



## Étude de l'influence du chlorure mercurique sur la survie *in vitro* d'explants et de l'aptitude à la régénération de teck (*Tectona grandis* L. f., Verbenaceae)

Corneille Ahanhanzo<sup>1\*</sup>, Hubert Adoukonou-Sagbadja<sup>1</sup>, Wilfred Yehouessi<sup>2</sup>, Léonard Ahoton<sup>2</sup>, Jean Cossi Ganglo<sup>2</sup>, Micheline Agassounon Djikpo-Tchibozo<sup>1</sup>, Arnaud Agbidinokoun<sup>1</sup> & Clément Agbangla<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Département de Génétique et des Biotechnologies, Faculté des Sciences et Techniques (FAST), Université d'Abomey-Calavi, 01BP 526, Cotonou, Benin

<sup>2</sup> Faculté des Sciences Agronomiques (FSA), Université d'Abomey-Calavi, Benin.

\* Correspondence: [corneillea@yahoo.com](mailto:corneillea@yahoo.com)

Original submitted in on 18<sup>th</sup> March 2013 Published online at [www.m.elewa.org](http://www.m.elewa.org) on 29<sup>th</sup> May 2013.

### RESUME

**Objectif :** Le teck (*Tectona grandis* L. f.) est un important bois d'œuvre au Bénin. Afin de contourner les difficultés de propagation de l'espèce par voie sexuée et de l'améliorer par les méthodes classiques de propagation par voie végétative, des essais de culture *in vitro* sur du matériel juvénile de teck ont été réalisés. L'objectif de cette étude est d'étudier la survie et l'aptitude à la régénération *in vitro* de deux variétés de teck cultivées afin de permettre leur micropropagation au Bénin.

**Méthodologie et résultats :** Ainsi, la concentration optimale de chlorure mercurique (HgCl<sub>2</sub>) et le temps d'immersion adéquat pour la désinfection d'explants de teck ont été déterminés. De plus, la variété qui présente une forte aptitude à la régénération a été identifiée. Les résultats de ces essais ont révélé qu'une concentration de 0.1% de désinfectant (HgCl<sub>2</sub>) combinée à un temps d'immersion de 10 minutes procure un taux optimal de survie des explants de teck mis en culture sur milieu nutritive MS dilué de moitié (MS/2). Par ailleurs, la variété dite locale s'est révélée plus apte à la régénération sur le même milieu de culture MS/2.

**Conclusion et application :** Cette étude a permis de retenir que la dose optimale de chlorure mercurique (HgCl<sub>2</sub>) qui procure un taux élevé de désinfection au niveau des microboutures de teck est de 0.1%. Par ailleurs, la balance hormonale entre le Benzylaminopurine et l'Acide Naphtalène Acétique n'a pas permis d'enregistrer un meilleur taux d'enracinement. Cette étude dans son intégrité laisse entrevoir de belles perspectives quant à la propagation du teck par culture *in vitro* au Bénin

**Mots clés :** Teck, variété, micropropagation, milieu de culture MS, chlorure mercurique

### ABSTRACT

**Objective:** The teak tree (*Tectona grandis* L. f.) is an important woody plant in Benin. To avoid the difficulties related to the propagation of this species, *in vitro* micropropagation tests on juvenile material of teak was conducted. The objective of this study was to study the survival and regeneration behavior of two teak varieties to allow their micropropagation in Benin.

**Methodology and results:** Thus, the optimal concentration of mercuric chloride (HgCl<sub>2</sub>) and immersion time for adequate disinfection of explants of teak was determined. The variety which had the highest regeneration ability was identified. The results of these tests showed that a 0.1% concentration of the disinfectant (HgCl<sub>2</sub>) combined with an immersion time of 10 minutes provided optimal rate of survival of teak explants grown on MS nutrient medium diluted by half (MS / 2). Moreover, the local variety was found to be more efficient in regeneration on the same culture medium MS/2.

**Conclusion and application:** This study revealed that the optimal dose of mercuric chloride (HgCl<sub>2</sub>) providing a high disinfection rate of teak explants was 0.1%. Besides, the hormonal balance between Benzylaminopurin and Naphtalen Acetic Acid did not generate a good rooting rate. These results indicate that valuable perspectives exist in term of teak micropropagation through *in vitro* tissue culture in Benin.

**Keywords:** Teak, variety, micropropagation, MS culture medium, mercuric chloride.

## INTRODUCTION

Le teck, (*Tectona grandis* L.f., Verbenaceae) est une essence de bois d'œuvre originaire d'Asie du Sud-est très appréciée pour son fort potentiel de croissance, la grande qualité de son bois, son imputrescibilité, son insensibilité presque complète aux variations d'humidité, sa bonne résistance aux divers agents tels que les termites et champignons (Azankpan, 2002). Il est de ce fait très utilisé pour les constructions navales et son bois a une excellente qualité technologique et fait l'objet d'un commerce fructueux entre le Benin, la sous-région ouest-africaine et l'Europe (Ganglo *et al.*, 2005). La demande mondiale est bien supérieure aux ressources disponibles (Dupuy, 1990). En effet, la consommation mondiale en bois rond industriel s'élève à 1 635 857 000 m<sup>3</sup> contre une production de 1 635 069 000 m<sup>3</sup> (FAO, 2009). D'après une étude réalisée sur la filière bois par MPREPE/BM en 1999, la consommation béninoise de bois d'œuvre était estimée à 112 000 m<sup>3</sup> de grumes par an dont 52000 m<sup>3</sup> de teck actuellement produit dans les plantations domaniales. Pour couvrir ce déficit et accroître la production, des actions de reboisement nécessitant l'utilisation de plants de meilleure qualité s'imposent. Le teck se propage traditionnellement par graines. Les semis peuvent être conservés quelques mois sous forme de « Stumps » à diverses fins : transport, attente de conditions de plantations satisfaisantes (Kaosa-ard, 1986). Ce mode de propagation sexuée présente néanmoins certains handicaps. Le nombre de graines produites par arbre est généralement faible, et la faculté germinative variable en fonction des origines, du mode de conservation et des traitements pratiqués (White, 1991, Kaosa-ard *et al.*,

