plusieurs plantes de la famille des *Euphorbiaceae* (Datta et al., 2007).

La combinaison de plusieurs substances de croissance paraît également très favorable à la multiplication. Kalimuthu et al. (2007) ont obtenu en six semaines trente à quarante plants par nœud mis en culture, en combinant de faibles concentrations de kinétine (4,64  $\mu\text{M}$ ), de BA (6,65  $\mu\text{M}$ ) et d'acide-3-indole acétique (AIA) (0,28  $\mu\text{M}$ ). Sujatha et al. (2005) ont initié le bourgeonnement axillaire sur MS supplémenté de 2,3 à 45,4  $\mu\text{M}$  de kinétine, de TDZ ou de BA. Les pousses obtenues ont été transférées sur MS contenant 2,5  $\mu\text{M}$  d'acide-3-indole butyrique (AIB) et 8,9  $\mu\text{M}$  de BA, avec

des taux de multiplication de 4 bourgeons après 6 semaines. D'autre part, pour des nœuds initiés sur MS additionné d'AIB (4,92  $\mu\text{M}$ ) et de BA (8,87  $\mu\text{M}$ ), Medza Mve et al. (2010) ont obtenu, après trois semaines, un taux de multiplication de 8,4 pousses par nœud après transfert de bourgeons sur un milieu MS contenant 2,46  $\mu\text{M}$  d'AIB et 6,65  $\mu\text{M}$  de BA. L'ensemble de ces résultats montre que la présence de BA, dans les milieux d'initiation et de multiplication enrichis en d'autres substances de croissance, serait favorable à l'obtention d'un bon taux de multiplication par culture d'axillaires.

Le génotype jouerait également un rôle important sur le nombre de pousses produites par explant nodal en phase de multiplication. Ainsi, sur une variété de *J. curcas* non toxique originaire du Mexique âgée de 3 mois et cultivée en conditions contrôlées, Sujatha et al. (2005) ont obtenu un taux de 2,3 pousses par nœud après 4 semaines de culture sur un milieu de multiplication MS contenant 4,7  $\mu\text{M}$  de kinétine. Pour la même durée de croissance, (Datta et al., 2007) ont, quant à eux, enregistré jusqu'à 4 pousses par explant sur un milieu MS contenant 4,6  $\mu\text{M}$  de kinétine pour une variété de *J. curcas* toxique originaire du Bengale.

Pour obtenir la croissance des plantules nouvellement formées, les pousses feuillées obtenues sur milieu de multiplication sont individualisées et leur élongation est réalisée sur un milieu MS contenant 4,5  $\mu\text{M}$  BA et 7,5  $\mu\text{M}$  AIB (Kumar and Sharma, 2008). L'élongation des pousses peut également être obtenue grâce à une combinaison de BA (2,25  $\mu\text{M}$ ) et d'AIA (4,5  $\mu\text{M}$ ) (Kumar and Reddy, 2010; Kumar et al., 2011). Après cette étape, le développement de racines est réalisé sur milieu MS contenant de faibles concentrations en AIB (0,5-1  $\mu\text{M}$ ) (Datta et al., 2007). Cet enracinement peut aussi se faire sur un milieu MS  $\frac{1}{2}$  avec un optimum pour une concentration de 14,76  $\mu\text{M}$  d'AIB (Sarika et al., 2009). Mais on observe une absence de rhizogénèse et une production abondante de cals lorsque les pousses sont transférées pour enracinement sur MS  $\frac{1}{2}$  en présence de l'ANA (0,5-10  $\mu\text{M}$ ) ou de l'AIA (0,5-11,4  $\mu\text{M}$ ) (Datta et al., 2007; Sarika and Meenakshi, 2009).

Bien que différents protocoles de régénération de *J. curcas* à partir d'explants nodaux aient été mis au point, le nombre de plantules produites par cycle de culture et les taux de multiplication restent trop faibles, sauf pour certaines variétés, que pour envisager une application industrielle.

**La micropropagation par culture d'apex.** Des apex de *J. curcas* mis en culture sur MS supplémenté avec diverses cytokinines développent un cal important à leur base et initient la formation de pousses après 7 jours.

La prolifération comporte 2 voies :

- l'élongation de la tige principale accompagnée de la formation des axillaires au niveau des nœuds,
- l'inhibition de la croissance de la pousse principale avec l'apparition de 4 à 6 bourgeons à la base de la pousse.

Le type de cytokinine présent dans le milieu de culture joue également un rôle déterminant sur la multiplication à partir des apex. La BA (2,5  $\mu\text{M}$ ) fournit les meilleurs résultats, avec une moyenne de 6,2 pousses régénérées par apex mis en culture après 14 jours. Dans un milieu contenant la TDZ (2,5  $\mu\text{M}$ ), ces apex forment des bourgeons rabougris avec un taux de multiplication de 1,6 après trois semaines. Quant à la kinétine (2,5  $\mu\text{M}$ ) ou la 2-iP (5  $\mu\text{M}$ ), elles donnent des taux de multiplication respectifs de 3,2 et 2,7 (Purkayastha et al., 2010). Plusieurs auteurs ont montré que les cytokinines sont efficaces pour la multiplication de plusieurs espèces de la famille des *Euphobiaceae* à partir d'apex. C'est le cas d'*Euphorbia lathyris* (Ripley and Preece, 1986; Tideman and Hawker, 1982), d'*Euphorbia peplus* et d'*Euphorbia tannensis* (Tideman and Hawker, 1982). Pour d'autres espèces de cette famille, la présence d'une seule cytokinine semble favorable (Ripley and Preece, 1986), la combinaison de deux cytokinines n'ayant aucun effet synergique sur la prolifération des pousses, contrairement à ce qui est observé chez d'autres plantes (Purkayastha et al., 2010).

#### **Micropropagation par bourgeonnement adventif (organogénèse)**

**Micropropagation à partir de tiges et de pétioles.** La fréquence d'induction du bourgeonnement adventif dans le milieu de culture varie avec le type d'explant et les effets combinés des régulateurs de croissance (Lu, 2003; Wei et al., 2004a). Ainsi, la régénération à partir d'explants d'hypocotyles et de pétioles a été réalisée sur MS contenant différentes concentrations en cytokinine (zéatine,

kinétine et BA), seule ou en combinaison avec l'AIB (Sujatha and Mukta, 1996). Un faible taux de régénération de plantes entières (4 %) est obtenu après quatre semaines uniquement avec la zéatine seule, à une concentration de 9,12  $\mu\text{M}$ . Sujatha et al. (2000) ont obtenu 50 et 67 % de régénération de pousses sur 60 explants mis en culture provenant respectivement de pétiole et d'hypocotyle sur un milieu MS contenant de la BA (2,21  $\mu\text{M}$ ), de l'AIB (4,92  $\mu\text{M}$ ) et de la kinétine (0,46  $\mu\text{M}$ ). L'augmentation de la concentration d'AIB, au-delà de 6,65  $\mu\text{M}$ , inhibe la régénération des pousses à partir de ce type d'explant. Pour Wei et al. (2004b), la présence de faibles concentrations en AIB (0,10 à 0,49  $\mu\text{M}$ ), en combinaison avec la BA, est indispensable pour la régénération. Les concentrations de ces deux régulateurs de croissance influencent significativement le potentiel de multiplication (Lu, 2003; Wei et al., 2004a). Au cours de la régénération des plantes entières de *J. curcas* à partir des explants de pétiole, on peut observer la formation de structures globulaires ressemblant à des embryons somatiques sur milieu MS contenant de la BA (4,44  $\mu\text{M}$ ) et de l'AIB (4,92  $\mu\text{M}$ ). Toutefois, ces structures ne se développent pas en plantes entières. Wei et al. (2012) ont mis en culture des explants d'hypocotyle sur MS contenant 0,49  $\mu\text{M}$  d'AIB en combinaison avec 0,88 à 2,21  $\mu\text{M}$  de BA ; 38 % de ces explants, sur un effectif de 40, ont régénéré des plantules après 30 jours.

Bien que les pourcentages de régénération soient assez élevés lorsqu'on utilise des fragments de tiges ou de pétioles, le nombre de plantules obtenues à partir d'un explant reste trop faible pour assurer une micropropagation à grande échelle.

**Micropropagation à partir de cotylédons et de feuilles.** En ce qui concerne la culture de cotylédons, il semblerait que le type de cytokinine soit toujours le facteur qui influence le plus fortement le développement de nouvelles pousses. Des fragments de cotylédons mis en culture sur MS complété avec une cytokinine, la TDZ ou la BA, ont pu régénérer des pousses au bout de 6 semaines (Kumar and Reddy, 2010). Pour des teneurs en TDZ de 9,08  $\mu\text{M}$ , on note la formation de 26,2 bourgeons par explant après 6 semaines sur 93 % d'explants cotylédonaires mis en culture. En présence de BA (13,5 à 54  $\mu\text{M}$ ), le nombre moyen de pousses régénérées varie de 3,6 à 6,9 par explant sur moins de 50 % des explants. De plus, les études montrent que les résultats sont meilleurs

lorsque les cotylédons sont prélevés sur plantules de *J. curcas* cultivées *in vitro*. Selon les auteurs, la différence des teneurs endogènes en régulateurs de croissance entre les plantules *in vitro* et *in vivo* serait à l'origine de la disparité des résultats. Schween and Schwenkel (2003) avaient émis cette hypothèse en ce qui concerne les cytokinines endogènes pour expliquer les différences de résultats obtenus au cours de la période d'induction à partir des explants cotylédonaire. L'élongation des pousses est ensuite réalisée sur milieu MS contenant généralement de la BA à 2,25  $\mu\text{M}$  et de l'AIA à 8,5  $\mu\text{M}$ , alors que l'enracinement est obtenu sur milieu MS sans régulateur de croissance (Kumar and Sharma, 2008).

Selon Sujatha and Mukta (1996) et Deore and Johnson (2008), les explants de feuilles représentent un matériel de choix pour la micropropagation de *J. curcas*. Après trois semaines de culture des explants sur milieu MS supplémenté de 8,9  $\mu\text{M}$  de BA et 4,9  $\mu\text{M}$  d'AIB, la régénération des plantes entières est obtenue après repiquage, toutes les quatre semaines, des pousses néoformées sur milieu MS contenant 8,9  $\mu\text{M}$  de BA et 2,5  $\mu\text{M}$  d'AIB. On enregistre un taux de multiplication de 4,3 sur 90 % de 60 explants foliaires mis en culture (Sujatha et al., 2005).

Le meilleur bourgeonnement adventif est obtenu par Deore and Johnson (2008) après 4 à 6 semaines de culture sur milieu d'induction à base de MS contenant une combinaison de TDZ (2,27  $\mu\text{M}$ ), de BA (2,22  $\mu\text{M}$ ) et d'AIB (0,49  $\mu\text{M}$ ). La croissance des pousses est ensuite obtenue sur milieu MS contenant de la BA (4,44  $\mu\text{M}$ ), de la kinétine (2,33  $\mu\text{M}$ ), de l'AIA (1,43  $\mu\text{M}$ ) et du GA3 (0,72  $\mu\text{M}$ ). Ce milieu donne une moyenne de 11,5 pousses par explant foliaire après 12 semaines de culture comportant des subcultures toutes les 3 semaines. Les tiges feuillées obtenues de 2 à 3 cm de hauteur sont séparées et placées sur un milieu d'induction racinaire composé de milieu MS enrichi en AIB (0,5  $\mu\text{M}$ ). Après 30 jours de culture, 80 % des plantes ont régénéré des racines et sont prêtes à être acclimatées. De meilleurs résultats ont été obtenus récemment par Khurana-Kaul et al. (2010). Après 6 semaines de culture sur milieu MS contenant 0,90  $\mu\text{M}$  TDZ, 0,98  $\mu\text{M}$  d'AIB et 1  $\mu\text{M}$  de sulfate de cuivre ( $\text{CuSO}_4$ ), ils ont obtenu une moyenne de 18,8 bourgeons par explant foliaire sur 80 % des explants foliaires mis en culture.

Pratibha (2010) a montré que la position de la feuille sur la plante joue un rôle important sur son potentiel de régénération. Sur un milieu MS additionné de kinétine (2,32  $\mu\text{M}$ ) et d'AIB (0,98  $\mu\text{M}$ ), les explants prélevés sur de jeunes feuilles situées au niveau du premier nœud sécrètent abondamment des phénols dont l'oxydation entraîne le brunissement et la mort des explants. Les feuilles situées sur le deuxième et le troisième nœud réagissent bien avec un taux de multiplication de 3,4 en 3 semaines de culture. Quant aux explants foliaires provenant de la feuille située sur le quatrième nœud, leur réponse est tardive, avec des taux de multiplication très faibles. Ils produisent quelques pousses, après 8 semaines, qui meurent par la suite. Les explants prélevés sur les feuilles situées au niveau du cinquième nœud ne présentent aucun potentiel de régénération, ce qui est certainement lié à leur degré de maturité. En général, les jeunes tissus et organes sont plus réactifs que les tissus et organes matures et bien différenciés (Krikorian, 1982).

### **3.3 L'embryogenèse somatique**

Il existe peu d'exemples d'utilisation de l'embryogenèse somatique pour multiplier *J. curcas*. Ils sont tous basés sur la mise en culture d'explants cotylédonaire ou foliaires. Ainsi, Kalimuthu et al. (2007) ont placé des explants cotylédonaire sur milieu MS complété avec du lait de noix de coco ou une combinaison de BA (8,87  $\mu\text{M}$ ) et de kinétine (9,3  $\mu\text{M}$ ). De petits embryons somatiques globulaires commencent à se développer à la surface des explants entre 7 et 8 jours. Chaque explant donne entre 8 et 10 embryons somatiques après 5 semaines. Quant à Jha et al. (2007), ils ont obtenu des cals embryogènes après 4 semaines, sur 56 % de 15 explants foliaires mis en culture sur un milieu MS contenant 9,3  $\mu\text{M}$  de kinétine. La moitié de ces cals embryogènes, remis en culture sur un milieu de prolifération constitué de MS contenant 2,3  $\mu\text{M}$  de kinétine, 1  $\mu\text{M}$  d'AIB et 13,6  $\mu\text{M}$  de sulfate d'adénine, a formé en moyenne, à la périphérie, 58,5 embryons après 6 à 12 semaines. Dans ce milieu, on assiste à la formation d'embryons secondaires le long des pôles racinaires et caulinaire des embryons primaires. Cette formation d'embryons secondaires, attribuée à la synergie entre la kinétine, l'AIB et le sulfate d'adénine, est un avantage du point de vue du temps et du coût de production des plantes (Raemakers et al., 1995). La maturation des embryons somatiques est ensuite réalisée par l'adjonction de 13,6  $\mu\text{M}$



de sulfate d'adénine dans le milieu de prolifération. Mais seuls 10% de ces embryons se développent en plante entière.

En fait, le passage des embryons somatiques à l'état de plantules représente une étape cruciale. Il se fait par le transfert des embryons, au stade torpille, âgés de 14 semaines dans un milieu dit de «conversion» durant 2 semaines pendant lesquelles les pôles caulinaires et racinaires deviennent bien distincts. Au cours des subcultures qui ont lieu tous les 21 jours, les embryons globulaires qui sont dominants prennent la forme de cœur, de torpille puis d'embryons cotylédonaire avec une bipolarité distincte. Les embryons bipolaires sont placés sur MS ½ sans régulateur de croissance, pour achever leur développement, avec la formation d'une tige possédant des feuilles vertes et des racines. Les plantules enracinées sont acclimatées avec un taux de survie de 90 % et transférées au champ (Jha et al., 2007).

### **3.4 Acclimatation des vitroplants**

Les procédés d'acclimatation, qui permettent de passer les plantules du milieu de culture *in vitro* confiné à la culture en serre, ne sont pas fondamentalement différents d'une technique à l'autre. Suivant la méthode de Datta et al. (2007), les tiges enracinées âgées de 12-16 semaines, issues de la culture des nœuds de *J. curcas*, sont retirées du milieu, lavées à l'eau, trempées pendant 1 h dans une solution de fongicide systémique Bavistin à 0,1 % (carbendazime). Elles sont transplantées dans des pots en plastique contenant un mélange de terreau et de vermiculite (1:1). Les pots sont recouverts d'un film de polyéthylène transparent puis placés dans une enceinte contrôlée avec 80 % d'humidité relative et une température de 25-30 °C. Les films plastiques sont retirés après 3-5 semaines et les plants sont transférés en serre (25±2 °C et 50-60 % d'humidité relative) dans des pots contenant du terreau. Sarika and Meenakshi (2009) transfèrent les plantules enracinées sur différents types de substrats constitués par des mélanges : terreau-sable (1:1), vermiculite-sable-sphaigne (1:1:1), fibres de coco décomposées-compost-perlite (1:1:1), compost-terreau-sable (1:1:1). Ils placent ensuite les pots en serre (75 % d'humidité relative et une température de 25±2 °C), pendant 10 jours, sous un filet qui filtre 75 % de la lumière. Les plantules restent ensuite 1 semaine sous serre avant leur

transplantation au champ. Pour les pousses allongées et enracinées provenant des explants cotylédonaire possédant 3 à 4 feuilles, elles sont acclimatées en serre en les plaçant dans des sacs plastiques contenant un mélange stérilisé terre-sable (1:1). Ce mélange est humidifié avec une solution de carbendazime (0,02 %) et les sacs sont recouverts d'un film plastique transparent pour conserver l'humidité. Après 3 à 4 semaines, les plantules sont mises dans des sacs contenant du terreau (Kumar and Reddy, 2010). En général, l'origine du matériel végétal de base et la taille des plantules, déterminent la méthode la mieux appropriée pour l'acclimatation des plantules de *J. curcas*. Cependant, l'acclimatation est toujours réalisée à une température de  $25\pm 2$  °C, pour une humidité relative de 50-75 % et sur des substrats bien aérés.

#### **4 DISCUSSION ET CONCLUSION**

Pour trouver une application au niveau industriel, les protocoles de multiplication doivent être fiables, simples et reproductibles. Ils doivent atteindre deux objectifs majeurs : la conformité des plants produits par rapport aux pieds-mères et un taux de multiplication élevé de manière à être économiquement rentables. En ce qui concerne *J. curcas*, les données bibliographiques montrent que le nombre de pousses régénérées, quel que soit le type d'explant et la technique utilisés, reste assez faible. Si l'on considère le tableau 1, seules les techniques de multiplication conformes par bourgeonnement axillaire, la régénération par culture d'explants de feuilles ou l'embryogenèse somatique sur explants cotylédonaire, permettent d'obtenir des taux de multiplication assez élevés.

Il faut cependant noter que l'embryogenèse somatique présente deux inconvénients. Tout d'abord, il existe une probabilité non négligeable d'apparition de variations somaclonales qui nuisent à la reproduction conforme par rapport aux pieds mères (Dubois, 1989). Cependant, les plants de *J. curcas* obtenus par embryogénèse somatique conserve certaine stabilité génétique Kalimuthu et al. (2007). La technique demande toutefois une étape de recherche des variants en pépinière pour les éliminer. De plus, le développement asynchrone des embryons somatiques constitue un obstacle de taille car il entraîne la perte d'une grande quantité de matériel végétal, immature ou trop développé au moment du prélèvement pour le passage des embryons sur le milieu de maturation (Jha et al., 2007). Dès lors, les techniques de micropropagation par régénération axillaire mériteraient d'être

privilegiées. D'autre part, Deore and Johnson (2008) ont déposé un brevet portant sur le protocole de culture axénique des explants foliaires de *J. curcas*. L'utilisation de cette technique pose un problème en termes économiques et de valorisation. Pour l'instant, la micropropagation par bourgeonnement axillaire semble être la technique à développer, si l'on arrive à diminuer les durées de cycle de culture et améliorer le taux de multiplication pour rentabiliser la production. On peut cependant noter qu'aucun des travaux cités n'a envisagé d'utiliser des explants de racines pour la multiplication végétative. Cet organe a pourtant donné des résultats intéressants pour la plante tropicale *Aeschynomene sensitiva* (Nef-Campa et al., 1996).