1998), demeure globalement réduite. Par ailleurs, le matériel issu de semis se révèle hétérogène, même au sein des descendances, ce qui rend peu favorable la multiplication des génotypes élites (individus productifs). Cette variabilité s'exprime au niveau des paramètres de croissance et de forme, et des caractéristiques technologiques et esthétiques (Dupuy et Verhaegen, 1993). La sélection sur la hauteur du fût tend, en outre, à rallonger la durée des cycles de reproduction. Ce sont autant d'inconvénients auxquels se heurte l'amélioration génétique de l'espèce par voie sexuée, en plus de l'incertitude quant à l'héritabilité de certains caractères d'importance économique majeure.

La multiplication végétative permet de reproduire, théoriquement à l'infini, un individu en préservant son génotype et, en conséquence, l'ensemble de ses caractéristiques (Hartmann *et al.*, 1990). Cette particularité revêt une importance prépondérante pour assurer la transmission de caractères sous contrôle génétique de type non additif, surtout lorsque ceux-ci ont un fort impact économique. La reproduction végétative, et particulièrement le clonage conforme d'individus sélectionnés, devrait donc permettre d'améliorer considérablement la valeur marchande des plantations de teck en gagnant en qualité et en homogénéité (Mascarenhas et Muraudharan, 1993). Cependant, les méthodes traditionnelles de propagation végétative (greffage, bouturage ou marcottage) sont très limitées du fait d'un enracinement difficile et, comme chez la plupart des ligneux, d'un faible taux de reprise après transplantation (Ashiru et Quarcoo, 1971). L'utilisation de la technique du microbouturage *in*

*in vitro* chez la plupart des espèces ligneuses sauvages telles que *Dacryodes edulis* (Youmbi, 2000) ; *Irvingia gabonensis* (Fadjimi, 2007) ; *Hevea brasiliensis* (Ighere et al., 2011) a permis non seulement de contourner les difficultés de la multiplication végétative traditionnelle, mais aussi de favoriser la multiplication conforme (conservation des génotypes) des individus élites. Le microbouturage *in vitro* conduit alors à une production rapide et à grande échelle des clones. Toutefois, la réussite de la culture *in vitro* nécessite une désinfection adéquate du matériel végétal par utilisation des produits chimiques tels que l'eau de javel, le mercryl laurylé, le chlorure mercurique.

## MATERIEL ET METHODES

**Matériel végétal :** Le matériel végétal utilisé est constitué de deux génotypes de teck cultivés au Bénin: un génotype de provenance tanzanienne importée de la Tanzanie (Afrique de l'Est) dans la forêt de Kihuhwi (Ganglo, 1990) et un génotype qualifié de "local" du fait qu'il est issu des vieilles plantations de Toffo au sud du Bénin et plus précisément au bas du plateau d'Allada. Les semences ayant servi à la mise en place des plantations de Toffo dans les années 1950 provenaient du Togo et d'autres sources malheureusement inconnues (Ganglo, 1990).

**Méthodes :** Des fragments de tige de huit mois d'âge issus de plants germés à partir des graines de teck (Stumps) de chacune des deux variétés ont été obtenus dans une pépinière de teck localisée à "Tokan" dans l'arrondissement de "Togba", commune d'Abomey-Calavi (Bénin). Les "stumps" ont été ensuite plantés dans des pots en polyéthylène remplis de terreau stérilisé. L'ensemble a été placé dans la serre du Laboratoire de Génétique et des Biotechnologies de la Faculté des Sciences et Techniques (FAST), République du Bénin, puis entretenu de façon quotidienne jusqu'à l'obtention des plantes mères juvéniles. Trente jours après germination, les explants sont prélevés sur ces plantes mères. Ces explants sont constitués par des fragments de tiges portant au moins un nœud. Pour l'étude de l'influence de différentes concentrations de chlorure mercurique ( $HgCl_2$ ) et du temps d'immersion sur la survie des explants de *T. grandis*, la méthode utilisée pour le prélèvement et le prétraitement des explants est celle décrite par Malaurie et al. (1995), Doukouré (2000) et Ahanhanzo et al (2003). Les fragments de tiges prélevés sont débarrassés de leurs feuilles, rincés à l'eau distillée

L'usage de ce dernier s'est avéré plus efficace pour la désinfection des espèces ligneuses et herbacées (Ahanhanzo, 2008)

Le présent travail, focalisé sur la culture *in vitro* de deux variétés de teck très cultivées au Bénin (une variété locale et une variété tanzanienne), est une entame dans une perspective d'optimisation d'un protocole de micropropagation de ces deux variétés de teck cultivées au Bénin. Au cours de cette étude, l'influence de diverses concentrations de chlorure mercurique combinées à divers temps d'immersion sur la survie des explants et l'aptitude à la régénération *in vitro* de ces deux variétés de teck ont été étudiées.

stérile puis immergés dans l'alcool éthylique à 70° pendant cinq minutes. Ils sont ensuite trempés dans des solutions de chlorure mercurique à différentes concentrations (0.05%, 0.1%, 0.15% et 0.20%) contenant quelques gouttes de Tween 20 à divers temps d'immersion : 10 minutes, 20 minutes et 30 minutes. Chaque lot d'explants ainsi traité est ensuite rincé trois fois à l'eau distillée stérile. Après élimination de l'excès d'eau par dépôt des explants sur du papier buvard, les explants sont aseptiquement déposés sur le milieu de culture constitué par le milieu MS/2 additionné de 30 g de saccharose, le pH est ajusté à 5.7 et le milieu est solidifié avec 7g d'agar avant l'autoclavage pendant 20 minutes à 120°C. Après être ensemencés chacun par un explant, les tubes sont scellés avec du film transparent et puis sont placées dans une chambre de culture à 28°C±1°C à une intensité lumineuse de 5000 Lux, une humidité relative de 80% et à une photopériode de 12 heures de lumière par jour. Pour chaque combinaison de dose et de temps, dix microboutures sont mises en culture pendant la manipulation sur milieu nutritif MS/2 auquel on a ajouté 0.4mg/l d'acide naphthalène acétique (ANA) et 0.5mg/l de benzylaminopurine (BAP). Des observations journalières ont été réalisées pendant 30 jours afin de déterminer le taux de survie des explants, le taux d'infection et le taux de nécrose. Pour évaluer l'aptitude à la régénération des deux génotypes de *T. grandis*, les paramètres suivants ont été étudiés : le nombre de feuilles ; le nombre de nœuds ; le nombre de racines ; la longueur des tiges ; la masse fraîche et la masse sèche.

### Méthode analytique

**Mesures des paramètres :** Afin de retenir la dose efficace de chlorure mercurique et le temps d'immersion

efficace des microboutures dans le désinfectant, des prélèvements ont été effectués après 30 jours de culture dans la salle de culture. Ainsi les paramètres suivants ont été considérés :

- **Détermination du nombre de plants nécrosés** : La nécrose au niveau des explants se traduit par la mort des tissus présentant ainsi une couleur brune. Sa détermination a été faite par observation et dénombrement d'explants nécrosés.
- **Détermination du nombre de plants infectés** : L'infection due à l'explant et à une mauvaise manipulation se traduit par la présence de spores de champignon ou de voile d'aspect laiteux rose, jaune ou blanchâtre (cas des bactéries) dans la zone de contact entre les tissus et le milieu. Les spores de champignons peuvent également être observées sur les explants. Les plants présentant de pareils aspects ont été isolés puis dénombrés.
- **Détermination du nombre de plants sains** : Il s'agit de dénombrer les plants qui ne sont ni infectés ni nécrosés.

Par ailleurs, la réactivité des deux génotypes de teck, a été appréciée après trente jours de culture à travers les paramètres suivants :

- **Détermination du nombre de feuilles** : Elle a été faite par dénombrement des feuilles ouvertes sur chaque pousse.
- **Détermination du nombre de nœuds** : Elle a été faite par dénombrement du nombre de nœuds sur les microboutures des deux génotypes de teck cultivées *in vitro* ;
- **Détermination du nombre de racines** : Elle a été faite sur les jeunes pousses de teck en les observant dans le milieu de culture à travers les

tubes de verre transparents puis en dénombrant les racines formées ;

- **Détermination de la longueur des tiges** : La longueur des tiges a été obtenue au moyen d'une règle graduée au millimètre. A l'issue de la quatrième semaine d'entretien, les microboutures sont délicatement sorties des tubes à essai puis mesurées du collet à l'apex de la jeune pousse ;
- **Détermination de la masse fraîche** : Elle est obtenue par une pesée des jeunes pousses à la balance électronique de précision SCALTEC. Les plants ont été séparés des microboutures qui les portent avant leur pesée ;
- **Détermination de la masse sèche** : La masse sèche est déterminée par étuvage des vitroplants obtenus à 65°C pendant trois jours. Ces plants ont été individuellement enveloppés au préalable dans du papier aluminium. Des pesées ont été faites sur chacun des plants étuvés afin de déterminer la masse sèche.

**Analyse statistique des résultats** : Le dispositif expérimental utilisé pour l'étude de l'influence de la concentration du chlorure mercurique et la durée d'immersion sur la survie des explants est le Bloc Aléatoire Complet (BAC). La normalité et l'égalité des variances des données ont été vérifiées respectivement par le test de RYAN-JOINER et de LEVENE. La variable masse sèche ne répondant pas à la normalité, le test non paramétrique de Mann-Whitney a été appliqué après une transformation logarithmique. L'analyse de la variance (ANOVA) nous a permis de calculer les moyennes des différents variables étudiées. Ces différentes moyennes ont été classées par le test de Student-Newman-Keuls à l'aide du logiciel SAS 9.2 au seuil de 5%.