**Tableau 1** : Durée, pourcentage de réussite et nombre de pousses obtenues par explant lors de la régénération de *Jatropha curcas* à partir de différents types d'organes – Duration, percentage and number of buds produced by the various explants of *J. curcas*.

Type d'explant	Technique <i>in vitro</i>	Durée (semaines)	Pourcentage régénéré	Nombre de pousses	Références
Apex	Multiplication conforme	2-3	100	6,2	Purkayastha et al., 2010
Nœud (bourgeon axillaire)	Multiplication conforme	4-8	95-100	30,0	Datta et al., 2007
Hypocotyle	Régénération	4-6	67	-	Sujatha et al., 2000
Épicotyle	Régénération	2-4	38	-	Wei et al., 2004
Pétiole	Régénération	4-6	50	-	Sujatha et al., 2000
Feuille	Régénération	4-8	60-90	18,8	Khurana-Kaul et al., 2010 Sujatha et al., 2000
Cotylédon	Embryogenèse somatique	6-8	50-93	26,2	Kumar et al., 2010

Cette analyse bibliographique conduit à penser que les protocoles de production de vitroplants de *J. curcas* sélectionnés demandent encore à être perfectionnés. Il s'agit plus particulièrement d'améliorer les protocoles susceptibles de mettre à la disposition des exploitants de la filière un matériel végétal de plantation homogène adapté aux conditions de culture choisies et performant du point de vue des rendements.

Actuellement, des travaux réalisés à l'Université de Liège-Gembloux Agro-Bio Tech visent à mettre au point un protocole de multiplication *in vitro* de *J. curcas* applicable à l'échelle industrielle. Ces

travaux sont axés sur la production de plants par induction d'agrégats de bourgeons à partir d'explants nodaux. Cette technique ouvre une nouvelle voie pour un accroissement significatif du taux de multiplication. Elle paraît prometteuse du point de vue de ses performances sur le nombre de bourgeons obtenus par subculture.

### Remerciements

Nous remercions le Programme d'Appui Institutionnel et de Développement des Ressources Humaines du Ministère de l'Économie, du Budget, des Comptes Publics, de la Fonction Publique et de la Réforme de l'État de la République Gabonaise ; l'Institut National Supérieur d'Agronomie et de Biotechnologies, Université des Sciences et Techniques de Masuku (USTM-INSAB), Gabon.

### Références bibliographiques

- Achten, W. M. J., Verchot, L., Franken, Y. J., Mathijs, E., Singh, V. P., Aerts, R., and Muys, B. (2008). *Jatropha* bio-diesel production and use. *Biomass and Bioenergy* **32**, 1063-1084.
- Basha, S., and Sujatha, M. (2009a). Genetic analysis of *Jatropha* species and interspecific hybrids of *Jatropha curcas* using nuclear and organelle specific markers. *Euphytica* **168**, 197-214.
- Basha, S. D., and Sujatha, M. (2009b). Inter and intrapopulation variability of *Jatropha curcas* (L.) characterized by RAPD and ISSR markers and development of population-specific SCAR markers. *Euphytica* **156**, 375-386.
- Bhering, L. L., Barrera, C. F., Ortega, D., Laviola, B. G., Alves, A. A., Rosado, T. B., and Cruz, C. D. (2013). Differential response of *Jatropha* genotypes to different selection methods indicates that combined selection is more suited than other methods for rapid improvement of the species. *Industrial Crops and Products* **41**, 260-265.
- Boulay, J. (1993). Culture *in vitro* et ses applications à la culture des plantes carnivores. . In "Bull. Dionée". [http://encyclo.free.fr/pages/in\\_vitro.htm](http://encyclo.free.fr/pages/in_vitro.htm), 5/09/10.
- Cano-Asseleih, L. M. (1986). Chemical investigation of *Jatropha curcas* L. seeds, PhD Thesis, University of London, London, United Kingdom, 290 p.

- Cano-Asseleih, L. M., Plumbly, R. A., and Hylands, P. J. (1989). Purification and partial characterization of the hemagglutination from seeds of *Jatropha curcas* L. *Journal of Food Biochemistry* **13**, 1-20.
- Carvalho, C. R., Clarindo, W. R., Praca, M. M., Araujo, F. S., and Carels, N. (2008). Genome size, base composition and karyotype of *Jatropha curcas* L., an important biofuel plant. *Plant Science* **174**, 613-317.
- Chang-wei, L., Kun, L., You, C., and Yongyu, S. (2007). Floral display and breeding system of *Jatropha curcas* L. *Forestry Studies in China* **9**, 114-119.
- Datta, M. M., Mukherjee, P., Ghosh, B., and Jha, T. B. (2007). *In vitro* clonal propagation of biodiesel plant (*Jatropha curcas* L.). *Current Science* **93**, 1438-1442.
- Dehgan, B. (1984). Phylogenetic significance of interspecific hybridization in *Jatropha* (*Euphorbiaceae*). *Systematic Botany* **9**, 467-478.
- Dehgan, B., and Webster, G. L. (1979). Morphology and infrageneric relationships of the genus *Jatropha* (*Euphorbiaceae*). *University of California Publications in Botany* **74**, 1-73.
- Deore, A., and Johnson, T. (2008). High-frequency plant regeneration from leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L.: an important biodiesel plant. *Plant Biotechnology Reports* **2**, 7-11.
- Domergue, M. (2008). "*Jatropha curcas* L. Rapport de synthèse bibliographique." Cirad, Montpellier, France, 118 p.
- Dubois, J. (1989). "Biotechnologie et amélioration des plantes: plantes vivrières tropicales," John Libbey Eurotext, Paris, France, 151 p.
- Heller, J. (1996). Physic nut. *Jatropha curcas* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops *Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome*. **1**, 1-66.
- Heslop-Harrison, J. S., and Schwarzacher, T. (2007). Domestication genomics and the future for banana. *Annals of Botany* **100**, 1073-1084.
- Jha, T., Mukherjee, P., and Datta, M. (2007). Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn., an important biofuel plant. *Plant Biotechnology Reports* **1**, 135-140.

- Kalimuthu, K., Paulsamy, S., Senthilkumar, R., and Sathya, M. (2007). *In vitro* propagation of the biodiesel plant *Jatropha curcas* L. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* **17**, 137-147.
- Katwal, R. P. S., and Soni, P. L. (2003). Biofuels: an opportunity for socioeconomic development and cleaner environment. *Indian Forester* **129**, 939-949.
- Khurana-Kaul, V., Kachhwaha, S., and Kothari, S. L. (2010). Direct shoot regeneration from leaf explants of *Jatropha curcas* in response to thidiazuron and high copper contents in the medium. *Biologia Planatum* **54**, 369-372.
- Krikorian, A. D. (1982). Cloning higher plants from aseptically cultured tissues and cells. *Biological Reviews* **57**, 151-218.
- Kumar, A., and Sharma, S. (2008). An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.) : A review. *Industrial Crops and Products* **28**, 1-10.
- Kumar, N., and Reddy, M. P. (2010). Plant regeneration through the direct induction of shoot buds from petiole explants of *Jatropha curcas*: a biofuel plant. *Annals of Applied Biology* **156**, 367-375.
- Kumar, N., Vijay Anand, K. G., and Reddy, M. P. (2011). *In vitro* regeneration from petiole explants of non-toxic *Jatropha curcas*. *Industrial Crops and Products* **33**, 146-151.
- Leela, T., Naresh, B., Srikanth Reddy, M., Madhusudhan, N. C., and Cherku, P. D. (2011). Morphological, physico-chemical and micropropagation studies in *Jatropha curcas* L. and RAPD analysis of the regenerants. *Applied Energy* **88**, 2071-2079.
- Lengkeek, A. G., Jaenicke, H., and Dawson, I. K. (2005). Genetic bottlenecks in agroforestry systems. Results of tree nursery surveys in East Africa. *Agroforestry Systems* **63**, 149-155.
- Lopez-Gartner, G., Cortina, H., McCouch, S. R., and Del Pilar Moncada, M. (2009). Analysis of genetic structure in a sample of coffee (*Coffea arabica* L.) using fluorescent SSR markers. *Tree Genetics and Genomes* **5**, 435-446.
- Lu, W. D. (2003). Induction of callus from *Jatropha curcas* and rapid propagation. *Chinese of Applied and Environmental Biology* **9**, 127-130.
- Medza Mve, S. D., Mergeai, G., Baudoin J. P. and Toussaint A. (2010). Amélioration du taux de multiplication *in vitro* de *Jatropha curcas* L. *Tropicultura* **28**, 200-204.

- Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.
- Nef-Campa, C., Chaintreuil-Dongmo, C., and Dreyfus, B. L. (1996). Regeneration of the tropical legume *Aeschynomene sensitiva* Sw. from root explants. *Plant Cell Tissue Organ Culture* **44**, 149-154.
- Nielsen, L. R., Siegismund, H. R., and Hansen, T. (2007). Inbreeding depression in the partially self-incompatible endemic plant species *Scalesia affinis* (Asteraceae) from Galapagos islands. *Evolutionary Ecology* **21**, 1-12.
- Nyamai, D. O., and Omuodo, L. O. (2007). "*Jatropha curcas* : the untapped potential in eastern and central Africa," Vanilla-Jatropha Development Foundation, Nairobi, Kenya, 49 p.
- Openshaw, K. (2000). A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. *Biomass Bioenergy* **19**, 1-15.
- Pamidimarri, D., Singh, S., Mastan, S. G., Patel, J., and Reddy, M. P. (2009). Molecular characterization and identification of markers for toxic and non-toxic varieties of *Jatropha curcas* L. using RAPD, AFLP and SSR markers. *Molecular Biology Reports* **36**, 1357-1364.
- Parsons, K. (2005). *Jatropha* in Africa - Fighting the desert and creating wealth. <http://ecoworld.com/Home/Article2.cfm?tid=367>, 03/04/2010.
- Pavingerova, D. (2009). The influence of thidiazuron on shoot regeneration from leaf explants of fifteen cultivars of *Rhododendron*. *Biologia Plantarum* **53**, 797-799.
- Prabakaran, A. J., and Sujatha, M. (1999). *Jatropha tanjorensis* Ellis and Saroja, a natural interspecific hybrid occurring in Tamil Nadu, India. *Genetic Resources and Crop Evolution* **46**, 213-218.
- Pratibha, M. (2010). Establishment of long-term proliferating shoot cultures of elite *Jatropha curcas* L. by controlling endophytic bacterial contamination. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **100**, 189-197.
- Purkayastha, J., Sugla, T., Paul, A., Solleti, S. K., Mazumdar, P., Basu, A., Mohommad, A., Ahmed, Z., and Sahoo, L. (2010). Efficient *in vitro* plant regeneration from shoot apices and gene transfer by particle bombardment in *Jatropha curcas*. *Biologia Plantarum* **54**, 13-20.

- Raemakers, C. J. J. M., Jacobsen, E., and Visser, R. G. F. (1995). Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. *Euphytica* **81**, 93-107.
- Ratree, S. A. (2004). A preliminary study on Physic nut (*Jatropha curcas* L.) in Thailand *Journal of Biological Sciences* **7**, 1620-1623.
- Ripley, K. P., and Preece, J. E. (1986). Micropropagation of *Euphorbia lathyris* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **5**, 213-218.
- Sarika, S., and Meenakshi, B. (2009). Algal filtrate: a low cost substitute to synthetic growth regulators for direct organogenesis of embryo culture in *Jatropha curcas* (Ratanjyot). *Acta Physiologiae Plantarum* **31**, 1205-1212.
- Schween, G., and Schwenkel, H. G. (2003). Effect of genotype on callus induction, shoot regeneration, and phenotypic stability of regenerated plants in greenhouse of *Primula* ssp. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **72**, 53-61.
- Sharma, S., Kumar, N., and Reddy, M. P. (2011). Regeneration in *Jatropha curcas*: Factors affecting the efficiency of *in vitro* regeneration. *Industrial Crops and Products* **34**, 943-951.
- Singh, A., Reddy, M. P., Chikara, J., and Singh, S. (2010). A simple regeneration protocol from stem explants of *Jatropha curcas*-A biodiesel plant. *Industrial Crops and Products* **31**, 209-213.
- Singh, B., Singh, K., Rejeshwar Rao, G., Chikara, J., Kumar, D., Mishra, D. K., Saikia, S. P., Pathre, U. V., Raghuvanshi, N., Rahi, T. S., and Tuli, R. (2013). Agro-technology of *Jatropha curcas* for diverse environmental conditions in India. *Biomass and Bioenergy* **48**, 191-202.
- Solomon Raju, A. J., and Ezradanam, V. (2002). Pollination ecology and fruiting behaviour in a monoecious species, *Jatropha curcas* L. (*Euphorbiaceae*). *Curr. Sci.* **83**, 1395-1398.
- Stacy, E. A. (2001). Cross-fertility in two tropical tree species. Evidence of inbreeding depression within populations and genetic divergence among populations. *Am. J. Bot.* **88**, 1041-1051.
- Sujatha, G., and Kumari, R. B. D. (2007). High-frequency shoots multiplication in *Artemisia vulgaris* L. using Thidiazuron. *Plant Biotechnol. Rep* **1**, 149-154.
- Sujatha, M., Makkar, H. P. S., and Becker, K. (2005). Shoot bud proliferation from axillary nodes and leaf sections of non-toxic *Jatropha curcas* L. *Plant Growth Regulation* **47**, 83-90.



- Sujatha, M., and Mukta, N. (1996). Morphogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Jatropha curcas*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **44**, 135-141.
- Sujatha, M., Sivaraj, N., and Prasad, M. S. (2000). Biochemical and histological changes during *in vitro* organogenesis in *Jatropha integerrima*. *Biologia Plantarum* **43**, 167-171.
- Sun, Q. B., Li, L. F., Li, Y., Wu, G. J., and Ge, X. J. (2008). SSR and AFLP markers reveal low genetic diversity in the biofuel plant *Jatropha curcas*. *China Crop Sci.* **48**, 1865-187.
- Tatikonda, L., Wani, S. W., and Kannan, S. (2009). AFLP-based molecular characterization of an elite germplasm collection of *Jatropha curcas* L., a biofuel plant. *Plant Sci.* **176**, 505-513.
- Tideman, J., and Hawker, J. S. (1982). *In vitro* propagation of latex producing plants. *Ann. Bot.* **49**, 273-279.
- Wei, Q., Li, J., Zhang, L., Wu, P., Chen, Y., Li, M., Jiang, H., and Wu, G. (2012). Cloning and characterization of a  $\beta$ -ketoacyl-acyl carrier protein synthase II from *Jatropha curcas*. *Journal of Plant Physiology* **169**, 816-824.
- Wei, Q., Lu, W. D., Liao, Y., Pan, S. L., Xu, Y., Tang, L., and Chen, F. (2004a). Plant regeneration from epicotyl explants of *Jatropha curcas* *Plant Physiol. Mol. Biol.* **30**, 475-478.



**CHAPITRE II**

**Amélioration du taux de multiplication *in vitro* de *Jatropha curcas* L.**

S.D. Medza Mve<sup>1\*</sup>, G. Mergeai<sup>1</sup>, J.P Baudoin<sup>1</sup> & A. Toussaint<sup>1</sup>

Publié dans *Tropicultura* 2010, **28**(4), 200-204

*Reçu le 29.09.10 et accepté pour publication le 04.10.10*

Le texte de cet article a été adapté et complété pour répondre aux besoins de la présente thèse.



## Objectifs du chapitre

L'analyse bibliographique réalisée à l'entame des travaux nous a conduit à considérer la nécessité de mettre au point un protocole de micropropagation de *J. curcas* pour la production d'un matériel végétal de plantation homogène adapté aux conditions de culture choisies et aux performances supérieures. La culture *in vitro* est une technique actuellement utilisée pour multiplier rapidement des plantes aux caractères particuliers. Compte tenu du caractère allogame de *J. curcas*, la multiplication sexuée ne peut donner des plantes génétiquement identiques à celles dont les graines sont issues. A ce jour, on constate l'absence de graines d'écotypes stabilisés présentant un certain degré d'homozygotie dont le semis pourrait garantir une homogénéité phénotypique et des caractéristiques agronomiques d'intérêt. Par ailleurs, bien que la multiplication végétative par bouturage permette d'obtenir des individus génétiquement identiques à la plante-mère, cette dernière méthode présente des inconvénients, notamment le développement d'un système racinaire superficiel qui rend les plantes sensibles à la verse avec une moindre résistance à la sécheresse. La micropropagation *in vitro* de *J. curcas* se présente comme une alternative pour une production rapide du matériel végétal de plantation en vue de son exploitation à grande échelle. Le présent chapitre vise l'amélioration du taux de multiplication *in vitro* de *J. curcas* avec la mise au point d'un protocole de micropropagation par bourgeonnement axillaire à partir d'explants nodaux.



## Amélioration du taux de multiplication *in vitro* de *Jatropha curcas* L.

S.D. Medza Mve, G. Mergeai, J.-P Baudoin & A. Toussaint

<sup>1</sup>Université de Liège, Gembloux Agro-Bio Tech, Unité de Phytotechnie Tropicale et Horticulture, 2, Passage des Déportés, BE-5030 Gembloux, Belgique.

### Résumé

Dans le but d'améliorer le taux de multiplication *in vitro* (nombre de pousses/explant/subculture) de *Jatropha curcas* L., des nœuds axillaires prélevés sur de jeunes plantes de deux accessions de cette espèce, originaires du Cameroun et du Sénégal, sont cultivés pendant trois semaines sur un milieu MS supplémenté de 8,87  $\mu\text{M}$  de BAP; 4,92  $\mu\text{M}$  d'AIB, ainsi que de 30  $\text{g.l}^{-1}$  de saccharose à pH 5,7 $\pm$ 0,1; et solidifié avec 0,7% d'agar. Les pousses obtenues à partir de chaque explant initial sont ensuite transférées sur des milieux de prolifération (MP) constitués du milieu MS complémenté de 2,21 à 8,9  $\mu\text{M}$  de BA ou de 2,21 à 8,9  $\mu\text{M}$  de kinétine en combinaison avec 2,46  $\mu\text{M}$  d'AIB. Chaque combinaison est complétée avec 33,12  $\mu\text{M}$  de sulfate d'adénine; 82,92  $\mu\text{M}$  de glutamine et 30  $\text{g.l}^{-1}$  de saccharose. Les meilleurs taux de multiplication sont obtenus dans le milieu MP avec le milieu MS contenant 6,65  $\mu\text{M}$  de BA et 2,46  $\mu\text{M}$  d'AIB, soit une moyenne de 8,27 $\pm$ 1,27 et 7,89 $\pm$ 1,13 pousses par explant au cours des 7 premières subcultures (3 semaines/subculture), respectivement pour l'accession camerounaise et sénégalaise. Ce milieu est également celui qui permet globalement la meilleure croissance en hauteur des tiges. Les tiges feuillées obtenues peuvent être enracinées sur un milieu contenant la moitié des éléments minéraux majeurs de MS additionné de 5,7  $\mu\text{M}$  d'AIB; 1,5% de saccharose et solidifié avec 0,7% d'agar, puis acclimatées avec un taux de survie de 97%. Ces résultats permettent d'envisager la création d'unités de multiplication industrielle de plants à la fois homogènes et performants issus de clones élites de *J. curcas*.