## RESULTATS

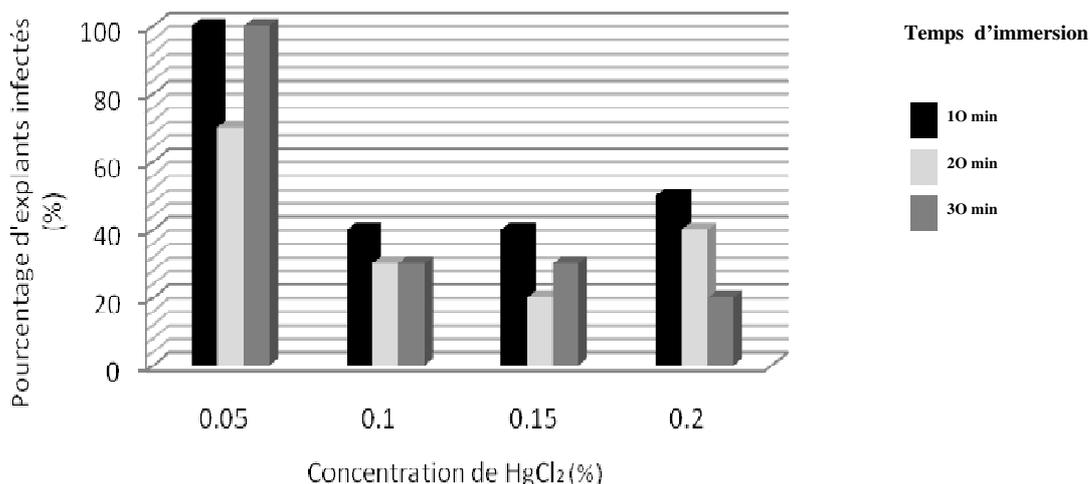
**Étude de l'influence des différentes concentrations de chlorure mercurique et différents temps d'immersion sur la survie *in vitro* d'explants de T. grandis** : L'utilisation du chlorure mercurique pour la désinfection des explants a conduit aux observations suivantes : certains explants ont été infectés par des bactéries et/ou des champignons, d'autres ont été nécrosés et d'autres se sont révélés sains c'est-à-dire qu'ils ne sont ni nécrosés ni infectés. L'expression des données en pourcentage par rapport au nombre total d'explants mis en culture a permis de quantifier les observations faites. Les résultats obtenus au bout de

trente jours d'observation sont présentés dans les figures 1, 2 et 3. Pour une immersion de 10 minutes, le pourcentage d'explants infectés passe de 100% pour une concentration de 0.05% de chlorure mercurique à respectivement 40% pour les concentrations de 0.1% et 0.15% de chlorure mercurique et 50% pour une concentration de 0.20% du désinfectant.

Lorsqu'on immerge les explants pendant 20 minutes, le pourcentage d'explants infectés est de 70% pour une concentration de désinfectant égale à 0.05%. Il diminue considérablement pour les concentrations 0.20% et 0.10% de désinfectant (respectivement 40% et 30%

d'explants infectés) puis prend sa plus faible valeur pour la concentration de 0.15% (20% d'explants infectés). Enfin, pour une immersion de 30 minutes, le pourcentage d'explants infectés prend sa valeur maximale qui est de 100% pour une concentration de 0.05% de chlorure mercurique et sa valeur minimale (20%) pour une

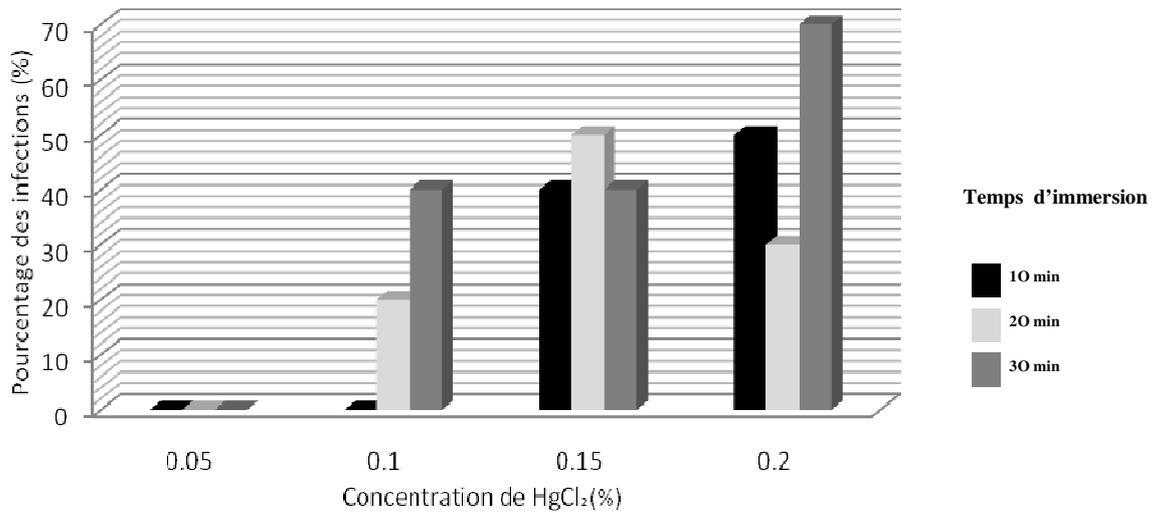
concentration de 0.20% de chlorure mercurique. Ceci indique d'une manière générale que le temps d'immersion influence faiblement l'infection des explants de teck. De plus, le chlorure mercurique est d'autant plus efficace sur la destruction des microorganismes que sa concentration est élevée.



**Figure 1.** Effet de différentes doses (0.05%, 0.10%, 0.15% et 0.20%) de Chlorure mercurique (HgCl<sub>2</sub>) sur l'infection des microboutures des variétés de teck cultivées *in vitro* à différents temps d'immersion (10min, 15min et 20min)

Le pourcentage d'explants nécrosés augmente au fur et à mesure que la concentration de chlorure mercurique augmente pour tous les temps d'immersion et atteint la valeur maximale à la plus grande concentration utilisée (Figure2). Ce pourcentage passe de 0% pour les concentrations de 0.05% et 0.1% de chlorure mercurique à respectivement 40% et 50% pour les concentrations de 0.15% et 0.20% de désinfectant lorsqu'on fait une immersion de 10 minutes. La même tendance est observée pour une immersion de 30 minutes des explants de teck. En revanche, pour une immersion de 20

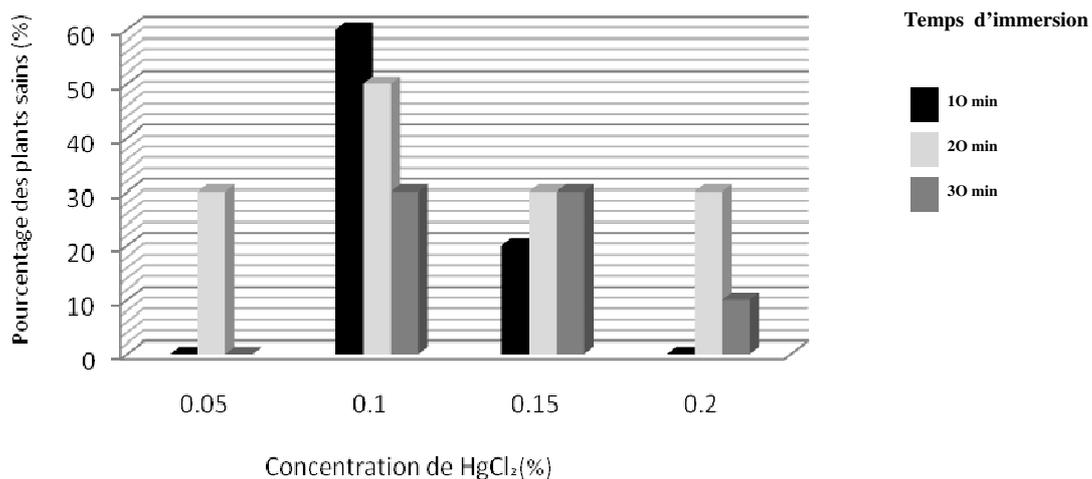
minutes, le pourcentage d'explants nécrosés passe de 0% pour une concentration de 0.05% de HgCl<sub>2</sub> à 20% et à 50% d'explants nécrosés respectivement pour des concentrations de 0.10% et de 0.15% du même désinfectant pour enfin chuter à un pourcentage plus bas (30% d'explants nécrosés) lorsque l'on augmente la concentration de désinfectant à 0.20%. Ainsi, lorsqu'on élève la concentration du Chlorure mercurique, ce dernier a un effet destructeur sur les tissus des explants : la nécrose.



**Figure 2 :** Effet de différentes doses (0.05%, 0.10%, 0.15% et 0.20%) de Chlorure mercurique (HgCl<sub>2</sub>) sur la nécrose des microboutures des variétés de teck cultivées *in vitro* à différents temps d'immersion (10min, 15min et 20min).

Pour une immersion de 10 minutes, le pourcentage des explants sains (non infectés et non nécrosés) est nul pour une concentration de 0.05% et 0.20% de HgCl<sub>2</sub>, est de 20% pour 0.15% de HgCl<sub>2</sub> et prend sa valeur maximale (60%) pour une concentration de 0.1% du désinfectant utilisé. Pour des temps d'immersion de plus en plus longs, le pourcentage d'explants sains diminue jusqu'à 30%. Il ressort de ses observations qu'une concentration de 0.1% de Chlorure mercurique s'est révélée efficace

sur les explants de teck pendant une courte durée d'immersion de 10 minutes. Le test de Student Newman Keuls confirme que la concentration 0.1% de HgCl<sub>2</sub> combinée avec une immersion de 10 minutes des explants de teck permet d'avoir le nombre d'explants sains le plus élevé : c'est la concentration qui offre une efficacité optimale. Cette concentration a été utilisée pour la désinfection des explants au niveau du deuxième essai.



**Figure 3 :** Effet de différentes doses (0.5%, 0.10%, 0.15% et 0.20%) de Chlorure mercurique (HgCl<sub>2</sub>) sur la survie des variétés de teck cultivées *in vitro* à différents temps d'immersion (10min, 15min et 20min).

**Étude de l'influence du génotype sur la régénération du teck :** Les résultats obtenus sur l'influence du génotype et en tenant compte du milieu MS/2 supplémenté de 0.5mg.L<sup>-1</sup>de BAP et de 0.4mg.L<sup>-1</sup>d'ANA sur la régénération du teck *in vitro* sont consignés dans le tableau 1. L'analyse de ce tableau, révèle globalement une supériorité significative de la variété locale par rapport à la variété tanzanienne. Les probabilités liées au

test t appliqué aux paramètres indiquent en effet dans chaque cas une différence significative entre les deux variétés. La figure 4 illustre l'aspect des plantules régénérées des deux variétés. De plus, on note que l'apparition des racines, bien que tardive est plus remarquée chez la variété locale (Figure 5). Le génotype joue un rôle très important dans l'organogenèse des plantes.