**Mots-clés:** *Jatropha curcas* L. - Taux de multiplication - Accessions - Culture *in vitro* - Explants nodaux Cameroun - Sénégal - Belgique.

## Summary

### Improvement of the rate of *in vitro* multiplication of *Jatropha curcas* L.

In order to improve the *in vitro* multiplication rate (number of shoots/explant/subculture) of *Jatropha curcas* L. axillary nodes taken from young plants of two accessions of this species (originating from Cameroon and Senegal) have been cultivated for three weeks on a MS medium supplemented with 8.87  $\mu\text{M}$  BAP, 4.92  $\mu\text{M}$  IBA, and 30  $\text{g.l}^{-1}$  sucrose at pH  $5.7\pm 0.1$ , and solidified with 0.7% agar. The shoots obtained from each original explant were then transferred to proliferation media (PM) consisting of MS medium supplemented with 2.21 to 8.9  $\mu\text{M}$  BA or 2.21 to 8.9  $\mu\text{M}$  kinetin in combination with 2.46  $\mu\text{M}$  IBA. Each combination was completed with 33.12  $\mu\text{M}$  adenine sulfate, 82.92  $\mu\text{M}$  of glutamine and 30  $\text{g.l}^{-1}$  sucrose. The best multiplication rate was obtained for the PM medium containing 6.65  $\mu\text{M}$  BA and 2.46  $\mu\text{M}$  AIB. On this medium  $42.72\pm 3.22$  and  $38.15\pm 4.7$  shoots/explant were obtained respectively for the accessions from Cameroon and Senegal after 6 weeks of culture, and the mean multiplication rates were  $8.27\pm 1.27$  (accession from Cameroon) and  $7.89\pm 1.13$  (accession from Senegal) shoots per explant during the 7 following subcultures (3 weeks/subculture). This medium was also the one that allowed the best overall growth in shoot height. Leafy shoots obtained have been rooted in a medium containing half of the major mineral components of MS supplemented with 5.7  $\mu\text{M}$  IBA, 1.5% sucrose and solidified with 0.7% agar, then acclimated with a survival rate of 97%. These results allow considering the establishment of industrial units of plantlet multiplication from elite clones of *J. curcas*.

**Keywords:** *Jatropha curcas* L.- Rate multiplication - Accessions - *In vitro* culture - Nodal explants  
Cameroon - Senegal - Belgium

## 1. Introduction

Les politiques en faveur du développement durable et la récente crise énergétique mondiale créent une opportunité de valorisation des huiles végétales comme biocarburant à travers le monde (3). Parmi les cultures potentielles, *Jatropha curcas* suscite l'intérêt de divers organismes de développement dans les régions tropicales et subtropicales en raison de sa capacité d'adaptation même dans les zones



semi-arides (1). Il est considéré comme une source potentielle non-comestible de biocarburants (16). Sa multiplication par semis ainsi que la transplantation au champ de plantes sauvages spontanées présentent l'inconvénient de générer des plantes hétérogènes dont la teneur en huile des graines varie de 4 à 40%. Le bouturage de tiges fournit des clones aux performances homogènes mais dont les plantes présentent un système racinaire superficiel qui les rend sensibles à la verse et à la sécheresse, ce qui limite leur possibilité d'établissement sur les sols pauvres. De plus, leur durée de vie est réduite à 10-15 ans (2, 9). La culture *in vitro* est l'une des voies potentielles pour la production rapide et à grande échelle du matériel végétal de plantation. Cette méthode présente l'avantage de pouvoir produire des plantes homogènes, du point de vue morphologique et agronomique notamment en ce qui concerne les rendements (4). Plusieurs auteurs ont travaillé sur la régénération de *J. curcas* à partir des explants nodaux. Les taux de multiplication obtenus sont restés relativement faibles, donc économiquement non rentables. La présente étude se focalise sur l'amélioration du taux de multiplication *in vitro* de *J. curcas* par régénération à partir des explants nodaux. Elle vise à développer un protocole de production massive d'un matériel de plantation homogène et performant utilisable à l'échelle industrielle.

## **2. Matériel et méthodes**

### **Matériel végétal et stérilisation**

Deux lots de graines récoltées dans les campagnes de Minkang au Sud Cameroun et Diobass au Sénégal constituent le matériel de départ. Ces deux lots sont semés en cellules conditionnées à l'Unité de Phytotechnie Tropicale et Horticulture de Gembloux Agro-Bio Tech (Université de Liège). Les conditions de culture sont les suivantes : 16 h de lumière par jour,  $27\pm 2^\circ\text{C}$  de température,  $80\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  d'intensité lumineuse et 50% d'humidité relative. Après deux mois, les plantules possèdent au moins quatre nœuds. Les essais d'amélioration du taux de multiplication *in vitro* sont réalisés à partir de nœuds prélevés sur ces jeunes plantes. Les explants nodaux utilisés sont collectés à partir du troisième nœud en partant de la base. Le bourgeon apical est éliminé. Ces explants sont lavés dans une solution de Dettol 5%, trempés dans l'alcool à 70% pendant 30 s, et ensuite immergés dans une solution d'hypochlorite de calcium à 10% pendant 30 mn. Enfin, trois rinçages successifs sont

effectués à de l'eau distillée stérile, dont le dernier en agitation pendant une minute sous une hotte à flux laminaire stérile, pour éliminer les traces de substances désinfectantes.

### **Phase de culture**

Le milieu de mise en culture des explants (MC) est le milieu de Murashige et Skoog (1962) [MS] (8) contenant 8,87  $\mu\text{M}$  de BAP, 4,92  $\mu\text{M}$  d'AIB, et de 30  $\text{g.l}^{-1}$  de saccharose (milieu MC). Après avoir ajusté le pH à  $5,7\pm 0,1$ , ce milieu est solidifié avec 0,7% d'agar (Select Agar). Les nœuds stérilisés sont déposés sur du papier stérile et réduits, grâce à des instruments stériles, à une longueur de 0,8 à 1 cm; puis placés dans les pots de 50 ml contenant chacun 20 ml de milieu.

### **Phase de multiplication et élongation**

Après trois semaines, les pousses obtenues sur le milieu de mise en culture sont séparées de l'explant initial et transférées sur les milieux de prolifération (MP) constitués du milieu MS complété de 2,21 à 8,9  $\mu\text{M}$  de BA ou de 2,21 à 8,9  $\mu\text{M}$  de kinétine en combinaison avec 2,46  $\mu\text{M}$  d'AIB. Chaque combinaison est complétée avec 33,12  $\mu\text{M}$  de sulfate d'adénine; 82,92  $\mu\text{M}$  de glutamine et 30  $\text{g.l}^{-1}$  de saccharose. Les nouvelles pousses régénérées sont repiquées sur le même milieu MP frais, toutes les trois semaines, ou placées en milieu d'élongation, pendant quatre semaines, sur milieu MS complété de 2,21  $\mu\text{M}$  BA et 5,70  $\mu\text{M}$  d'AIA, 3% de saccharose et solidifié avec 0,7% d'agar.

### **Phase d'enracinement et d'acclimatation**

Pour l'enracinement, les tiges feuillées issues du milieu de prolifération sont placées sur un milieu dépourvu de régulateur de croissance pendant deux semaines. Elles sont ensuite transférées sur le milieu MS contenant la moitié des éléments majeurs ( $\text{MS } \frac{1}{2}$ ), complété de 5,7  $\mu\text{M}$  d'AIB, 15  $\text{g.l}^{-1}$  de saccharose et solidifié avec 0,7% d'agar. Les plantules sont d'abord placées pendant quatre jours dans l'obscurité totale, puis soumises à une photopériode de 16 h durant quatre semaines.

Les pousses enracinées sont lavées à l'eau distillée, pour éliminer les résidus de milieu. Elles sont repiquées dans des pots contenant du terreau commercial et placées dans des cellules conditionnées

avec 50-60% d'humidité relative, 16 h de photopériode,  $80 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  d'intensité lumineuse et  $27\pm 2^\circ\text{C}$  de température. Les pots sont recouverts d'un film plastique transparent pendant deux semaines. Les plantules sont ensuite laissées à l'air libre dans les cellules durant deux semaines supplémentaires avant d'être transférées en serre.

### **Stérilisation des milieux de culture et conditions de culture**

Les milieux de mise en culture, de prolifération et d'enracinement sont autoclavés pendant 15 mn à  $121^\circ\text{C}$  sous une pression de 1,02 bar. Les pots cultivés sont maintenus en chambre de culture sous  $27\pm 2^\circ\text{C}$  de température, 50-60% d'humidité relative, une photopériode de 16 h et une intensité lumineuse de  $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

### **Analyse statistique**

Les essais sont menés en blocs aléatoires complets pour évaluer l'influence de l'accession et du milieu de prolifération sur le nombre de pousses obtenues par explant nodal après six semaines d'une part, et d'autre part, sur l'influence de l'accession, du milieu de prolifération et la subculture sur le taux de prolifération des trois meilleurs milieux. Les observations portent respectivement sur le nombre de pousses obtenues par explant nodal sur le milieu de prolifération après six semaines et sur le taux de multiplication qui représente le nombre de pousses régénérées/explant nodal/subculture après trois semaines. L'unité expérimentale est constituée par un nœud.

Concernant le nombre de pousses régénérées après 6 semaines, le dispositif expérimental, est constitué de deux facteurs : le milieu de prolifération, un facteur fixe quantitatif (8 objets) et l'accession, un facteur fixe qualitatif (2 objets). Les données sont ensuite soumises à une analyse de la variance à deux facteurs (modèle croisé fixe) avec 16 populations aléatoires, simples, indépendantes et normales (Ryan et Joiner, valeur de  $P < 0,05$ ) de même variance (Test de Levene).

Pour l'évolution du taux de multiplication au cours des subcultures, on a trois facteurs : le milieu de prolifération, un facteur fixe quantitatif (3 objets) ; l'accession, un facteur fixe qualitatif (2 objets) et la subculture, un facteur qualitatif (7 objets). Les données sont également soumises à une analyse de la

variance à trois facteurs (modèle croisé mixte) avec 42 populations aléatoires, simples, indépendantes et normales de même variance (test de Levene). Les données sont représentées par la moyenne  $\pm$  l'erreur standard.

L'analyse de la variance est réalisée par le logiciel Minitab 15 Statistical Software. Les moyennes sont obtenues sur 3 répétitions (15 explants/répétition). Celles qui sont significativement différentes sont soumises au Test de Duncan ( $\alpha=0,05$ ).

### 3. Résultats

Les deux accessions de *J. curcas* présentent 100% de débourrement des explants nodaux mis en culture sur MC au bout d'une semaine. Durant cette période, les nœuds, prélevés sur des parties bien lignifiées des plantes-mères, exsudent abondamment des polyphénols au niveau de leur surface de coupe. L'oxydation de ces polyphénols entraîne le noircissement du milieu de culture et le brunissement de la base des explants.

Les pousses feuillées issues de MC (Figure 1a) sont isolées de l'explant initial après trois semaines et transférées sur les milieux de prolifération (Figure 1b) pour donner naissance à de nouvelles pousses par bourgeonnement axillaire (Figure 1c).

Le nombre de pousses produites par explant sur MP varie fortement en fonction de la balance hormonale. Les combinaisons BA-AIB sont les plus performantes sur l'induction du bourgeonnement axillaire et la multiplication des pousses. Le milieu MP3 (6,65  $\mu$ M de BA et 2,46  $\mu$ M d'AIB) est optimal pour *J. curcas*. Il permet la régénération de  $42,7 \pm 4,96$  et  $38,1 \pm 5,53$  pousses/explants, respectivement pour l'accession camerounaise et sénégalaise après 6 semaines (Tableau 1). Par rapport au nombre de pousses obtenues, on observe une interaction très hautement significative entre les milieux MP et les accessions de *J. curcas* mises en culture avec une P-valeur=0,004 (Tableau 2).

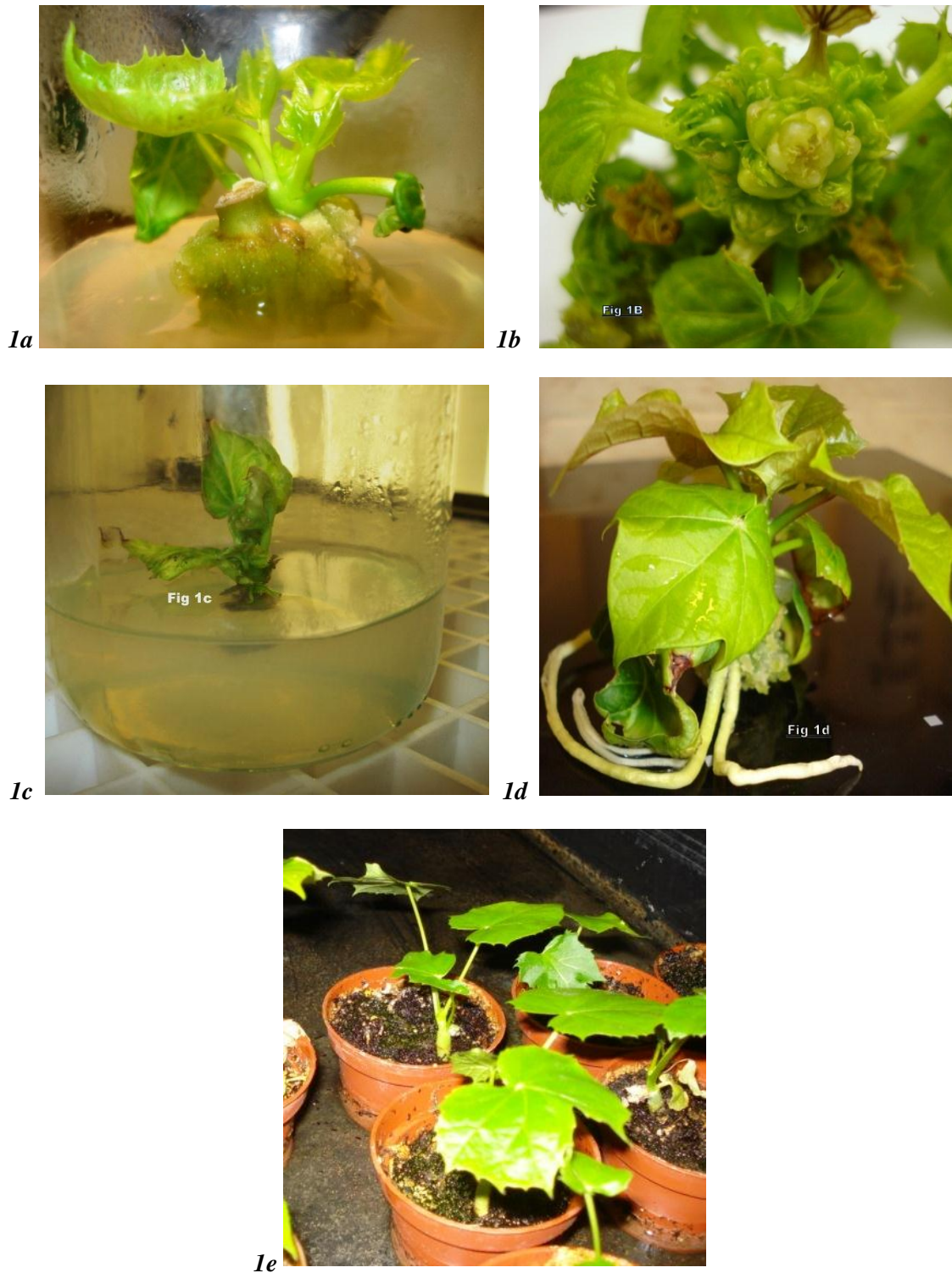
Quant à l'association kinétine-AIB, la moyenne maximale de pousses formées par explant durant cette même période, pour les deux accessions, est seulement de 8,05 sur MP7 (6,65  $\mu$ M de kinétine et 2,46  $\mu$ M d'AIB).

Le Tableau 3 reprend les moyennes des taux de multiplication obtenus sur les trois meilleurs milieux au cours des 7 premières subcultures. Le taux de multiplication représente le nombre moyen de pousses régénérées par explant et par subculture toutes les trois semaines. Il est plus élevé dans les milieux MP3, MP4 et MP7. Le meilleur taux est observé sur le milieu MP3 contenant 6,65  $\mu$ M de BA. Ce taux est respectivement de  $8,4\pm 2,3$  pousses/explant/subculture pour l'accession camerounaise et  $7,9\pm 2,3$  pousses/explant/subculture pour l'accession sénégalaise.

Sur le milieu MP7 qui contient la même concentration de kinétine, ce taux n'est que de  $2,7\pm 0,9$  pousses/explant/subculture (accession camerounaise) et  $2,5\pm 1,2$  pousses/explant/subculture (accession sénégalaise). Il existe une interaction très hautement significative entre le milieu de prolifération et les accessions de *J. curcas* sur le nombre de pousses obtenues durant la phase de prolifération.

On observe une différence très hautement significative entre les trois meilleurs milieux MP, les accessions et les différentes subcultures (P-valeur=0,000). Il n'existe pas d'interaction entre les milieux MP et les accessions d'une part et entre les accessions et les subcultures d'autre part avec les P-valeur respectives de 0,136 et 0,147 (Tableau 4).

Il existe une interaction très hautement significative entre le milieu de prolifération, les subcultures et les accessions de *J. curcas* sur le nombre de pousses obtenues dans le milieu de prolifération. L'interaction est également très hautement significative (P-valeur = 0,000) entre les milieux MP, les accessions de *J. curcas* et les subcultures. Le milieu contenant la BA donne les meilleurs résultats en élongation des pousses. L'accession sénégalaise croît plus vigoureusement, avec une taille moyenne de  $1,56\pm 0,11$  cm, contre  $1,11\pm 0,09$  cm pour l'accession camerounaise, sur MS supplémenté avec 8,9  $\mu$ M de BA. Avec la même concentration de kinétine, on obtient des pousses longues de  $1,16\pm 0,07$  cm pour l'accession sénégalaise et  $1,22\pm 0,08$  cm pour la camerounaise.



**Figure 1: Multiplication in vitro de *J. curcas*.**

- 1a. Isolement et mise en culture de 3 semaines d'un bourgeon axillaire en croissance sur milieu MS avec  $8,87 \mu\text{M}$  BA et  $4,92 \mu\text{M}$  AIB [MC];
- 1b. Développement des bourgeons axillaires sur un explant âgé de 3 semaines cultivé sur le milieu de multiplication MP3;
- 1c. Pousse feuillée âgée de 3 semaines prête à l'enracinement sur milieu de multiplication MP6;
- 1d. Pousse enracinée sur MS/2 contenant  $1,5 \text{ g.l}^{-1}$  de saccharose,  $5,7 \mu\text{M}$  d'AIB;
- 1e. plantules enracinées acclimatées après 6 semaines.