**Tableau 1.** Moyenne (m), erreur-type (s) et probabilité du test t de comparaison des deux variétés de Teck.

Paramètres		VL	VT	Prob.
NMD	M	0.733	0.333	0.002
	S	0.085	0.085	
NF	M	2.467	1.067	0.004
	S	0.330	0.330	
NN	M	0.567	0.233	0.035
	S	0.109	0.109	
HP	M	0.730	0.240	0.002**
	S	0.122	0.122	
MF	M	29.580	9.643	0.001**
	S	4.655	4.655	
MS	M	1.365	0.486	0.001*
	S	0.157	0.157	
NR	M	0.083	0.000	0.086**
	S	0.034	0.034	

\* : probabilité liée au test de Mann-Whitney ;

\*\* : probabilité liée au test t sur des données transformées log.

VL= Variété locale ; VT= Variété tanzanienne ; NMD= Nombre de Microboutures Débouffées ; NF= Nombre de feuilles ; NN= Nombre de nœuds ; HP= Hauteur des pousses ; MF= Masse Fraîche ; MS= Masse Sèche ; NR= Nombre de Racine.



**Figure 4:** Jeunes plantules des deux variétés de teck obtenues après 30 jours de culture sur milieu MS/2 supplémenté de 0.5mg.L<sup>-1</sup>de BAP et de 0.4mg.L<sup>-1</sup>d'ANA. (A = variété tanzanienne ; B= variété locale)

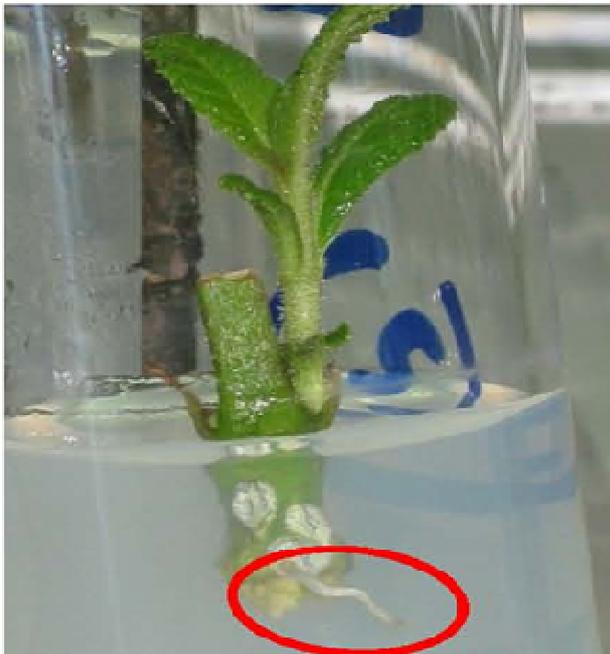


Figure 5 : Début d'enracinement du Teck local

## DISCUSSION

Les résultats des figures 1 et 2 ont révélé que l'infection et la nécrose sont les principaux problèmes à maîtriser lors de l'établissement des cultures *in vitro*. Ces observations confirment celles réalisées par d'autres études sur l'influence du chlorure mercurique sur la survie *in vitro* d'explants de différents génotypes d'ignames (Ahanhanzo *et al.*, 2008). Le fort taux de survie (60% de microboutures saines) atteste que le chlorure mercurique est efficace pour la désinfection des microboutures de teck. Ce résultat est confirmé par la baisse considérable du taux d'infection obtenue par Ahanhanzo *et al.* (2009) qui ont utilisé le chlorure mercurique 0.1% comme désinfectant sur *Ocimum gratissimum* à la place de l'hypochlorite de sodium à 10%. Mentionnons que l'hypochlorite de sodium est le désinfectant le plus utilisé (Lopez-Aranda, 1994 ; Boxus, 1984) pour l'initiation *in vitro* des explants. Cependant, ces auteurs ont reconnu que les infections internes du matériel (microboutures) ne peuvent être éliminées par désinfection superficielle. Ceci est dû au fait que le degré du pouvoir désinfectant de l'hypochlorite de sodium est fonction de la quantité du chlore libre et du pH. C'est pourquoi, Pierik (1987), a ajouté des antibiotiques au milieu de culture pour faire efficacement la culture de méristèmes. Les études antérieures réalisées par Ahanhanzo *et al.* (2009) ont révélées qu'une dose de 0.1% de chlorure mercurique à une action destructrice sur des tissus de jeunes

microboutures d'*Oximum*. Toutefois, une déduction sur l'effet nocif du désinfectant ne saurait être vérifiée. En effet, Malaurie *et al.* (1993) et Doukouré (2000) ont obtenu de forts taux de survie sur plusieurs génotypes de *Dioscorea sp.* en les désinfectant par une dose de 1% de chlorure mercurique. Aussi, Brhadda (2003) a-t-il utilisé une concentration approximative (0.67%) du même désinfectant sur des espèces ligneuses d'*Olea europaea L.* et a obtenu un fort taux de survie. Au cours de nos essais, des doses de plus en plus élevées (0.15%, 0.20%) de chlorure mercurique ont impliqué de fort taux de nécroses sur les microboutures de teck utilisé. De même, une faible dose de désinfectant (0.05%) a engendré le plus fort taux d'infection. Par ailleurs, un taux élevé du chlorure mercurique (1%) sur des microboutures d'*Atriplex halimus L.* (espèce ligneuse) prélevées sur de plantes mères âgées de trente ans a permis d'obtenir un taux élevé de survie égale à (85%) (Souayah *et al.*, 2000 ; Bouzid *et al.*, 2004). Ce taux est bas (5 à 30%) pour une désinfection au  $HgCl_2$  des portions d'axe végétatives de diamètre inférieur à 1.5 cm de teck. Il ressort de tout ceci que l'efficacité du produit désinfectant (le  $HgCl_2$  dans le cas d'espèce) serait liée aux facteurs inhérents à l'espèce végétale étudiée (âge, espèce, diamètre...) et à d'autres paramètres tels que la dose du produit désinfectant et le temps d'immersion. Dans le cadre de notre expérimentation, le temps d'immersion n'a

eu aucune influence sur l'efficacité du produit. En ce qui concerne la régénération des deux variétés de teck cultivées, on a noté une reprise des bourgeons axillaires sur le milieu de culture (MS/2) supplémenté de BAP (0.5mg.L<sup>-1</sup>) et d'ANA (0.4mg.L<sup>-1</sup>) avec apparition de pousses feuillées. Cependant, on remarque un quasi absence de racines sur la majorité des pousses régénérées. L'apport de cytokinines dans le milieu MS paraît donc indispensable pour stimuler la régénération *in vitro* de boutures nodales des espèces ligneuses. En effet, les études réalisées sur la pomme sauvage (*Irvingia gabonensis*) ont indiqué que le milieu MS/4 supplémenté de 0.2mg/L de kinétine est favorable à la régénération avec l'obtention des pousses feuillées et des racines. Par contre, en présence d'ANA (0.1mg), la formation des pousses est inhibée (Fajimi et al., 2007). Le faible taux d'enracinement enregistré serait donc dû à une inhibition par l'apport de l'ANA à dose élevée. Toutefois, Ighere et al., (2011) ont rapporté que l'établissement *in vitro* de l'hévéa (*Hevea brasiliensis*) est optimal dans le milieu MS

## CONCLUSION

Les résultats obtenus dans cette étude indiquent que la dose optimale de chlorure mercurique (HgCl<sub>2</sub>) qui procure un taux élevé de désinfection au niveau des microboutures de teck est de 0.1%. Aussi, la variété locale de teck a-t-elle mieux régénérée en culture *in vitro* que celle de la provenance tanzanienne. Par ailleurs, la

supplémenté de 0.075mg/L de BAP et de 0.01mg/L d'ANA avec la formation de pousses feuillées et l'apparition de racines pivotantes. La réponse des explants varie de ce fait en fonction de l'espèce. Par ailleurs, nos résultats affichent de façon générale que la prolifération des microboutures s'est faite plus remarquée chez la variété locale (73,33%) que chez la variété tanzanienne (33,33%). Ce constat nous amène à déduire que la régénération *in vitro* des espèces ligneuses comme le cas présent du teck dépend du génotype. En effet, les travaux réalisés par Ahanhanzo et al. (2010) sur différents génotypes d'ignames ont montré que la réponse des microboutures à l'action des cytokinines dépend du génotype de la plante. Ces résultats sont aussi en accord avec les travaux réalisés sur le fraisier, lesquels ont révélé que le potentiel organogène chez cette espèce, est hautement dépendant du génotype et à un certain degré du type d'explant (Isaac et al., 1994).

balance hormonale entre le Benzylaminopurine et l'Acide Naphtalène Acétique n'a pas permis d'enregistrer un meilleur taux d'enracinement. Cette étude dans son intégrité laisse entrevoir de belles perspectives quant à la propagation du teck par culture *in vitro* au Bénin.

## REFERENCES

- Ahanhanzo C, Agbangla C, Toukourou F, Dansi A, et Daïnou O, 2003. Microbouturage et conservation *in vitro* des ressources génétiques d'ignames cultivées au Bénin. Annales des Sciences Agronomiques du Bénin 6 (1) : 89-102.
- Ahanhanzo C, Agbangla C, Dangou J, Toukourou F, Dansi A, Montcho, D, 2008. Influence du chlorure mercurique et de la cytokinine sur la survie et la morphogenèse *in vitro* d'explants de différents génotypes d'ignames (*Dioscorea spp.*). Annales des Sciences Agronomiques du Bénin 11 (1) 33-47.
- Ahanhanzo C, Dossoukpevi R, Agassounon Djikpo Tchibozo M, Agbangla C, Dramane K, 2009. Contribution à l'optimisation des conditions de culture *in vitro* de deux espèces d'*Ocimum spp.* (Lamiaceae) et étude de l'influence des manipulations *in vitro* sur la teneur et la qualité de leur acide désoxyribonucléique (ADN). rev. comes - série a, vol. 09.
- Ahanhanzo C, Gandonou CH, Agbidinokoun A, Dansi A, Agbangla C, 2010. Effect of two cytokinins in combination with acetic acid  $\alpha$ -naphthalene on yams (*discorea spp.*) genotype's response to *in vitro* morphogenesis. African Journal of Biotechnology vol. 9 (51), pp. 8837- 8843.
- Ashiru GA, Quarcoo T, 1971. Vegetative propagation of kola (*Cola nitida* (vent) Schott and endlicher), trop. agric. 48 (1) 85-92.
- Azankpan DJ, 2002. Étude comparative des performances sylvicoles et technologiques de deux provenances de teck (*Tectona grandis* l. f) dans la forêt classée du lama. Thèse d'ingénieur agronome. Faculté des Sciences Agronomiques, Université d'Abomey-Calavi. République du Bénin. 103 p.
- Bouزيد S, Khouja ML, Rejeb MN, Souayah N, 2004. Micropropagation d'un arbuste sylvo-pastoral, *Atriplex halimus* l. (Chenopodiaceae). In : ferchichia. (comp.), ferchichia. (collab.). Réhabilitation des pâturages et des parcours en