**Tableau 1 :** Nombre de pousses obtenues à partir d'un nœud non lignifié de *J. curcas*, après six semaines de culture sur le milieu de prolifération (MP) en fonction des différentes combinaisons de phytohormones

	BA (μM)	AIB (μM)	KIN (μM)	Nombre de pousses/explant et par accession		Longueur de pousse par accession (cm)	
				camerounaise	sénégalaise	camerounaise	sénégalaise
MP1	2,21	2,46		2,0±1,10a	1,9±0,67a	0,9±0,10a	1,5±0,15e
MP2	4,43	2,46		4,6±0,96a	3,9±1,058a	1,3±0,12c	1,3±0,12cde
MP3	6,65	2,46		42,7±4,96c	38,1±5,53d	1,3±0,12ce	1,3±0,12cd
MP4	8,90	2,46		18,7±4,33b	15,9±3,76b	1,1±0,09b	1,6±0,11e
MP5		2,46	2,21	1,7±0,65a	1,3±0,71a	0,5±0,02a	0,6±0,03a
MP6		2,46	4,43	5,8±1,48a	5,4±1,22a	0,7±0,06 a	0,7±0,06a
MP7		2,46	6,65	7,7±2,08a	8,4±2,69a	0,6±0,05 a	1,3±0,07cde
MP8		2,46	8,90	4,0±1,28a	3,4±1,64a	1,2±0,08c	1,2±0,07bd

Milieu MS supplémenté de différentes concentrations de cytokinines avec 2,46 μM d'AIB sur MS complété avec 33,12 μM de sulfate d'adénine; 82,92 μM de glutamine et 30 g.l<sup>-1</sup> de saccharose. Données représentées par la moyenne ±SE sur trois répétitions avec 15 explants par répétition. Les moyennes des colonnes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes, Test de Duncan (α= 0,05). Données représentées par la moyenne ± l'erreur standard.

**Tableau 2:** Analyse de la variance pour le nombre de pousses obtenues par accession et sur les milieux de prolifération MP (population normale, test de normalité de Ryan et Joiner valeur de P<0,01<0,05)

Source	DF	Somme des carrés	moyen	CM	F	P
Milieu MP	7	36354,8		5193,5	739,58	0,000
Accession	1	77,5		77,5	11,04	0,001
Milieu d'induction*Accession	7	151,5		21,6	3,08	0,004
Erreur	224	15173,0		7,0		
Total	239	38156,7				

$$S = 2,64996 \text{ R carré} = 95,88 \% \text{ R carré (ajusté)} = 95,60 \% \\ (F_{\text{obs}}(7, 224) = 4,34, F_{0,95} = 2,03, P\text{-valeur} = 0,004 < 0,05)$$

On observe également pour tous les milieux comparés la formation d'un cal de couleur verdâtre à la base des pousses feuillées. Cette production de cal est plus abondante sur les milieux contenant la BA que sur ceux contenant la kinétine.

**Tableau 3:** Evolution du taux de multiplication sur les trois meilleurs milieux de multiplication en fonction de la subculture et des accessions de *J. curcas* d'origine camerounaise et sénégalaise, au cours des 7 premières subcultures réalisées toutes les trois semaines

Milieu	Accession	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	Moy
MP3	Camerounaise	7,7±0,8 <sup>a</sup>	8,2±0,3 <sup>a</sup>	8,9±0,4 <sup>a</sup>	9,0±0,5 <sup>a</sup>	8,1±0,0 <sup>a</sup>	8,7±0,5 <sup>a</sup>	8,0±0,5 <sup>a</sup>	8,4±2,3 <sup>a</sup>
	Sénégalaise	7,6±0,7 <sup>a</sup>	7,6±0,7 <sup>a</sup>	8,6±0,3 <sup>a</sup>	8,1±0,8 <sup>a</sup>	8,1±0,2 <sup>a</sup>	7,4±0,9 <sup>a</sup>	7,7±0,6 <sup>a</sup>	7,9±2,3 <sup>a</sup>
MP4	Camerounaise	4,3±0,7 <sup>b</sup>	4,0±1,0 <sup>b</sup>	4,0±1,8 <sup>b</sup>	5,0±0,0 <sup>b</sup>	6,2±1,1 <sup>b</sup>	4,9±0,3 <sup>b</sup>	5,1±0,0 <sup>b</sup>	4,8±1,8 <sup>b</sup>
	Sénégalaise	3,9±0,6 <sup>b</sup>	4,1±0,4 <sup>b</sup>	4,8±0,3 <sup>b</sup>	4,4±0,1 <sup>b</sup>	5,6±0,1 <sup>b</sup>	4,9±0,4 <sup>b</sup>	5,0±0,5 <sup>b</sup>	4,5±1,2 <sup>b</sup>
MP7	Camerounaise	2,4±0,3 <sup>c</sup>	2,7±0,0 <sup>b</sup>	3,0±0,3 <sup>c</sup>	2,7±0,02	3,0±0,32	2,6±0,1 <sup>c</sup>	2,6±0,2 <sup>c</sup>	2,7±0,9 <sup>c</sup>
	Sénégalaise	2,1±0,2 <sup>c</sup>	2,0±0,4 <sup>c</sup>	2,0±0,3 <sup>c</sup>	3,5±1,1 <sup>cb</sup>	2,0±0,4 <sup>cb</sup>	3,0±0, <sup>c</sup>	3,0±0,4 <sup>cb</sup>	2,5±1,2 <sup>c</sup>

Données représentées par la moyenne du taux de multiplication (nombre de pousses par explant par subculture toutes les trois semaines) sur trois répétitions avec 15 explants par répétition. S: Subculture ; Moy: taux de multiplication moyen des sept premières subcultures (moyenne ± SE). Les moyennes des colonnes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes, Test de Duncan ( $\alpha = 0,05$ ).

**Tableau 4 :** Analyse de la variance du taux de multiplication en fonction du milieu de prolifération, l'accession de *J. curcas* et la subculture

Source	DF	Somme des carrés	moyen	CM	F	P
MP	2	3305,6		1652,8	1604,70	0,000
Accession	1	21,5		21,5	20,70	0,000
Subculture	6	47,6		7,9	7,70	0,000
MP * Accession	2	4,1		2,1	2,00	0,136
MP * Subculture	12	30,4		2,5	2,46	0,004
Accession* Subculture	6	9,8		1,6	1,59	0,147
MP * Accession* Subculture	12	53,6		4,5	4,34	0,000
Erreur	588	605,6		1,0		
Total	629	4078,4				

S = 1,01487 R carré = 85,15 % R carré (ajust) = 84,12 % (Il y a une interaction ( $p=0,000$ ) entre PM, l'accession et la subculture)  
 $(F_{obs}(12, 588)=4,34, F_{0,95}= 1,77 ; P\text{-valeur}=0,000 < 0,05)$

Les pousses feuillées sont transférées sur le milieu d'enracinement durant 4 semaines (Figure 1d). Elles commencent à produire des racines après 12 jours. À la quatrième semaine, les pousses enracinées portent en moyenne 5 racines. Celles-ci ne développent pas de racines secondaires. Les plantules enracinées sont lavées et transplantées dans du terreau commercial puis placées en cellule conditionnées. Les vitroplants de *J. curcas* perdent les racines formées *in vitro* et de nouvelles ébauches racinaires apparaissent à leur base après deux semaines. Les vitroplants ont pu être acclimatés avec un pourcentage de survie de 97% (Figure 1e).



#### 4. Discussion

Le débourrement de l'ensemble des nœuds mis en culture s'est réalisé après 5 jours. Sujatha et Mukta (15) ont également obtenu un bourgeonnement axillaire, cinq jours après la mise en culture d'une variété de *J. intergerrima* Jacq originaire de l'Uthar Pradesh (Inde). Les travaux réalisés par Purkayastha (11) sur la multiplication *in vitro* de *J. curcas* à partir des apex ont montré que la régénération à partir de ce type d'explants était induite après 7 jours.

Les polyphénols produits au niveau des surfaces de coupe sont oxydés par la polyphénol oxydase (PPO), une enzyme nucléaire contenant du cuivre et largement distribuée dans les espèces végétales (7, 10). Ces composés phénoliques qui sont oxydés et transformés en quinones hautement toxiques, qui entraînent le brunissement des explants, peuvent être à l'origine des nécroses, voire de l'intoxication du matériel végétal mis en culture. Ils inhibent l'activité enzymatique et affectent négativement l'organogénèse des explants (5, 10). Dans notre étude, l'ensemble des bourgeons obtenus s'est développé en pousses feuillées après trois semaines, sans présenter de nécroses, ni de brunissement des feuilles. L'absence d'auto-intoxication des explants par les polyphénols oxydases serait certainement liée au fait que le prélèvement des nœuds a été effectué sur des pieds-mères très jeunes, qui ne synthétisent que peu de composés polyphénoliques.

Le nombre moyen de pousses régénérées au bout de 6 semaines est supérieur comparativement à celui obtenu par d'autres auteurs. Datta *et al.* (1) ont régénéré  $30,8 \pm 5,5$  pousses/explants après 6 semaines sur leur milieu optimal, MS additionné à  $2,3 \mu\text{M}$  de kinétine ;  $0,5 \mu\text{M}$  d'AIB et  $27,8 \mu\text{M}$  de sulfate d'adénine. Les travaux menés par Sujatha *et al.* (15), ont permis d'obtenir de  $10,0 \pm 4,2$  à  $12,3 \pm 1,7$  pousses par explant sur la même période, avec des nœuds initialement cultivés sur MS contenant  $4,5 \mu\text{M}$  de TDZ et repiqués sur MS supplémenté de  $4,9 \mu\text{M}$  d'IBA et  $8,9 \mu\text{M}$  de BA. En considérant les données de l'accession camerounaise et comparativement aux travaux des deux équipes citées ci-dessus, nous obtenons une augmentation de 38,7% et 32,7% du nombre de pousses formées après 6 semaines par rapport aux résultats respectifs de la première et de la deuxième équipe.

La présence de la BA semble favoriser la multiplication des pousses chez *J. curcas*, ce qui confirme les résultats de Ripley et Preece (13). Ces derniers ont démontré que, parmi les cytokinines, la BA joue un rôle important dans l'initiation du bourgeonnement adventif et la prolifération de plusieurs plantes de la famille des Euphorbiacées. Les concentrations élevées de cytokinines dans le milieu de prolifération entraînent une baisse du nombre de pousses formées. Par régénération à partir des explants foliaires, Khurana-Kaul *et al.* (6) ont observé une décroissance du nombre de pousses formées sur MS à partir de 13,33  $\mu\text{M}$  de BAP et 13,63  $\mu\text{M}$  de TDZ.

Bien que le taux de multiplication ne soit pas significativement différent entre les deux accessions mises en culture dans chaque milieu pris individuellement, la capacité des explants à régénérer des plantes entières serait liée à leur teneur *in vivo* en cytokinines et auxines endogènes. La variabilité de réponses aux différentes cytokinines serait due aux différences chimiques et structurelles qui existent chez les génotypes testés (5, 15). Warakagoda et Subasinghe (17) ainsi que Sujatha *et al.* (15) ont obtenu un taux de multiplication de 6,6 sur *J. curcas* avec 8,87  $\mu\text{M}$  de BA ou de kinétine, et 4,64  $\mu\text{mol}$  AIB. L'augmentation du taux de multiplication moyen à plus de 8 pousses/explant/subculture de trois semaines résulterait de l'action combinée des phytohormones et des suppléments présents dans le milieu à savoir le sulfate d'adénine et la glutamine. Le sulfate d'adénine joue un rôle important dans l'organogénèse. En synergie avec la BA, il stimule la croissance des cellules et favorise la formation des pousses (12). La glutamine, quant à elle, contribue à l'augmentation du nombre de pousses tout en contrôlant la formation et la chute des feuilles (12, 14).

La taille des pousses semble augmenter proportionnellement avec la croissance de la concentration de cytokinine dans le milieu contenant la BA. Singh *et al.* (14) ont souligné le rôle important joué par la BA en combinaison avec les auxines dans l'élongation de *J. curcas*. La production abondante de cals dans les milieux contenant la BA corrobore les résultats obtenus par Sujatha *et al.* (15) qui ont montré que la présence de BA dans un milieu de culture entraîne la formation de cals chez *J. curcas*. Datta *et al.* (1) ont aussi rapporté la formation de cals à la base des pousses feuillées obtenues à partir des explants d'hypocotyle, de pétioles et de feuilles de *J. curcas* sur MS supplémenté avec la BA et

l'AIB. Cette production de cals, qui doit être évitée dans le cadre d'une multiplication de type conforme, n'a toutefois pas donné lieu à la régénération de pousses.

## 5. Conclusion

L'étude a permis d'améliorer sensiblement le taux de multiplication *in vitro* de *J. curcas*. Le meilleur taux, qui s'élève à  $8,3 \pm 0,4$  pousses/explant au cours des 7 premières subcultures de 3 semaines, a été obtenu sur MS contenant  $6,65 \mu\text{M}$  de BA et  $2,46 \mu\text{M}$  d'AIB, supplémenté de  $33,12 \mu\text{M}$  de sulfate d'adénine;  $82,92 \mu\text{M}$  de glutamine, 3% de saccharose et solidifié avec de l'agar à 0,7%. Les plantules obtenues ont pu être enracinées et acclimatées. Les plantes produites sont morphologiquement homogènes et ne présentent pas d'anomalies visuelles.

## Références Bibliographiques

1. Datta M.M., Priyanka M., Biswajit G. & Timir Baran J., 2007, *In vitro* clonal propagation of biodiesel plant (*Jatropha curcas* L.). Current Science, 93,10, 1438-1442.
2. Heller J., 1996, Physic Nut *Jatropha curcas* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. IPGRI, Rome, Italy, 66 p.
3. Jayasingh M., 2004, The use of biodiesel by the Indian railways . In: N.G. Hegde, J.N. Daniel & S. Dhar (editors), *Jatropha* and other perennial oilseed crops, BAIF Development Research Foundation, Pune India, 31-33.
4. Jha T.B., Mukherjee P. & Datta M.M., 2007, Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn, an important biofuel plant. Plant Biotechnology Reports, 1, 3, 135-140.
5. Kim J.Y., Seo S.Y., Kim S.K., Sung S.K., Song K.J., An G. & Kim W.T., 2001, Two polyphenol oxydase are differentially expressed during vegetative and reproductive development and in response to wounding in the Fuji apple. Plant Science. 161, 6, 1145-1152.
6. Khurana-Kaul V., Kachhwaha S. & Othari S.L., 2010, Direct shoot regeneration from leaf explants of *Jatropha curcas* L. in response to Thidiazuron and high copper contents in the medium.

Biologia Plantarum, 54, 2, 369-372.

7. Lobreaux S., Thoiron S. & Briat J.F., 1995, Induction of ferritin synthesis in maize leaves by an iron-mediated oxidative stress. *Plant Journal*, 8, 443-448.
8. Murashige T. & Skoog F., 1962, A revised medium for rapid growth and biossays whith tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15, 173-497.
9. Nyamai D.O., Omuodo L.O., Esilaba A.O., Aucha J.A., Obonyo C., Otieno G., Kathuku A.N., Olang H. & Adhiambo C., 2007, *Jatropha curcas* L. - the untapped potential in Eastern and Central Africa: production and utilization manual. World Agroforestry Centre : Nairobi, 58 p.
10. Ozyigit I.I., Kahraman M.V. & Ercan O., 2007, Relation between explants age, total phenols and regeneration response of tissue cultured cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *African Journal of Biotechnology* 6, 1, 3-8.
11. Purkayastha J., Pugla T., Paul A., Solleti S.K., Mazumdar P., Basu A., Mohommad A., Ahmed Z. & Sahoo L., 2010, Efficient *in vitro* plant regeneration from shoot apices and gene transfer by particle bombardment in *Jatropha curcas*. *Biologia Plantarum*, 54, 1, 13-20.
12. Raha S. & Roy S.C., 2001, *in vitro* plant regeneration in *Holarrhena antidysenterica* Wall., through high frequency axillary shoot proliferation. *In Vitro Cellular a Developmental Biology Plant*, 37, 232-236.
13. Ripley K.P. & Preece J.E., 1986, Micropropagation of *Euphorbia lathyris* L. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*, 5, 213-218.
14. Singh R.A., Reddy M.P, Chikara J. & Singh S., 2010, A simple regeneration protocol from stem explants of *Jatropha curcas* L. - A biodiesel plant. *Industrial Crops & Products*, 31, 209-213.
15. Sujatha M., Makkar H.P.S. & Becker K., 2005, Shoot bud proliferation from axillary nodes and leaf sections of non-toxic *Jatropha curcas* L. *Plant Growth Regulation*, 47, 83-90.

16. Sujatha M. & Mukta N., 1996, Morphogenesis and plant regeneration from tissue culture of *Jatropha curcas*. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 44, 135-141.
17. Warakagoda, P.S. & Subasinghe S., 2009, *In vitro* culture establishment and shoot proliferation of *Jatropha curcas* L. *Tropical Agricultural Research & Extension* 12, 77-80.



### CHAPITRE III

#### ***In vitro* micropropagation of *Jatropha curcas* L. from bud aggregates**

Samson Daudet Medza Mvé<sup>1</sup>, Guy Mergeai<sup>1</sup>, Philippe Druart<sup>2</sup>, Jean Pierre Baudoin<sup>1</sup>, André Toussaint<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Liège University-Gembloux Agro-Bio Tech, Unité de Phytotechnie tropicale et Horticulture. Passage des Déportés, 2 BE-5030 Gembloux (Belgique)

<sup>2</sup> CRA W Département Sciences du vivant Unité Génie biologique chaussée de Charleroi, 234 BE-5030 Gembloux (Belgique)

Publié dans *Journal of Technology Innovations in Renewable Energy* 2013, **2**, 145-154





## Objectifs du chapitre

Le protocole de micropropagation de *J. curcas* à partir de nœuds doit être optimisé afin de rendre le procédé plus performant pour une application à grande échelle. L'objectif de ce chapitre est de mettre au point une nouvelle technique de multiplication de *J. curcas* basée sur l'induction d'agrégats de bourgeons à partir d'explants nodaux et du milieu optimal obtenu lors de l'amélioration du taux de multiplication *in vitro* (Chapitre II). Nos investigations portent sur la recherche de la balance hormonale BA-AIB la plus efficace en combinaison avec la glutamine, le sulfate d'adénine et la L-arginine pour induire la production d'agrégats de bourgeons. La glutamine est un acide aminé fréquemment utilisé en culture *in vitro* des plantes, comme source d'azote organique bénéfique à la morphogénèse. Son apport dans le milieu augmente la vitesse de régénération des différents types d'explants et influence également le contenu et l'activité des régulateurs de croissance aussi bien endogènes qu'exogènes. La L-arginine est également une source d'azote facilement accessible qui améliore la formation des bourgeons sur les explants. Quant à l'acide citrique, son effet antioxydant contribue à inhiber l'oxydation des tissus et, ainsi, à réduire l'apparition des polyphénols qui nuisent au développement des explants cultivés.



***In vitro* micropropagation of *Jatropha curcas* L. from bud aggregates**

Samson Daudet Medza Mvé<sup>1</sup>, Guy Mergeai<sup>1</sup>, Philippe Druart<sup>2</sup>, Jean Pierre Baudoin<sup>1</sup>, André Toussaint<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Liège University-Gembloux Agro-Bio Tech, Unité de Phytotechnie tropicale et Horticulture. Passage des Déportés, 2. 5030 Gembloux (Belgique)

<sup>2</sup> CRA-W Département Sciences du vivant, Unité Génie biologique chaussée de Charleroi, 234. 5030 Gembloux (Belgique)

**Abstract**

Entire plants were regenerated from nodes explants of *Jatropha curcas* L. following a procedure of bud aggregate induction on MS (Murashige and Skoog) medium supplemented with 25 mg.l<sup>-1</sup> citric acid, 12.2 mg.l<sup>-1</sup> adenine sulfate, 15 mg.l<sup>-1</sup> L-arginine, 2.46 µM IBA (indole-3-butyric acid), 30 g.l<sup>-1</sup> sucrose and 7 g.l<sup>-1</sup> of agar, and enriched with different balances of BA (benzyladenine) and L-glutamine. The histological studies performed on aggregates showed that the buds result from both the development of axillary buds and adventitious budding starting from underlying tissues of the explant. The culture medium containing 6.65 µM BA and 25 mg.l<sup>-1</sup> L-glutamine gave the best results with an average of 64 buds per aggregate after three weeks for all accessions tested. The buds developed into shoots when placed in a MS medium supplemented with 2.21 µM BA, 5.70 µM IAA (indole-3-acetic acid) and 15 mg.l<sup>-1</sup> L-arginine. These shoots were isolated and then rooted in MS containing 2.46 µM of IBA, 2% sucrose and 0.7% agar. The entire process took 13 weeks with a 98% survival rate in terms of plantlets acclimatization. We obtained a multiplication rate of 13 buds per explant and per subculture which is the double of those obtained in other recent works based on the micropropagation of *J. curcas* from node explants. This protocol is economically more profitable.

**Key words:** *Jatropha curcas* L., bud aggregates, nodal explant, regeneration, *in vitro* culture

## Résumé

Des plantes entières de *Jatropha curcas* L. ont été régénérées à partir de nœuds via l'induction d'agrégats de bourgeons sur le milieu MS additionné de 25 mg.l<sup>-1</sup> d'acide citrique, 12,2 mg.l<sup>-1</sup> de sulfate d'adénine, 15 mg.l<sup>-1</sup> de L-arginine et 2,46 µM d'AIB (acide indole-3-butyrique), en combinant différentes concentrations de BA (benzyladénine) et de glutamine. Les études histologiques montrent que les bourgeons formant les agrégats sont d'origine axillaire ou issus de la régénération adventive directe des tissus sous-jacents de l'explant. Le milieu MS contenant 6,65 µM de BA, 2,46 µM d'AIB et 25 mg.l<sup>-1</sup> de glutamine 30 g.l<sup>-1</sup> de saccharose additionné de 25 mg.l<sup>-1</sup> d'acide citrique, 12,2 mg.l<sup>-1</sup> de sulfate d'adénine, 15 mg.l<sup>-1</sup> de L-arginine donne les meilleurs résultats avec une moyenne de 64 bourgeons obtenus au bout de trois semaines pour les deux accessions mises en culture. Le taux de multiplication qui représente le nombre de bourgeons régénérés par explant et par subculture de trois semaines est de 13. Les bourgeons sont allongés sur un milieu MS additionné de 2,21 µM BA, 5,70 µM d'AIA (acide indole-3-acétique) et 15 mg.l<sup>-1</sup> de L-arginine. Les tiges feuillées sont ensuite enracinées sur MS contenant 2,46 µM d'IBA 2% saccharose et 0,7% de gélose. Le processus complet prend 13 semaines avec 98% de survie en acclimatation. Le taux de multiplication obtenu (13 bourgeons/explant/subculture après trois semaines) rend ce protocole économiquement rentable, il représente presque le double de celui de récents travaux basés également sur la micropropagation à partir des explants nodaux.

**Mots clés :** *Jatropha curcas*, explant nodal, agrégat de bourgeons, culture *in vitro*

## Introduction

Among the plant species producing raw materials for biofuels, *Jatropha curcas* L. is one of the plant species that stimulates the highest interest in tropical and subtropical regions. The seeds contain up to 38% in non-edible oil which is highly combustible (1). The use of *J. curcas* for the production of biofuel could compensate for energy shortages, reduce CO<sub>2</sub> gas (Carbon dioxide) emissions and contribute to increase farmers' revenues (2). However, several challenges remain before that plant biomass can be commercially exploited. Its supply on a large scale requires massive production of

phenotypically homogeneous plant-material of a very high quality within a short time-frame that is adapted to the growth conditions of the plantation areas. Multiplication of the plant is traditionally carried out by sowing seeds or planting cuttings directly in the field or after a first period of growth in nurseries. But sowing has the disadvantage of producing heterogeneous plants with regard to their production capacity (3). The plants produced from cuttings develop a superficial rooting system which renders them sensitive to lodging and constitutes a major obstacle to their establishment in poor and marginal soils (4). *In vitro* growth is an alternative for massive and rapid production of elite plants. This clonal propagation method has the advantage of producing plants that are morphologically homogenous with an equal production potential. Several authors have regenerated *J. curcas* from nodal explants, hypocotyls, leaves, petioles and cotyledons (1). However, the number of plantlets produced per explant remained relatively low after a period of four to six weeks (10 to 42 plantlets per explants) which is not economically viable. The present study aims at optimizing the culture conditions of *in vitro* micro-propagation from nodal explants with investigations focusing on the most efficient hormonal balance in combination with glutamine and others amino-acids, to induce mass production of bud aggregates.

### **Material and methods**

The work was carried out with two types of seeds called “Cam” and “Sen”, harvested in 2009 on parental plants aged more than three months and originating from Southern Cameroon (Minkang 1: 2°48'31.28"N; 12° 4'41.30"E) and South-East of Senegal (Dialacoto : 13°18'50.04"N ; 13°16'56.82"O) respectively. These seeds were sown in our growth room with a sixteen hours photoperiod, a temperature of  $27 \pm 2$  °C, a light intensity of  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  and 50-60% relative humidity. The nodal explants were picked from at least two months old seedlings which have formed a minimum total number of four nodes. They were specifically collected from an area beginning at 10 cm from the base of the stem and ending at 5 cm below the apical bud, the latter being discarded at the sampling moment. A petiole piece was kept attached to the stem to prevent putative axillary bud damages due to disinfection. This consisted in washing the explants in a 5% Dettol solution, dipping them in a 70% alcohol solution for 20 seconds, and then immersing them in a 10% calcium hypochlorite

solution for thirty minutes under stirring. Finally, the explants were rinsed three times in the laminar flow with sterile distilled water; the second rinse took place under magnetic stirring for 1 minute.

- *Node buds development*

To develop the axillary buds, the sterilized nodes were placed in a growth medium (GM), based on Murashige and Skoog (5) [MS] compounds containing 8.87  $\mu\text{M}$  BA (benzyladenine), 4.92  $\mu\text{M}$  IBA (Indole-3-butyric acid), 30  $\text{g.l}^{-1}$  sucrose (DuchefaBiochimie, reference 006520.16). The pH of the GM was adjusted to  $5.7\pm 0.1$  and the medium was solidified with 0.7% agar (Select Agar Invitrogen, reference 30391-023). The nodal explants were sized to a length of 0.8 to 1 cm, placed on a sterile paper and cultivated for three weeks in 100 ml magenta B-cap containers (66 mm x 59 mm); each one containing 20 ml of GM.

- *Formation and multiplication of the bud aggregates*

The buds developed on GM medium were separated from the stem fragment and transferred to an induction medium (IM) made up of MS enriched with 25  $\text{mg.l}^{-1}$  citric acid, 12.2  $\text{mg.l}^{-1}$  adenine sulfate, 15  $\text{mg.l}^{-1}$  of L-arginine, different concentrations of glutamine (10, 15, 20, 25, 30 and 35  $\text{mg.l}^{-1}$ ), and five hormonal balances combining 2.46  $\mu\text{M}$  IBA and BA (2.21, 4.43, 6.65, 8.87 and 11.1  $\mu\text{M}$ ) to bring about the formation of bud aggregates. The tested hormonal balances were chosen on the basis of preliminary investigations (6). Every three weeks, aggregates were fragmented into clusters of 5 to 10 buds which were transferred in a medium of the same composition to proceed with proliferation, or else transferred to an elongation medium with the aim to grow buds into shoots for rooting.

- *Elongation and rooting*

The isolated aggregate fragments were first transplanted into an elongation medium (EM), composed of the MS medium supplemented with 2.21  $\mu\text{M}$  BA and 5.70  $\mu\text{M}$  IAA (indole-3-acetic acid), 15  $\text{mg.l}^{-1}$  L-arginine, 3% sucrose and gelled with 0.7% agar. After 3 weeks of growth, basic hormone free MS medium was added as a second liquid phase to immerse the aggregates base by 1 to 2 mm. The first shoots reaching  $\pm 1.5$  cm height, were isolated and transferred one week later for rooting in  $\frac{1}{2}$  MS

(containing 2.46  $\mu$ M IBA, 2% sucrose and 0.7% agar) while the rest of the aggregate was subcultured in fresh shoot elongation medium. Shoots rooting was started in darkness for the first five days and then root formation was continued under a sixteen-hour photoperiod for three weeks.

- *Acclimatization*

The residues from the agar medium were removed from the root system by washing it with distilled water. The plantlets were replanted in pots containing commercial compost and placed in the growth chamber where seeds' germination took place. The plantlets were covered with a transparent plastic film for two weeks and progressively adapted to the open air for the next two weeks before their transfer to the greenhouse.

- *Histological study*

Histological cuts were carried out on bud aggregates fragments of four weeks old (at least) in accordance with the Ruzin (7) procedure and then stained with toluidine blue.

- *Parameters analysed*

The percentage of bud aggregates and the number of newly formed buds/aggregates were recorded at each subculture into IM media. In the elongation medium, the number of shoots per aggregate fragment and their length were noted every four weeks during three successive cycles of micropropagation. During the rooting phase, the appearance of roots was observed after 12 days. The number, the length of the roots and the percentage of rooted shoots were recorded after four weeks. Lastly, the survival percentage for plantlets was noted after 5 weeks *ex vitro*.

- *Statistical analysis method*

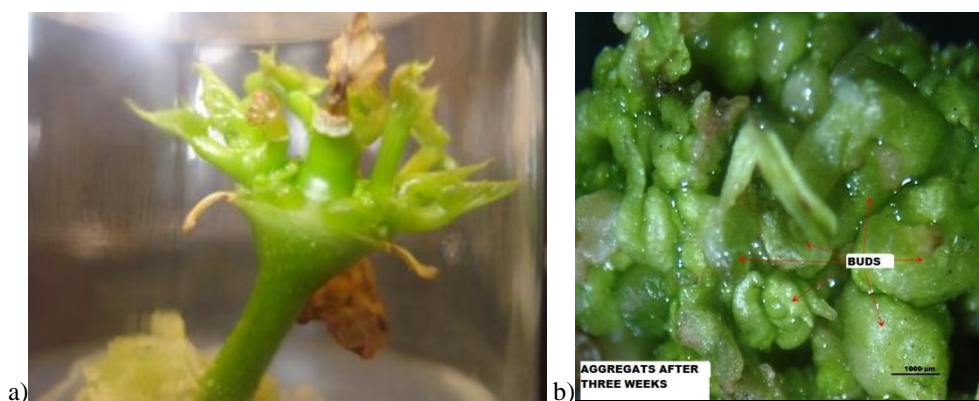
The tests were carried out in randomized blocks in order to determine the influence of the accession as well as the induction medium and the glutamine concentration on the number of buds produced and rooting. The experimental unit consisted of a fragment of aggregates. In this experimental system, the

three factors are the following: induction medium as a fixed qualitative factor (5 items); accession as a fixed qualitative factor (2 items) and glutamine concentration as a fixed quantitative factor (6 items).

The statistical analysis used is a fixed crossover model with 60 random simple independent and normal populations with the same variance. Each treatment contained 26 shoots and each treatment was repeated 3 times. Statistically significant differences between means were determined by three-way analysis of variance using Duncan's multiple-range test and the Minitab15 Software and Statistical. A P-value of less than 0.05 was considered significant.

## Results

Each nodal explant from the mother-plants developed one to three axillary buds after three weeks growth in the culture medium (figure 1a). Both *J. curcas* accessions showed the same behavior with regard to bud formation in this medium. They were individually replanted in the presence of BA and glutamine to induce bud aggregates (figure 1b). The average percentage of induced aggregates varied according to the hormonal balance and the concentration of glutamine.



**Figure 1:** Bud aggregate development stages in *J. curcas*, Cameroon accession.

a) Axillary buds on nodal explants after 3 weeks of cultivation on a MS medium supplemented with 8.87  $\mu\text{M}$  BA, 4.92  $\mu\text{M}$  IBA, 3% sucrose and 0.7% agar

b) Bud aggregate after 3 weeks of cultivation on a MS medium supplemented with 6.65  $\mu\text{M}$  BA, 2.46  $\mu\text{M}$  IBA, 25  $\text{mg.l}^{-1}$  glutamine, 25  $\text{mg.l}^{-1}$  citric acid, 12.2  $\text{mg.l}^{-1}$  adenine sulfate and 15  $\text{mg.l}^{-1}$  L-arginine, 3% sucrose and 0.7% agar (bar : 1000  $\mu\text{m}$ )

After three weeks, the bud aggregates were fragmented into cluster units of 5 to 10 buds and these were replanted into an IM medium of the same composition, to form new aggregates. Figures 2a and 2b show the average percentage of these units forming new aggregates after five subcultures. The



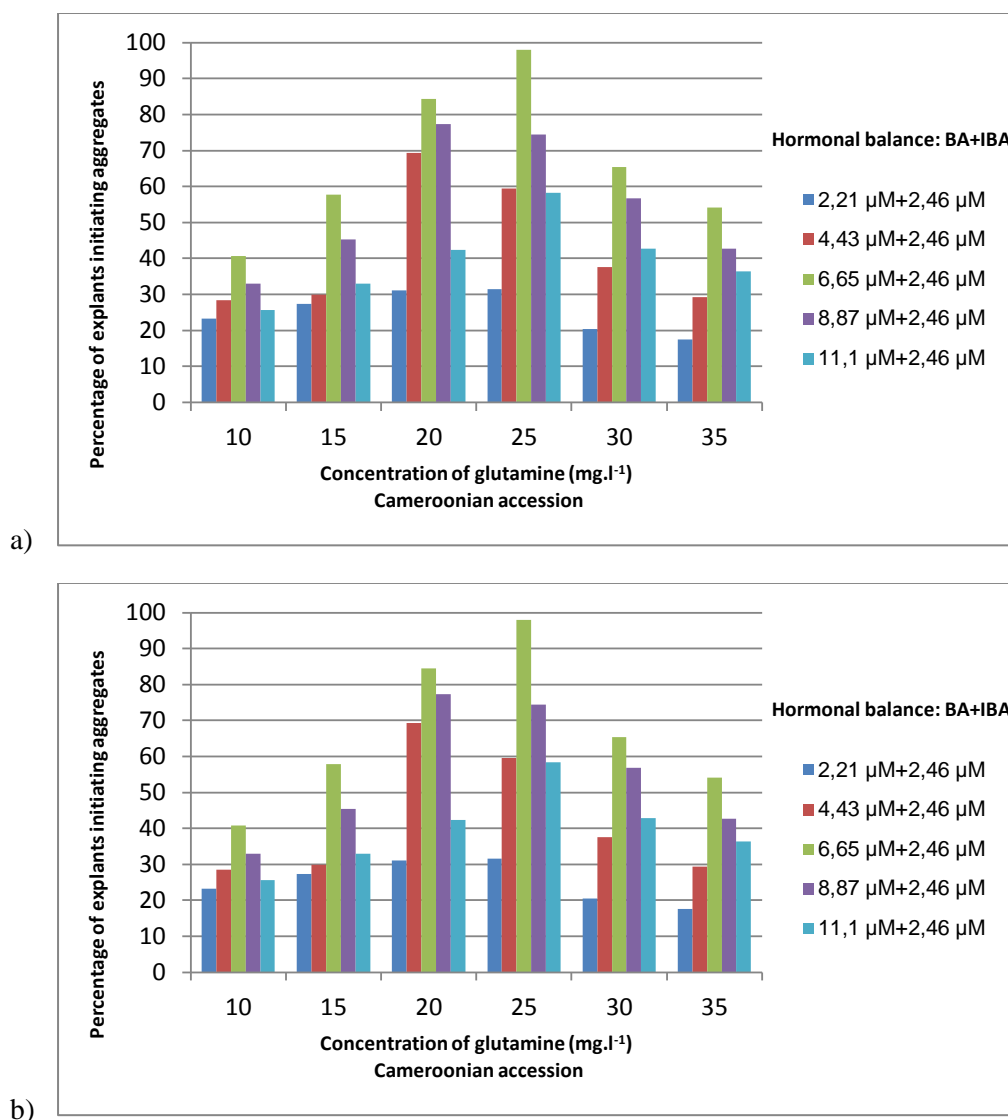
highest regeneration percentage (98%) was obtained with 6.65  $\mu\text{M}$  BA, 2.46  $\mu\text{M}$  IBA, 25  $\text{mg.l}^{-1}$  glutamine and the supplements. The number of buds per unit obtained every three weeks for both accessions (figures 3a and 3b) showed highly significant differences according to the hormonal balance and the concentration of glutamine [P-value=0.000<0.05;  $F_{\text{obs}}$  (20, 1500)= 10.57;  $F_{\text{obs}} > F_{0.95} = 1.58$ )

The optimal concentrations of BA and glutamine were 6.65 $\mu\text{M}$  and 25  $\text{mg.l}^{-1}$  respectively. In this medium an average of 63.37 $\pm$ 2.90 buds per aggregate in the Cam accession and 65.13 $\pm$ 1.12 in the Sen accession were recorded after three weeks. The multiplication rate is the number of useful buds obtained per bud of the initial aggregate after three weeks in induction medium. The multiplication rates achieved after the first five subcultures on both accessions are 12.3, 13.4, 14.5, 12.2 and 13.3 as averages of buds per explant per subculture. The two *J. curcas* accessions still showed similar behavior with regard to the formation of buds aggregates.

The histological sections carried out on the bud aggregates show new buds developing continuously from each leaf axil (figure 4a). This phenomenon occurred without callogenesis and was conform to a strict axillary budding process. In this case, we could observe the absence of the dominance normally exerted by the apical buds of the shoots. Moreover, a direct adventive regeneration took place from the underlying tissues (figure 4b) simultaneously to axillary budding within the same bud aggregate.

From the 5 and 10 buds forming the aggregate fragments, 3 to 4 became dominant over the others to reach an average size of 1.5 cm. The rest of the aggregate fragment was placed back into the same elongation condition, after collecting the elongated shoots. This operation was necessary to develop all the buds from an aggregate fragment into shoots able to root (figure 4c).