- milieux méditerranéens. Zaragoza: ciheam. 131-135.
- Boxus P, Damiano C, Brasseur E, 1984. Strawberry. In ammirato P.V., Evans D.A., Sharp W.R., Yamada Y - handbook of plant cell culture, vol. 3, New York: Macmillan, 453-486.
- Bhadda N, Abousalim A, Walali IDM, 2003. Effets du milieu de culture et de la lumière sur l'embryogenèse somatique de l'olivier (*Olea europaea* L.) cv picholine marocaine. Fruit 85 (3), p. 1-14.
- Cheliak WM, Rogers DL, 1990. Integrating biotechnology into tree improvement programs. Can. J. For. Res. 20: 452-463. cftf, 1990. Teck. Bois et forêts des tropiques, 224 : 39-47.
- Doukoure S, 2000. Amélioration de la production de l'igname, par bouturage *in vitro*, chez les cultivars florido et brazo fuerte de *D. alata* L. Thèse de doctorat-ingénieur uni. de Cocody, Côte d'Ivoire, 123p.
- Dupuy B, 1990. Notes de voyage en chine tropicale lors d'un séminaire régional sur le teck. Bois et forêts des tropiques 226 : 69-76.
- Dupuy B, and Verhaegen D, 1993. Le teck de plantation *Tectona grandis* en Côte-d'Ivoire. Bois et forêts des tropiques, 235 : 9-24.
- Fajimi O, Sarumi MB, Olayode MN, Gamra EO, Sanusi SI, 2007. *In vitro* propagation of *Irvingia gabonensis*. African Journal of Biotechnology vol. 6 (8), 976-978.
- FAO, 2009. Situation des forêts du monde. 129 p
- Ganglo JC, 1990. Étude du comportement de deux provenances de teck (*Tectona grandis* L.f.) dans des plantations forestières de la lama-nord. Rapport technique. Office nationale du bois (onab) 10p.
- Ganglo JC and de Foucault B, (2005): Le groupement végétal à *Icacina trichantha* Oliv. dans le sous-bois naturel des plantations de Teck (*Tectona grandis* L. f.) du sud et du centre-Bénin: composition et diversité floristique, valeurs indicatrices écologique et sylvicole, Acta Botanica Gallica, 152:3, 389-402.
- Haines R, 1994. Biotechnology in forest tree improvement. Rome, Italie, FAO. Forestry paper 118, 230.
- Hartmann HT, Kester DE, Davies FT, 1990. Plant propagation: principles and practices, 5<sup>e</sup> éd. Englewood cliffs, New Jersey, USA. 647p.
- Ighere Dickson A, Anthony O, Jammadine E, Olayode M, Fajimi O, Sunday A, 2011. *In vitro* culture of *Hevea brasiliensis* (rubber tree) embryo. Journal of Plant breeding and crop science vol. 3(9), 185-189.
- Isac V, Popescu A, Coman M, 1994. Studies on plant regeneration from tissue-derived callus in *fragaria x ananassa* duch. - in Schmidt's (h.), Kellerhals (m.) progress in temperate fruit breeding, kluwer academic publishers, 395-398.
- Kaosa-ard A, 1986. Teak, *Tectona grandis* linn. f.: nursery techniques, with special reference to Thailand. Seed leaflet n°4. Humlebaek, Danemark, Danida Forest Seed Center, 42p.
- Kaosa-ard A, Suangtho V. and Kjaer E.D. 1998. Experience from tree improvement of teak (*Tectona grandis*) in Thailand. DANIDA Technical Note 50: 14.
- López-aranda JM, Pliego-alfaro F, López-navidad I, Barcelómuñoz M, 1994. Micropropagation of strawberry (*Fragaria x ananassa* duch.). Effect of mineral salts, benzyladenine levels and number of subcultures on the *in vitro* and field behaviour of the obtained microplants and the fruiting capacity of their progeny. j. hortic. sci., 625-637.
- Mascarenhas AF, Muralidharan EM, 1993. Clonal forestry ii, conservation and application. Berlin, heidelberg, allemagne, springer verlag, 169-187.
- Murashige T, Skoog F, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *physiol plant*; 15: 473-97.
- Pierik RLM, 1987. Commercial micropropagation in western Europe and Israel.-in Debergh (P.C.), Zimmerman (r.h.) *micropropagation* technology and application. Dordrecht, the Netherlands: kluwer academic publishers, 155-165.
- White KJ, 1991. Teak: some aspects of research and development. FAO regional office for Asia and the pacific (rapa), publication 17- 53.
- Souayah N, 2000. Nouvelles possibilités d'obtention et de multiplication rapide de clones d'*Atriplex halimus* L. par micropropagation *in vitro* à partir d'organes végétatifs et reproducteurs. Approches morphogénétiques et physiologiques. Thèse de doctorat en biologie. fac.sc. de Tunis. Tunisie.172 p.
- Youmbi E, 2000. Potentialités de régénération *in vitro* de nœud cotylédonaire chez *Dacryodes edulis*, fruits 55 409-419.