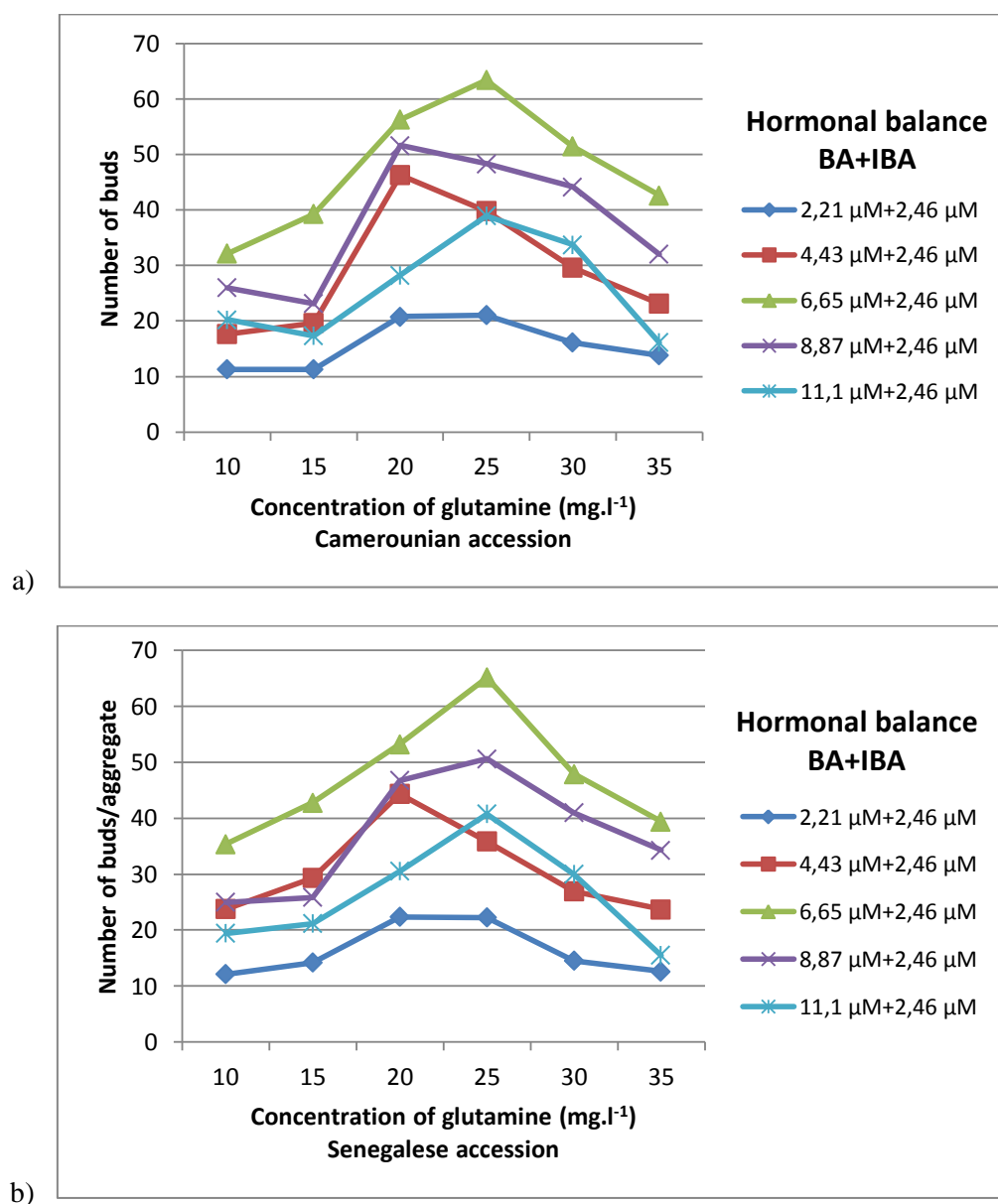
Roots appear at the base of leafy stems as soon as the 12th day after their transfer to the rooting medium. Results show that the induction medium has an influence on the rooting potential of the stems. Table 1 shows the percentage of rooting obtained on the two accessions of *J. curcas* after four weeks on MS rooting medium containing 2.46  $\mu\text{M}$  IBA, 2% sucrose and 0.7% agar according to the concentration of BA and glutamine in the induction medium.



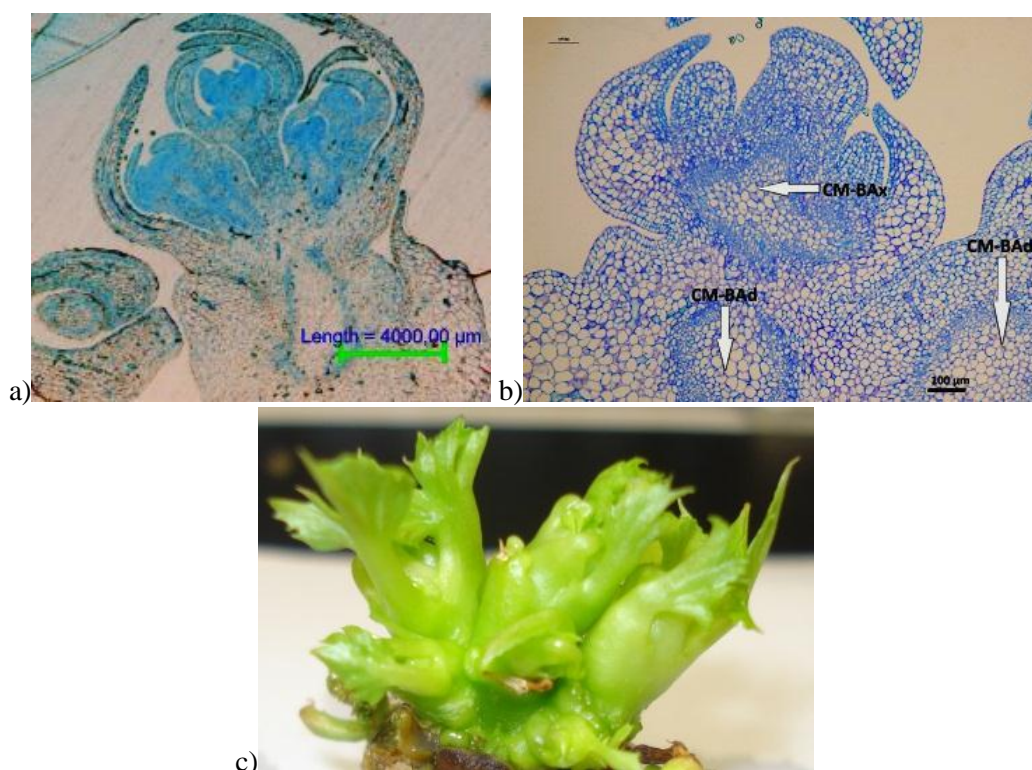
**Figure 2:** Percentage of nodal explants initiating bud aggregates on the Cameroon (a) and Senegalese (b) accessions. Both accessions were cultivated in induction media supplemented with 25 mg.l<sup>-1</sup> citric acid, 12.2 mg.l<sup>-1</sup> adenine sulfate, 15 mg.l<sup>-1</sup> of L-arginine, 3% sucrose and 0.7% agar. Averages were calculated on basis of 3 repetitions of 26 explants each.

There was no significant difference in the percentage of rooting stems for the two accessions of *J. curcas* whatever the concentration of glutamine in their native medium. However, percentage of rooting varies very significantly with the concentration of BA in the induction medium and was higher on the stems originating from media containing low concentrations of BA. Optimal values were observed with stems cultured in MS media supplemented with 2.21 μM BA with rooting percentages as high as 90.10±6.23 and 86.10±5.02% respectively for the Cameroon and Senegalese accessions. As for the lowest rooting percentages, they were obtained with the induction media containing the highest BA concentration, i.e. 11.1 μM BA, with rooting percentages as low as,

respectively,  $31.27 \pm 1.60\%$  and  $35.17 \pm 0.49\%$  for the Cameroon and Senegal accessions. Callus formation at stem basis was also noted during the rooting phase of stems originating from media containing 11.1 or 8.87  $\mu\text{M}$  BA. All obtained roots, regardless of the origin of the stems, developed little or no secondary roots.



**Figure 3:** Average number of buds obtained from each aggregate on the different induction media according to glutamine concentration in the media on the Camerounian (a) and Senegalese (b) accessions. All media were supplemented with  $25 \text{ mg.l}^{-1}$  citric acid,  $12.2 \text{ mg.l}^{-1}$  adenine sulfate,  $15 \text{ mg.l}^{-1}$  L-arginine, 3% sucrose and 0.7% agar. Averages were obtained from 3 replications with 26 explants/assay.



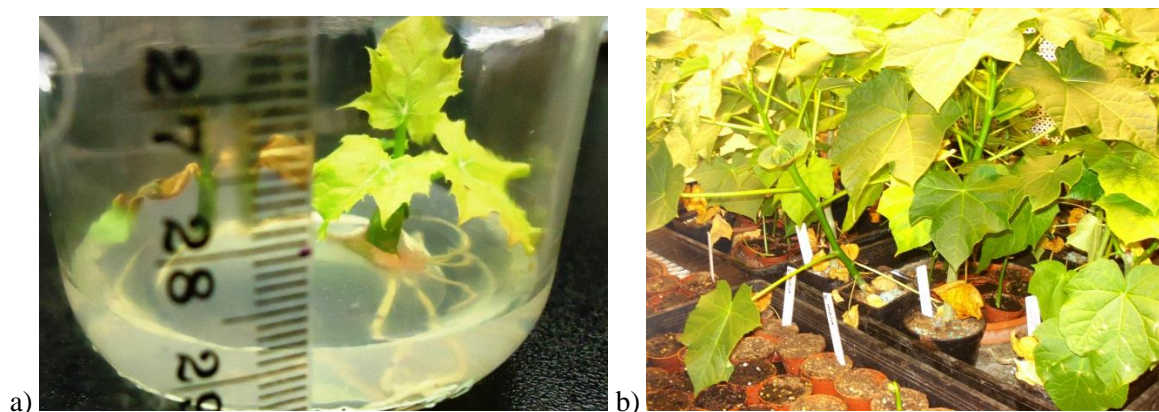
**Figure 4:** *In vitro* bud cluster induction in *J. curcas* through axillary and adventitious regeneration for the Cameroonian accession.

- a) Histological section showing the axillary origin of the buds in the aggregates after 3 weeks of culture on a MS medium containing 6.65  $\mu\text{M}$  BA, 2.46  $\mu\text{M}$  IBA, 25  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  glutamine, 25  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  citric acid, 12.2  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  adenine sulfate, 15  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  of L-arginine, 3% sucrose and 0.7% agar
- b) Histological section of a bud aggregate of 3 weeks presenting axillary development and adventitious regeneration from underlying tissues. The bud were grown on a MS medium supplemented with 6.65  $\mu\text{M}$  BA, 2.46  $\mu\text{M}$  IBA, 25  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  glutamine, 25  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  citric acid, 12.2  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  adenine sulfate, 15  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  L-arginine 3% sucrose and 0.7% agar (CM-Bad: meristematic center for adventitious budding of underlying tissues, CM-BAx: meristematic center for axillary budding)
- c) Fragment of a three weeks old bud aggregate grown on MS elongation medium supplemented with 2.21  $\mu\text{M}$  and 5.70  $\mu\text{M}$  BA IAA (indole-3-acetic acid), 15  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  L-arginine, 3% sucrose and 0.7% agar.

**Table 1:** Impact of bud aggregate induction medium on the average percentage of rooting stems in the rooting medium ( $\frac{1}{2}$  MS containing 2.46  $\mu\text{M}$  IBA, 2% sucrose and 0.7% agar) for the Cameroon and Senegalese accessions of *J. curcas*.

		Glutamine concentration in the induction medium ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ )					
Induction medium	Accession	10	15	20	25	30	35
BA(11.1)+IBA (2.46)	Cam	36.97 $\pm$ 1.16a	36.87 $\pm$ 0.67a	31.27 $\pm$ 1.60a	36.71 $\pm$ 1.68a	35.88 $\pm$ 1.47a	41.10 $\pm$ 1.43a
	Sen	35.37 $\pm$ 1.11a	35.17 $\pm$ 0.49a	39.21 $\pm$ 1.10a	39.11 $\pm$ 1.48a	35.23 $\pm$ 1.17a	39.11 $\pm$ 1.10a
BA(8.87)+ IBA (2.46)	Cam	45.21 $\pm$ 1.90a	44.09 $\pm$ 1.88a	52.56 $\pm$ 1.25b	18.91 $\pm$ 1.71b	46.89 $\pm$ 1.88b	47.96 $\pm$ 2.15b
	Sen	43.11 $\pm$ 1.30b	43.19 $\pm$ 1.68b	51.16 $\pm$ 1.05b	48.01 $\pm$ 1.61b	46.09 $\pm$ 1.38b	56.98 $\pm$ 2.11b
BA(6.65)+ IBA (2.46)	Cam	52.12 $\pm$ 2.22bc	51.00 $\pm$ 2.31c	61.08 $\pm$ 2.43c	51.07 $\pm$ 2.22b	51.81 $\pm$ 2.31bc	79.98 $\pm$ 3.43c
	Sen	59.02 $\pm$ 2.02c	50.00 $\pm$ 2.71c	59.08 $\pm$ 2.03c	60.07 $\pm$ 2.02b	49.71 $\pm$ 2.11b	67.90 $\pm$ 3.41c
BA(4.43)+ IBA (2.46)	Cam	79.11 $\pm$ 4.89d	78.06 $\pm$ 4.58d	81.19 $\pm$ 5.46d	71.66 $\pm$ 4.89c	71.69 $\pm$ 4.58c	78.19 $\pm$ 4.46d
	Sen	77.91 $\pm$ 4.09d	76.16 $\pm$ 4.18d	79.19 $\pm$ 4.06d	70.36 $\pm$ 4.19c	79.69 $\pm$ 4.08c	77.17 $\pm$ 4.41d
BA(2.21)+ IBA (2.46)	Cam	90.10 $\pm$ 6.23e	86.04 $\pm$ 5.22e	89.05 $\pm$ 5.85e	78.99 $\pm$ 4.32d	81.04 $\pm$ 5.22d	86.15 $\pm$ 5.85e
	Sen	86.10 $\pm$ 5.02e	84.04 $\pm$ 5.12e	87.05 $\pm$ 5.05e	76.90 $\pm$ 4.12d	79.04 $\pm$ 5.02d	84.15 $\pm$ 5.75e

Average percentage $\pm$ SE of rooted shoots after 4 weeks, with 3 replicates (26 shoots / replicate). Values in each column followed by same letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at  $\alpha=0.05$ .



**Figure 5:** Rooting and acclimatization of *J. curcas* vitroplants (Cameroon accession).

- a) Four week old rooted stem on MS medium containing 2.46  $\mu\text{M}$  IBA, 2% sucrose and 0.7% agar,  
 b) Acclimated 5 months old *J. curcas* vitro-plants.

After 4 weeks, 96.32 % of the shoots bore an average of  $2 \pm 0.37$  roots; with an average length of  $0.7 \pm 0.68$  cm. Rooted stems (Figure 5a) were transferred to acclimatization. They lose all roots produced *in vitro* after about 10 days and initiate new roots. There was no significant difference in the survival rates during acclimatization of rooted stems whatever their background. The survival rate is of 98 % in acclimatization and obtained vitroplants showed no morphological abnormalities after being transferred to greenhouses (Figure 5b).

## Discussion

The absence of a significant difference between both tested accessions with respect to the induction of bud aggregates could be linked to insufficient genetic variation between them. Similar observations were made with several cultivars of *J. curcas* (8). The formation of bud aggregates and the variability of induction performances were influenced by the interaction between the phytohormones and the amino acid supplied to the IM medium. The concentration of endogenous cytokinins and their control mechanisms would be the most important elements that could explain these differences. The absence of the apical dominance combined with the direct adventive regeneration from the underlying tissues of the bud, led to the formation of bud aggregates without involving the production of callus. A highly productive protocol applied to several cultivars of *Malus domestica* Borkh was established from shoot apex, but the buds regeneration included callogenesis (9). That presents the risks of conformity alterations within the regenerants as it often is the case for adventive regeneration.

The shoot bud differentiation was observed on MS media supplemented with cytokinines. By means of axillary regeneration, we have been able to obtain  $30.80 \pm 5.5$  shoots/explant of *J. curcas* on a MS medium containing  $2.30 \mu\text{M}$  kinetine,  $0.50 \mu\text{M}$  IBA,  $15 \text{ g.l}^{-1}$  of adenine sulfate and  $30 \text{ g.l}^{-1}$  sucrose after 4 to 6 weeks of growth. Nevertheless this medium induced the formation of calluses and thus the risk of somaclonal variation. Similarly, Medza and co. regenerated  $40.4 \pm 8.80$  shoots per axillary bud from a nodal explant on MS containing  $6.65 \mu\text{M}$  BA and  $2.46 \mu\text{M}$  IBA,  $33.12 \mu\text{M}$  of adenine sulfate,  $82.92 \mu\text{M}$  glutamine and  $30 \text{ mg.l}^{-1}$  sucrose, after 4 weeks of growth but without any callus formation (6). While the response obtained depends on the hormonal balance and of the kind of cytokinin used, it is also linked to the type of explant, as well as their physiological state. Among the cytokinins, BA is the best to stimulate the buds regeneration and proliferation from nodal explants of *J. curcas* (10). The BA and IBA combination provided the best shoot bud induction of 6.0 shoots per explant. However the authors noticed differences in responses among genotypes which they attributed to endogenous concentration of hormones. Shoot tips of *J. curcas* were cultured on MS combination of  $8.87 \mu\text{M}$  BAP and  $2.85 \mu\text{M}$  IAA along with adenine sulfate, glutamine and activated charcoal. The plants produced by the direct organogenesis method exhibit greater genetic stability than those produced via callus-mediated organogenesis (11).

The amino acids added to the growth medium can act in synergy with growth regulators to regenerate entire plants of *Cichorium intybus* L. by induction of meristematic nodules from wounded leaves. That adventive regeneration method showed a high regeneration potential close to that of bud aggregates. In our trials, the glutamine was shown to be indispensable to the formation of bud aggregates (11). Glutamine is frequently employed in the culture medium as an organic nitrogen source. Many papers have shown that the use of exogenous glutamine can be beneficial for *in vitro* culture, increasing the regeneration rate and biomass of the explants. As easily accessible source of reduced nitrogen, it is generally more favorable than ammonium, to morphogenesis as reported for *Cucumis sativus* L. In the course of work done with the *in vitro* multiplication of *Arachis hypogea* L. from cotyledon explants, the presence of L-glutamine also improved and maintained high multiplication and growth rates. During transamination, glutamine transfers nitrogen to other carbohydrate substrates ( $\alpha$ -keto acids)

and the new amino acids immediately contribute to the biosynthesis of proteins (12, 13). The glutamine and glutamate by-product are the primary sources of reduced nitrogen in the cellular metabolism. They contribute to the trans-amination, where ammonium is incorporated by the action of the glutamine synthetase and glutamate synthase (14) to form aspartate and asparagine. They are the precursors of all other amino acids (15) involved in protein biosynthesis and morphogenesis like buds aggregates process.

Glutamine in combination with inorganic forms of nitrogen has generally been used *in vitro*. In bromeliads, glutamine was an excellent nitrogen source to improve gain of dry shoot mass of plantlets cultivated *in vitro* (16). The glutamine had a strong influence on shoot hormonal contents (cytokinin) and it has a great effect on the promotion of shoot-bud organogenesis from leaf base pineapple explants. Glutamine and glutamate are known to be the main endogenous amino acids involved in plant metabolism, providing nitrogen for the biosynthesis of amino acids, nucleic acids and other N-compounds (17).

Amino acids played a vital role in the induction and development of a maximum number of multiple shoots (12). Adenine sulfate is a substrate for the synthesis of natural cytokinins (18); its beneficial effect on the axillary budding from nodal explants is corroborated by the work on the *in vitro* organogenesis. Its absence in the optimal IM medium caused a reduction in the number of buds formed by aggregate (data not shown). The exogenous supply of adenine is recovered and utilized for ATP (Adenosine Triphosphate) and nucleic acid synthesis during the development of *in vitro* micropropagation. The enlargement of the nucleotide pool is required for rapid cell proliferation and growth of the tissue (19).

The formation of bud aggregates was also favored by L-arginine that takes part in the synthesis and/or activity of the polyamines which cause hormone-like effects in plants (20). They stabilize the protoplasts and influence the cell division while at the same time retard the senescence of the tissues. Their polycationic shape leads to connections with nucleic acids and plasmalemma phospholipids and allow for better permeability of the cell membranes (21).

It was shown that the products of L-arginine synthesis increase budding. The combination of these products to glutamine and arginine is a factor enhancing protein accumulation. The development of axillary nodes from explants was also performed on MS medium containing 4.90  $\mu\text{M}$  IBA and 13.31  $\mu\text{M}$  of BA (22). Citric acid has been recognized as a very efficient anti-oxidant compound in *in vitro* culture (23). It prevents the production of polyphenols which often hinder organogenesis and cause explant necrosis. For *in vitro* propagation of *Acacia* plantlets, citric acid was the most effective in supporting axillary shoot proliferation and preventing browning of the medium (24).

The detailed study on histological events of *in vitro* growth and morphogenesis of *J. curcas* shows that the process of shoot morphogenesis happens through adventitious shoot morphogenesis and axillary development. These two types of plant regeneration were observed - one type of shoot regeneration was via organogenesis from underlying tissues - and the second type was through multiplication of the pre-existing meristems. It is, however, interesting to note that under similar experimental conditions the process of organogenesis varied from explant to explant. The authors attributed the difference in regeneration response to pre-disposed genetic conditions (25).

During the buds to shoot elongation stage, L-arginine prepares the shoots for rooting. A few buds were dominant over other buds of the same aggregate fragment and inhibit their growth. Once the first shoots were harvested from the fragment, the resting buds immediately started to grow into shoots as observed in various woody plants (26). Consequently, such apical dominance leads to asynchronous development of buds differing in their physiological stage at the moment of their transfer to elongation medium. The addition of a hormone-free MS nutrient solution as a double phase on the gelled elongation medium one week preceding the transfer to rooting media, contributed to the dilution of endogenous cytokinins. This dilution liberates the buds from the negative effects of cytokinins on root formation.

The highest rooting rate in *J. curcas* was 19.43% on  $\frac{1}{2}$  MS and 15  $\mu\text{M}$  IBA, 11.4  $\mu\text{M}$  IAA and 5.5  $\mu\text{M}$  NAA (Naphthalene Acetic Acid) as auxin cocktail. The high rate of rhizogenesis is therefore linked to the presence of IBA in the medium (27). In our trials, rooting of pre-elongated shoots was favored by a



pre-treatment in darkness at the beginning of rooting. This pretreatment of the shoots improved roots induction and initiation in several other woody species (26). Darkness influences the endogenous metabolism of the shoots during the successive phases of the rhizogenesis with, notably, a rapid drop in the activity of endogenous peroxidase and phenolic compounds during the first five days of culture (28). On the other hand, the use of ½ MS medium increases the C/N ratio by reducing the supply of nitrogen which is favorable to root formation. The rooting percentage variations could also be related to the mechanisms of control, the level of endogenous growth regulators and their metabolism. The high concentrations of cytokinins inhibit root formation, which would explain the low rooting rates obtained on stems originating from media with high levels of BA. The absence of secondary roots may be related to stress in the stem formation medium. The amount and the quality of secondary roots determine the survival rate during acclimatization. However, despite the absence of such roots, survival rates have remained high in acclimatization (10).

### **Conclusion**

In the present study, it has been clearly established that the *J. curcas* plantlets were regenerated *in vitro* by direct induction of buds aggregates. Replanting the buds into an optimized MI medium led in 13 weeks to obtain a total average of  $65.13 \pm 1.12$  plantlets per bud originating from the development of nodal explant. The acclimatized plants do not present any visual defects and did not show any malformation. The performance gain from this micropropagation protocol, with a multiplier of 13 is double those obtained by other authors (10). Its use would be more economically viable for the production of vegetable planting material. However, the conformity of clonal plantlets has to be confirmed after checking their behavior during the all plant growth cycle and before any application of the technique at a large scale.

**Acknowledgments:** We thank the Institutional Support Program in Human Resources Development (PAI-DRH) program of the Ministry of Economy, Budget, Public Accounts, the Civil Service and State Reform in the Republic of Gabon; the National Institute for Higher of Agronomy and

Biotechnology, University of Science and Technology of Masuku (USTM-INSAB), Gabon, and the University of Liège Gembloux Agro-Bio Tech.

### References

1. Leela T, Naresh B, Srikanth Reddy M, Madhusudhan NC, Cherku PD. Morphological, physico-chemical and micropropagation studies in *Jatropha curcas* L. and RAPD analysis of the regenerants. *Applied Energy*. 2011;88(6):2071-2079.
2. Openshaw K. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. *Biomass Bioenergy*. 2000;19:1-15.
3. Jha T, Mukherjee P, Datta M. Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn., an important biofuel plant. *Plant Biotechnology Reports*. 2007;1(3):135-140.
4. Nyamai DO, Omuodo LO. *Jatropha curcas* : the untapped potential in eastern and central Africa. manual Pau, editor. Nairobi, Kenya 49 p: Vanilla-Jatropha Development Foundation; 2007.
5. Murashige T, Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962;15(3):473-497.
6. Medza Mve SD, Mergeai G, Jean-Pierre B, André T. Amélioration du taux de multiplication *in vitro* de *Jatropha curcas* L. *Tropicultura*. 2010;28(4):200-204.
7. Ruzin SE. *Plant microtechnique and microscopy*. New York, USA, 322 p: Oxford University Press; 1999. 322 p.
8. Sharma S, Sudheer Pamidimarri DVN, Vijay Anand KG, Reddy MP. Assessment of genetic stability in micropropagules of *Jatropha curcas* genotypes by RAPD and AFLP analysis. *Industrial Crops and Products*. 2011;34(1):1003-1009.
9. Caboni E, Lauri P, D'Angeli S. *In vitro* plant regeneration from callus of shoot apices in apple shoot culture. *Plant Cell Reports*. 2000;19(8):755-760.
10. Datta MM, Mukherjee P, Ghosh B, Jha TB. *In vitro* clonal propagation of biodiesel plant (*Jatropha curcas* L.). *Current Science*. 2007;93(10):1438-1442.
11. Piéron S, Belaizi M, Boxus P. Nodule culture, a possible morphogenetic pathway in *Cichorium intybus* L. propagation. *Scientia Horticulturae*. 1993;53(1-2):1-11.

12. Vasanth K, Lakshmi Prabha A, Jayabalan N. Amino acids enhancing plant regeneration from cotyledon and embryonal axis of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Indian Journal Crop Science*. 2006;1(1-2):79-83.
13. Vasudevan A, Selvaraj N, Ganapathi A, Kasthuriengan S, Ramesh Anbazhagan V, Manickavasagam M. Glutamine: a suitable nitrogen source for enhanced shoot multiplication in *Cucumis sativus* L. *Biologia Plantarum*. 2004;48(1):125-128.
14. Mifflin BJ, Habash DZ. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *Journal of Experimental Botany*. 2002;53(370):979-987.
15. Peoples MB, Gifford RM. Long distance transport of carbon and nitrogen from sources to sinks in higher plants. In: Dennis D, Turpin DH, editors. *Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. New York, USA 1993. p. 434-447.
16. Mercier H, Kerbauy GB. Endogenous iaa and cytokinin levels in bromeliad shoots as influenced by glutamine and ammonium nitrate treatments. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. 1998;10(3):225-228.
17. Coruzzi G, Last R. Amino acids. In: Buchanan B, Groissem W, Jones R, editors. *Biochemistry and Biology of Plants*. USA: American Society of Plant Physiologists; 2000. p. 358-410.
18. Staden J, Crouch NR. Benzyladenine and derivatives- their significance and interconversion in plants. *Plant Growth Regulation*. 1996;19:153-175.
19. Ashihara H, Stasolla C, Loukanina N, Thorpe TA. Purine metabolism during white spruce somatic embryo development : salvage of adenine, adenosine, and inosine. *Plant Science*. 2001;160:647-657.
20. Kakkar RK, Sawhney VK. Polyamine research in plants-a changing perspective. *Physiologia Plantarum*. 2002;116:281-292.
21. Galston AW, Kaur-Sawhney R. Polyamines as endogenous growth regulators. In: Davies PJ, editor. *Plant hormones and their role in plant growth and development*. Dordrecht, Netherlands: Martinus Nijhoff; 1987. p. 280-295.

22. Shrivastava S, Banerjee M. Algal filtrate: A low cost substitute to synthetic growth regulators for direct organogenesis of embryo culture in *Jatropha curcas* (Ratanjyot). *Acta Physiologiae Plantarum*. 2009;31(6):1205-1212.
23. Brassard N, Richer C, Toussignant D, Rioux JA. Multiplication végétative de l'*Acer saccharum* : contribution à la micropropagation. *Canadian Journal of Forest Research*. 2003; 4:682-690.
24. Vengadesan G, Ganapathi A, Amutha S, Selvaraj N. *In vitro* propagation of Acacia species: a review. *Plant Science*. 2002;163(5):663-671.
25. Mukherjee P, Varshney A, Johnson T, Jha T. *Jatropha curcas* : a review on biotechnological status and challenges. *Plant Biotechnology Reports*. 2011;5(3):197-215.
26. Druart P. Contribution to the development of *in vitro* mass-production production techniques of woody species that can be used in fruit growing. Gembloux, Belgique: PhD Thesis, Faculté d'Agronomie de Gembloux; 1987, 121 p.
27. Kumar D, Singh S, Sharma R, Kumar V, Chandra H, Malhotra K. Above-ground morphological predictors of rooting success in rooted cuttings of *Jatropha curcas* L. *Biomass and Bioenergy*. 2011;35(9):3891-3895.
28. Druart P, Kevers C, Boxus P, Gaspar T. *In vitro* promotion of root formation by apple leaf buds through darkness effect on endogenous phenols and peroxidases. *Zeitschrift Pflanzenphysiologie*. 1982;108(5):429-436.

**SYNTHESE ET DISCUSSION GÉNÉRALE**



## Synthèse et discussion générale

*J. curcas* ne dispose pas encore de semences certifiées par rapport à la faculté germinative, l'état sanitaire, la pureté spécifique et variétale, et reste largement une plante sauvage (Francis et al., 2005). Son matériel végétal de plantation se compose actuellement de graines et de boutures. Les programmes d'amélioration ne fournissent pas de clones élites ou des hybrides stables (Jingura, 2011). L'extension rapide des surfaces cultivées pour la production du biodiesel réside dans la possibilité de pouvoir multiplier en masse des accessions et/ou des écotypes possédant des caractéristiques agronomiques recherchées du point de vue du port et des rendements en huile, ainsi que de la résistance à la sécheresse et aux maladies. La variabilité des rendements en graines des exploitations actuelles établies à partir des semences, l'absence de clones supérieurs et le manque de boutures ont rendu nécessaire et urgente, la mise au point d'un protocole de micropropagation. Celui-ci pourrait offrir la possibilité d'installer rapidement des parcs à bois ou de mettre à la disposition des acteurs de la filière, du matériel végétal de plantation pour la production du biodiesel.

Dans le cadre de la mise au point de ce protocole de micropropagation à partir d'explants nodaux, deux axes prioritaires ont été abordés après une analyse bibliographique : d'une part, l'amélioration du taux de multiplication *in vitro* par bourgeonnement axillaire et, d'autre part, la mise au point d'une technique de micropropagation basée sur l'induction d'agrégats de bourgeons.

### **1. Mise au point d'un protocole de micropropagation et amélioration du taux de multiplication**

La recherche bibliographique a montré que plusieurs équipes se sont intéressées à la multiplication *in vitro* de cette espèce via la prolifération d'explants nodaux. Dès lors, les premiers essais menés ont consisté à évaluer et à optimiser un protocole de régénération à partir de ce type d'explant. Nous avons confirmé le fait que la présence de 2,46  $\mu\text{M}$  d'AIB est nécessaire dans la balance hormonale pour assurer une bonne multiplication *in vitro* de *J. curcas* à partir d'explants de nodaux. La combinaison de régulateurs de croissance BA-AIB s'est révélée la plus performante sur le bourgeonnement axillaire et la multiplication des pousses. Le milieu MS additionné de 6,65  $\mu\text{M}$  de BA et 2,46  $\mu\text{M}$  d'AIB,

complété avec 33,12  $\mu\text{M}$  de sulfate d'adénine; 82,92  $\mu\text{M}$  de glutamine et 30  $\text{g.l}^{-1}$  de saccharose donne les meilleurs résultats sur la multiplication. Il permet de produire  $42,7\pm 3,2$  et  $38,2\pm 4,7$  bourgeons/explants après 6 semaines, respectivement pour l'accession camerounaise et sénégalaise. Ce milieu a permis d'élever le taux moyen de multiplication à 8,15. Ce taux représente le nombre de pousses formées par explant et par subculture toutes les trois semaines. Il est plus élevé comparativement aux protocoles mis au point par d'autres auteurs (Datta et al., 2007; Shrivastava and Banerjee, 2009).

Les pousses feuillées obtenues sur le milieu de multiplication sont mises en élongation pendant 3 à 4 semaines sur le milieu MS complété de 2,21  $\mu\text{M}$  BA et 5,70  $\mu\text{M}$  d'AIA, 3% de saccharose et solidifié avec 0,7% d'agar. Elles sont ensuite transférées sur le milieu d'enracinement MS  $\frac{1}{2}$  complété de 5,7  $\mu\text{M}$  d'AIB, 15  $\text{g.l}^{-1}$  de saccharose et 0,7% d'agar. Les plants enracinés sont acclimatés pendant 6 semaines avec un pourcentage de survie de 97%. Ces plants sont morphologiquement homogènes et ne présentent pas d'anomalies visuelles. Ce protocole constituait un outil de base pour la production en grand nombre du matériel végétal de plantation par micropropagation. En vue d'une application à grande échelle, il y avait nécessité de rendre le protocole plus performant.

## **2. Régénération des plantes entières par induction d'agrégats de bourgeons à partir d'explants nodaux**

L'optimisation du protocole est basée sur l'induction d'agrégats de bourgeons à partir du milieu de base utilisé au cours de l'amélioration du taux de multiplication. Elle est réalisée grâce à l'établissement d'un bon équilibre de la balance BA-AIB-glutamine ainsi que de l'apport complémentaire de la L-arginine et de l'acide citrique. L'induction d'agrégats de bourgeons se traduit par une levée de la dominance apicale, un développement généralisé de bourgeons axillaires, y compris à l'aisselle des primordiums foliaires, et une régénération adventive à partir de tissus sous-jacents de l'explant.



Les meilleurs résultats sur l'induction d'agrégats de bourgeons sont obtenus sur le milieu MS contenant : 6,65  $\mu\text{M}$  de BA, 2,46  $\mu\text{M}$  d'IBA, 25  $\text{mg.l}^{-1}$  de glutamine, 25  $\text{mg.l}^{-1}$  d'acide citrique, 12,2  $\text{mg.l}^{-1}$  de sulfate d'adénine et 15  $\text{mg.l}^{-1}$  de L-arginine. Le taux moyen de multiplication par subculture obtenu au cours des cinq premières subcultures sur les deux accessions est de 13,1 bourgeons toutes les trois semaines. Les bourgeons axillaires se développent jusqu'à l'aisselle des primordiums foliaires et les bourgeons adventifs à partir des tissus sous-jacents.

Au terme de la prolifération, les fragments d'agrégats comportant 5 à 10 bourgeons sont placés sur le milieu d'élongation et développent des pousses feuillées de 1,5 cm. Celles-ci sont alors transférées sur le milieu d'enracinement durant quatre semaines (MS  $\frac{1}{2}$  contenant 2,46  $\mu\text{M}$  d'IBA, 2% de saccharose et 0,7% d'agar).

Les pourcentages d'enracinement varient fortement en fonction de la concentration de BA du milieu d'induction dont sont issus les agrégats. Les pousses formées sur les milieux d'induction contenant de faibles concentrations de BA s'enracinent mieux. Le maximum de rhizogenèse est enregistré sur les bourgeons provenant des milieux MS complétés de 2,21  $\mu\text{M}$  de BA, soit 88,1% de pousses enracinées. Les vitroplants enracinés obtenus sont ensuite acclimatés avec un taux de survie de 98%. Les jeunes plants ne présentent pas de malformations morphologiques après leur transfert en serre et semblent conformes aux plantes de semis. Les vitroplants ne présentent aucune anomalie visuelle. L'ensemble du processus depuis l'explant nodal jusqu'à l'obtention du vitroplant à travers l'induction d'agrégats de bourgeons, nécessite environ 13 semaines soit 2 semaines de moins par rapport aux autres protocoles publiés par Datta et al. (2007), Kumar et al. (2012) et Sharma et al. (2011).

### **3. Rôle et effets des suppléments d'hormones et d'acides organiques dans l'induction d'agrégats de bourgeons**

Les cytokinines et les auxines représentent les plus importants groupes d'hormones végétales. Leur équilibre dans le milieu nutritif régule la division cellulaire, le développement des explants et l'organogenèse. La BA est impliquée dans la croissance en épaisseur des pousses et assure le fonctionnement des zones génératrices. Quant à l'AIB à faible dose, elle intervient dans la

différenciation des bourgeons par le contrôle des gènes et le contrôle du transport des métabolites (Maxwell and Kieber, 2010). La BA et l'AIB agissent en interaction pour induire la formation des bourgeons.

Les acides aminés nécessaires aux différents processus métaboliques sont normalement synthétisés au sein des tissus végétaux. Cependant, l'apport exogène de la L-glutamine, la L-arginine et du sulfate d'adénine est indispensable pour la formation de nos agrégats de bourgeons. Les trois premiers composés sont des sources d'azote accessibles au niveau cellulaire et immédiatement utilisables pour le métabolisme. Ils ne stimulent pas la formation d'agrégats de bourgeons lorsqu'on les utilise séparément, mais agissent en synergie avec les régulateurs de croissance la BA et l'AIB (Razdan, 2002). Au cours de la morphogénèse, l'azote est souvent un facteur limitant pour les cellules végétales. Sous forme organique, il participe directement à la construction du squelette carboné (Higashi et al., 1996). Durant l'induction des agrégats de bourgeons, cet azote est rapidement intégré à d'autres acides aminés pour être incorporé aux protéines impliquées dans le processus de morphogénèse.

La L-glutamine permet de maintenir des taux de multiplication cellulaire et de croissance de tissus élevés chez *Arachis hypogaea* L. (Vasanth et al., 2006). Nos résultats montrent qu'elle est indispensable à la formation d'agrégats de bourgeons chez *J. curcas*. La glutamine et son dérivé le glutamate constituent les premières sources d'azote réduit dans la cellule. Grâce à l'acide glutamique qu'elle produit, la glutamine participe à la réduction du nitrate en ammoniac par la trans-amination au cours de laquelle, l'ammonium est incorporé aux acides aminés par l'action combinée de la glutamine synthétase GS et le glutamate synthase GOGAT (Miflin and Habash, 2002). La glutamine et le glutamate sont utilisés pour former l'aspartate et l'asparagine (Peoples and Gifford, 1993). Ce sont les éléments précurseurs des autres acides (aspartate, alanine, glycine...) et des protéines impliquées dans la morphogénèse et la formation des agrégats de bourgeons. Chez *Triticum aestivum* L., Shrivastava and Chawla (2001), ont montré que l'association de la glutamine en complément de la BA et de l'auxine augmentait le pourcentage de régénération de pousses de manière très significative (plus 55%).

La glutamine entraîne une augmentation du niveau de cytokinines totales et la baisse des auxines endogènes des explants en faveur de la formation de bourgeons (Mercier and Kerbauy, 1998). Chez *Pitcairnia flammaea* Lindley et *Vriesea philippocoburgii* Wawra, il a été constaté que le niveau de cytokinines totales dans les pousses dépendait de la source d'azote. Les pousses régénérées dans les milieux contenant la glutamine présentaient trois fois plus de cytokinines totales avec la 2-iP dominante dans les tissus. La 2-iP est reconnue comme l'une des formes les plus efficaces des cytokinines pour la prolifération des bourgeons (Lloyd and McCown, 1980). Malgré l'absence de racines, de nouvelles cytokinines sont synthétisées par les feuilles ou les régions méristématiques. Dieleman et al. (1997) ont aussi signalé la synthèse de nouvelles cytokinines notamment la 2-iP dans les feuilles de *Rosa hybrida* au cours de sa multiplication *in vitro*. La présence de la BA, la baisse du niveau d'AIB dans le milieu de culture et la synthèse de régulateurs de croissance endogènes grâce à la présence de la glutamine modifiant la balance hormonale, constituent les trois facteurs qui interagissent de façon synergique pour la multiplication des bourgeons et la formation d'agrégats de bourgeons.

La synthèse de la 2-iP endogène par les explants peut aussi expliquer la formation peu abondante voir l'absence de cal malgré la présence de la BA dans le milieu (Riseman and Chennareddy, 2004). La glutamine active aussi les enzymes protéolytiques et assure la régulation du NADH et du NADPH, molécules fournissant l'énergie nécessaire aux métabolismes cellulaires (Haroun et al., 2010).

Le sulfate d'adénine qui est largement utilisé dans les milieux de culture tissulaire a des effets similaires à ceux produits par les cytokinines et renforce l'action de ces dernières sur les explants. Il améliore la régénération et la croissance des vitroplants (Nwankwo and Krikorian, 1983). En présence de cytokinines, l'adénine favorise la régénération adventive indirecte à partir de cals (Xiang-Can et al., 1989) ou directe à partir d'explants (George et al., 2008). Sa présence dans le milieu n'est pas indispensable. Mais, elle améliore l'induction des agrégats de bourgeons. Elle intervient dans la sulfatation de certains gènes impliqués dans la biosynthèse d'enzymes, le fonctionnement des oligosaccharides et les molécules apparentées qui pourraient constituer une source immédiate de protéines ou des réserves de sucre (Ehrhardt et al., 1995).

L'arginine qui participe aussi à la formation des agrégats de bourgeons est un précurseur des polyamines que sont la putrescine, la spermidine et la spermine. Ces dernières sont considérées comme des régulateurs de croissance ou des messagers hormonaux secondaires. Elles sont synthétisées par décarboxylation de l'arginine (Silveira et al., 2004) et impliquées dans de nombreux processus cellulaires fondamentaux tels que la régulation de l'expression génique, la prolifération cellulaire (Paschalidis and Roubelakis-Angelakis, 2005), la modulation de la signalisation cellulaire (Fos et al., 2003), et la stabilisation de la membrane (Kusano et al., 2008). L'arginine module également la division cellulaire, l'augmentation de la taille des cellules, et la synthèse de l'ADN. Son association avec la glutamine dans le milieu MS diminue le taux de mortalité (Sotiropoulos et al., 2005).

La présence de l'acide citrique dans les milieux de culture *in vitro* améliore le métabolisme de l'ammonium (Gamborg, 1970). Selon Misra et al. (2010), l'acide citrique utilisé comme antioxydant dans la micropropagation de *J. curcas*, favorise globalement la croissance des pousses.

#### **4. Taux de multiplication et d'enracinement par rapport aux objectifs poursuivis**

L'application du protocole de régénération de plantes entières de *J. curcas* par induction d'agrégats de bourgeons serait plus performant grâce au taux moyen de multiplication élevé de 13,1 pousses/explant toutes les trois semaines. Cette technique pourrait contribuer à établir rapidement des exploitations à partir de clones élites. *J. curcas* est une plante pérenne. Les taux de multiplication les plus élevés sont cependant obtenus sur les milieux d'induction présentant de fortes concentrations de BA. Cette dernière a des effets négatifs sur le potentiel d'enracinement des pousses obtenues. En moyenne, seuls 55% de l'ensemble des pousses régénérées dans le milieu optimal MI3 forment des racines. Par contre, le milieu d'induction MI2 combiné à 20 mg/l de glutamine convient mieux car les pousses régénérées présentent les meilleurs pourcentages moyens d'enracinement de pousses.

La particularité de notre travail réside dans le fait que pour la première fois des agrégats de bourgeons d'origines axillaires et adventives sont formés simultanément de l'explant nodal sans

callogenèse préalable. La morphogénèse du pommier (Caboni et al., 2000), *Solanum melongena* Linn (Fournier et al., 1995), *Eucalyptus globulus* Labill (Trindade and Pais, 2003), *Eucalyptus camaldulensis* Dehn et *Trifolium fragiferum* Linn (Boxus, 1992) se manifeste par des structures similaires aux agrégats de bourgeons. Il s'agit d'agglomérats et nodules méristématiques, s'accompagnant de l'induction d'un cal. La régénération par le cal présente le risque de variations des clones obtenus. Chez *Eucalyptus camaldulensis* Dehn, Arezki et al. (2000) ont induit la régénération par des agglomérats méristématiques à partir du cal et des tissus de zones sous-jacents des bourgeons axillaires. Ils n'ont toutefois pas obtenu un développement simultané de bourgeons axillaires.

Par ailleurs, l'ensemble des protocoles établis pour la régénération par nodules ou des agglomérats méristématiques nécessitent une phase obscure (14 à 20 jours) à basses températures ( $24 \pm 2$  °C), contrairement aux agrégats de bourgeons où la température ambiante ( $28 \pm 2$  °C) et la photopériode (16 heures) restent constantes durant tout le processus de régénération. Ce qui rend la méthode beaucoup plus pratique à réaliser à grande échelle. Les taux d'enracinement et de survie en acclimatation sont aussi plus élevés comparativement à la micropropagation par bourgeonnement axillaire classique à partir d'explants nodaux. Par régénération à partir d'agrégats de bourgeons, les pousses sont obtenues simultanément par régénération adventive et axillaire. Ces pousses obtenues par bourgeonnement axillaires sont identiques aux pieds-mères.

### Références bibliographiques

- Arezki, O., Boxus, P., Kevers, C., and Gaspar, T. (2000). Hormonal control of proliferation in meristematic agglomerates of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* **36**, 398-401.
- Boxus (1992). Mass Propagation of Strawberry and New Alternatives for Some Horticultural Crops. *In "Transplant Production Systems"* (K. Kurata and T. Kozai, eds.), pp. 151-162. Springer Netherlands.
- Caboni, E., Lauri, P., and D'Angeli, S. (2000). *In vitro* plant regeneration from callus of shoot apices in apple shoot culture. *Plant Cell Reports* **19**, 755-760.

- Datta, M. M., Mukherjee, P., Ghosh, B., and Jha, T. B. (2007). *In vitro* clonal propagation of biodiesel plant (*Jatropha curcas* L.). *Current Science* **93**, 1438-1442.
- Dieleman, J. A., Verstappen, F. W. A., Nicander, B., Kuiper, D., Tillberg, E., and Tromp, J. (1997). Cytokinins in *Rosa hybrida* in relation to bud break. *Physiologia Plantarum* **99**, 456-464.
- Ehrhardt, D. W., Atkinson, M., Faull, K. F., Freedberg, D. N. I., Sutherlin, D. P., Armstrong, R., and Long, S. (1995). *In Vitro* Sulfotransferase Activity of NodH, a Nodulation Protein of *Rhizobium meliloti* Required for Host-Specific Nodulation. *Journal of Bacteriology* **21**, 6237-6245.
- Fos, M., Proaño, K., Alabadí, D., Nuez, F., Carbonell, J., and García-Martínez, J. L. (2003). Polyamine metabolism is altered in unpollinated parthenocarpic pat-2 tomato ovaries. *Plant Physiology* **131**, 359–366.
- Fournier, D., Lejeune, F., and Tourte, Y. (1995). Cytological events during the initiation of meristematic nodules in calli derived from eggplant protoplasts. *Biology of the Cell* **85**, 93-100.
- Francis, G., Edinger, R., and Becker, K. A. (2005). Concept for simultaneous wasteland reclamation, fuel production, and socio-economic development in degraded areas in India: need, potential and perspectives of *Jatropha* plantations. *Natural Resources Forum* **29**, 12-24.
- Gamborg, O. L. (1970). The effects of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture. *Plant Physiology* **45**, 372-375.
- George, E., Hall, M., and Klerk, G.-J. (2008). Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their Analogues and Antagonists. In "Plant Propagation by Tissue Culture", pp. 205-226. Springer, Dordrecht, Netherlands.
- Haroun, S. A., Shukry, W. M., and El-Sawy, O. (2010). Effect of asparagine or glutamine on growth and metabolic changes in *phaseolus vulgaris* under *in vitro* conditions. *Bioscience Research* **7**, 1-21.
- Higashi, K., Kamada, H., and Harada, H. (1996). The effects of reduced nitrogenous compound sugar in that glutamine synthase activity is involved in the development of somatic embryo carrot. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **45**, 109-114.

- Jingura, R. M. (2011). Technical options for optimization of production of *Jatropha* as a biofuel feedstock in arid and semi-arid areas of Zimbabwe. *Biomass and Bioenergy* **35**, 2127-2132.
- Kumar, A., Prasad, M. N. V., and Sytar, O. (2012). Lead toxicity, defense strategies and associated indicative biomarkers in *Talinum triangulare* grown hydroponically. *Chemosphere* **89**, 1056-1065.
- Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C., and Takahashi, Y. (2008). Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta* **228**, 367-381.
- Lloyd, G., and McCown, B. (1980). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. *Proceeding International Plant Propagators Society* **30**, 421-427.
- Maxwell, B., and Kieber, J. (2010). Cytokinin Signal Transduction. In "Plant Hormones" (P. J. Davies, ed.), pp. 329-357. Springer, Dordrecht, Netherlands.
- Mercier, H., and Kerbauy, G. B. (1998). Endogenous IAA and cytokinin levels in bromeliad shoots as influenced by glutamine and ammonium nitrate treatments. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* **10**, 225-228.
- Miflin, B. J., and Habash, D. Z. (2002). The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *Journal of Experimental Botany* **53**, 979-987.
- Misra, P., Toppo, D. D., Gupta, N., Chakrabarty, D., and Tuli, R. (2010). Effect of antioxidants and associate changes in antioxidant enzymes in controlling browning and necrosis of proliferating shoots of elite *Jatropha curcas* L. *Biomass and Bioenergy* **34**, 1861-1869.
- Nwankwo, B. A., and Krikorian, A. D. (1983). Morpho-genetic potential of embryo and seedling derived callus of *Elaeis guineensis* Jacq. var. *pisifera* Becc *Annals Botany* **51**, 65-76.
- Paschalidis, K. A., and Roubelakis-Angelakis, K. A. (2005). Spatial and temporal distribution of polyamine levels and polyamine anabolism in different organs/tissues of the tobacco plant: correlations with age, cell division/expansion, and differentiation. *Plant Physiology* **138**, 142-152.

- Peoples, M. B., and Gifford, R. M. (1993). Long distance transport of carbon and nitrogen from sources to sinks in higher plants. In "Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology" (D. Dennis and D. H. Turpin, eds.), pp. 434-447, New York, USA.
- Razdan, M. K. (2002). " Introduction to plant Tissue Culture. Second Edition," Oxford and IBH Publishing, New Delhi, India, 375 p.
- Riseman, A., and Chennareddy, S. (2004). Genotypique variation in the micropropagation of Sri Lankan *Exacum* hybrids. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **129**, 698-703.
- Sharma, S., Kumar, N., and Reddy, M. P. (2011). Regeneration in *Jatropha curcas*: Factors affecting the efficiency of *in vitro* regeneration. *Industrial Crops and Products* **34**, 943-951.
- Shrivastava, S., and Banerjee, M. (2009). Algal filtrate: A low cost substitute to synthetic growth regulators for direct organogenesis of embryo culture in *Jatropha curcas* (Ratanjyot). *Acta Physiologiae Plantarum* **31**, 1205-1212.
- Shrivastava, S., and Chawla, H. S. (2001). Synergistic effect of growth regulators and glutamine on regeneration response in high yielding cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding* **61**, 12-15.
- Silveira, V., Floh, E. I. S., Handro, W., and Guerra, M. P. (2004). Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **76**, 53-60.
- Sotiropoulos, T. E., Dimassi, K. N., and Therios, I. N. (2005). Effects of L-arginine and L-cysteine on growth, and chlorophyll and mineral contents of shoots of the apple rootstock EM 26 cultured *in vitro*. *Biologia Plantarum* **49**, 443-445.
- Trindade, H., and Pais, M. S. (2003). Meristematic nodule culture: A new pathway for *in vitro* propagation of *Eucalyptus globulus*. *Trees - Structure and Function* **17**, 308-315.
- Vasanth, K., Lakshmiprabha, A., and Jayabalan, N. (2006). Amino acids enhancing plant regeneration from cotyledon and embryonal axis of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Indian Journal Crop Science* **1**, 79-83.
- Xiang-Can, Z., Jones, D. A., and Kera, A. (1989). Regeneration of shoots on root explants of flax. *Annals of Botany* **63**, 297-299.



**PERSPECTIVES**



## Perspectives

L'obtention des plantules, tant par le bourgeonnement axillaire qu'adventif, nécessite un contrôle de la conformité génotypique. Celui-ci devrait être réalisé par les techniques de biologie moléculaire à savoir l'électrophorèse et la réaction en chaîne par polymérase (PCR). Le marquage moléculaire pourrait être réalisé par les isozymes, l'ISSR (Inter Simple Sequence Repeats, les microsatellites ou SSR (Single-Sequence Repeat) ou les SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Des amorces spécifiques aux séquences d'ADN propres à *J. curcas* devront être trouvées durant ces travaux. Les plants obtenus par la régénération adventive via l'induction d'agrégats de bourgeons présentent plus de risques de variations que ceux issus du développement des axillaires. Ce contrôle permettrait de vérifier si les vitroplants de *J. curcas* obtenus par induction d'agrégats de bourgeons à partir des explants nodaux conservent l'intégrité génétique des accessions et/ou écotypes qui ont servi de base pour le prélèvement des explants.

Par ailleurs, les performances agronomiques des vitroplants doivent être évaluées au champ pour estimer leur conformité avec les pieds-mères, en ce qui concerne le port, les rendements en graines, la qualité et la composition de l'huile. Il faudrait ensuite envisager la possibilité de supprimer la phase d'élongation dans le protocole afin de réduire la durée d'obtention des vitroplants. Pour ce faire, les travaux devront s'orienter vers l'obtention d'un enracinement direct à partir des fragments d'agrégats de bourgeons en fin de multiplication.

Les premiers essais réalisés dans le cadre de nos travaux ont permis de mettre au point un milieu d'enracinement optimal permettant d'obtenir jusqu'à 96% d'enracinement des pousses feuillées obtenues, avec un pourcentage de 98% de survie en acclimatation (Medza Mve et al., 2010). Cependant ce milieu d'enracinement ne présente pas la même efficacité sur les pousses obtenues via l'induction d'agrégats de bourgeons. Etant donné que l'efficacité d'un protocole de multiplication applicable à grande échelle repose en grande partie sur le potentiel d'enracinement des pousses régénérées, il serait donc nécessaire d'orienter les travaux ultérieurs vers un milieu intermédiaire ou de pré-conditionnement permettant d'améliorer les pourcentages d'enracinement des tiges.

Sur la base de nos travaux, il devrait également être possible d'évaluer la possibilité de recourir à des techniques avancées de multiplication plus performantes. Nous pensons tout particulièrement à l'embryogénèse somatique. L'objectif à terme serait d'élaborer un procédé industriel plus affiné à partir des clones élites. Les embryons somatiques pourront être induits à partir de cellules cultivées en suspension, ce qui rendrait possible une production en fermenteur et réduirait considérablement les coûts de production comme chez *Phoenix dactylifera* L. (Othmani et al., 2011), *Coffea canephora* var. *robusta* (Ducos et al., 2007; Etienne et al., 2006) ou *Paulownia elongata* S.Y. Hu (Ipekci and Gozukirmizi, 2003). Les manipulations pourront être simplifiées par rapport à la micropropagation conventionnelle qui nécessite plusieurs milieux différents pour la mise en culture, le développement des pousses et des racines en vue de l'obtention de plantules complètes à transférer au champ.

Les étapes à surmonter pour arriver aux semences artificielles passent par la maîtrise de l'embryogénèse et la régénération qui restent encore difficiles au stade actuel. De même, les cultures de cals et, plus encore, les cultures de cellules isolées, sont propices à l'apparition de mutations géniques pouvant être responsables d'une variabilité des plantes issues de la culture d'embryons somatiques. Le contrôle de cette variabilité permettra de produire des quantités très élevées de plantes à faible coût.

Lors de nos travaux, nous avons observé l'induction et la réversion florale sur les plants en condition *in vitro*. Des travaux ultérieurs devraient donc s'orienter dans l'exploitation cette capacité de *J. curcas*, qui pourraient jouer un rôle primordial pour l'amélioration et la création variétale. Cette mise en fleurs précoce en condition *in vitro* favoriserait l'obtention de têtes de clone par «rapid cycling» pour les hybridations, les transferts ou la fixation des gènes. Elle permettrait de contourner le long cycle naturel de la plante qui représente un facteur limitant dans un programme classique d'amélioration, passant par semis ou bouturage.

L'objectif de départ des travaux était de mettre au point un protocole de micropropagation applicable à grande échelle. Il serait aussi nécessaire de réaliser une étude socio-économique sur l'utilisation de cette technique et pour l'acceptabilité de cette nouvelle plante dans le contexte d'une agriculture

traditionnelle, cela permettra d'avoir une vision plus globale de la filière *J. curcas* et conduira à mieux cerner les interactions entre les coûts de production des vitroplants, le marché potentiel réel et l'acceptabilité des plants produits par les acteurs différents de la filière. Cette étude doit permettre de mieux comprendre les éléments qui pourraient faire toute la différence entre le succès, l'échec et l'application à grande échelle du protocole tels que les facteurs coûts de production et de vente des vitroplants produits, les modalités de mise en place des unités de production et les systèmes de distribution des vitroplants.

### Références bibliographiques

- Ducos, J. P., Labbe, G., Lambot, C., and Pétiard, V. (2007). Pilot scale process for the production of pre-germinated somatic embryos of selected robusta (*Coffea canephora*) clones. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* **43**, 652-659.
- Etienne, H., Dechamp, E., Barry-Etienne, D., and Bertrand, B. (2006). Bioreactors in coffee micropropagation. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **18**, 45-54.
- Ipekci, Z., and Gozukirmizi, N. (2003). Direct somatic embryogenesis and synthetic seed production from *Paulownia elongata*. *Plant Cell Reports* **22**, 16-24.
- Medza Mve, S. D., Mergeai, G., Baudoin, J. P., and Toussaint, A. (2010). Amélioration du taux de multiplication *in vitro* de *Jatropha curcas* L. *Tropicultura* **28**, 200-204.
- Othmani, A., Mzid, R., Bayouhd, C., Trifi, M., and Drira, N. (2011). Bioreactors and Automation in Date Palm Micropropagation. *In "Date Palm Biotechnology"* (J. Shri Mohan, M. Al-Khayri Jameel and V. Johnson Dennis, eds.), pp. 119-136. Springer Dordrecht, Netherlands.