

Induction et prolifération de cals à partir de l'axe embryonnaire du Voandzou [*Vigna subterranea* (L.) Verdc. Fabaceae] : effet de la segmentation de l'explant, des phytohormones, de la source de carbone et du génotype

Siriki KONATE^{2*}, Mongomaké KONE¹, Edmond Kouablan KOFFI³, Michel ZOUZOU² et Justin Yatty KOUADIO¹

¹ Université Nangui-Abrogoua, UFR des Sciences de la Nature, Laboratoire de Biologie et Amélioration des Productions Végétales ; 02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire

² Université Felix Houphouët Boigny, UFR des Biosciences, Laboratoire de Physiologie Végétale, 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire

³ Centre National de Recherche Agronomique, Laboratoire Central de Biotechnologie, Unité de Ressources génétiques, 01 BP 1740 Abidjan Adiopodoumé, KM 17, Route de Dabou, Côte d'Ivoire

* Correspondance, courriel : kngolosiriki78@yahoo.fr

Résumé

Le Voandzou [*Vigna subterranea*, (L.) Verdc.], occupe une place importante dans les stratégies élaborées pour assurer la sécurité alimentaire en Afrique subsaharienne. Le développement de systèmes de régénération *in vitro* de plantes, préalable au transfert de gènes nécessite l'établissement de conditions optimales de la callogenèse. Au cours du présent travail, l'étude des facteurs influençant l'induction et la prolifération des cals chez le Voandzou a été réalisée. L'axe embryonnaire issu de graines matures a été placé sur le milieu de base de Murashige et Skoog (1962) additionné avec les vitamines B₅ et supplémenté avec différentes concentrations et combinaisons de phytohormones. Après quatre semaines de culture, les résultats ont montré que l'induction et la prolifération de cals ont été favorisées avec le 2,4-D (0,5 mg/l). La partie basale de l'axe embryonnaire a été la zone la plus favorable à la callogenèse. La meilleure source de carbone a été le saccharose à la concentration optimale de 84 mM. Les meilleurs taux d'induction (100 %) et de prolifération de cals (3) ont été exprimés avec les écotypes Ci2, Ci3, Ci4, Ci5, Ci6, Ci7, Ci10 et Ci21.

Mots-clés : *voandzou, axe embryonnaire, callogenèse, phytohormones.*

Abstract

Callus induction and proliferation from embryonic axis in Bambara groundnut [*Vigna subterranea* (L.) Verdc. Fabaceae]: effect of explants section, plant growth regulators, carbon source and genotype

Bambara groundnut [*Vigna subterranea* (L.) Verdc.] contributes to food security in sub-Saharan Africa. Development of efficient systems of *in vitro* plant regeneration a prerequisite to gene transfer requires establishment of optimal conditions for callus formation. In this work, factors influencing callus induction and proliferation in Bambara have been studied. Embryonic axis derived mature seeds were placed on Murashige and Skoog (1962) medium supplemented with vitamins B₅ (MSB₅), including different

concentrations and combinations of plant growth regulators. After four weeks of culture, results showed that 2,4-D (0.5 mg/L) exhibited the best frequency and proliferation index of callus. Basal part of embryonic axis was the explants of choice for callus induction and proliferation. Sucrose at optimum concentration of 84 mM was favorable to the process of callus formation. Highest callus induction frequency (100 %) and proliferation index (3) were expressed by ecotypes Ci2, Ci3, Ci4, Ci5, Ci6, Ci7, Ci10 and Ci21.

Keywords : *bambara groundnut, embryonic axis, callogenesis, plant growth regulators.*

1. Introduction

Le Voandzou [*Vigna subterranea* (L.) Verdc], est généralement cultivé et consommé en Afrique au Sud du Sahara [1]. En termes de production et de consommation, la plante occupe le troisième rang des légumineuses à graines, après l'arachide et le haricot [2]. Les graines fournissent une alimentation complète car elles renferment d'importantes quantités de protéines, de glucides et de lipides [3-4]. La plante joue également un rôle important dans les systèmes de rotation des cultures à travers la fertilisation des sols [5]. Malgré cette importance, de nombreux facteurs limitent la vulgarisation du Voandzou. Les phytates, les oxalates et les tanins altèrent la qualité des graines et réduisent leur teneur en protéines [6]. La plante est susceptible aux maladies et aux attaques des insectes au cours de son cycle de développement [7]. Les graines en cours de conservation sont attaquées par de nombreux insectes et principalement, les bruches [8]. De même, les rendements demeurent faibles et imprédictibles.

Pour surmonter ces contraintes culturelles, des avancées récentes dans le domaine des cultures *in vitro* ont permis le développement de nouvelles techniques d'amélioration des espèces végétales. Toutefois, un préalable indispensable à l'utilisation des méthodes biotechnologiques pour l'amélioration génétique du Voandzou est le développement de systèmes efficaces de régénération *in vitro* de plantes. Cette régénération peut se faire par la voie de l'embryogenèse somatique et/ou de l'organogenèse, directement ou indirectement par l'intermédiaire d'une phase de cals [9]. Les cals représentent un matériel de choix en culture de tissus. Ils sont utilisés pour développer les cultures de suspensions cellulaires et de protoplastes. La sélection *in vitro* vis-à-vis de stress biotique et abiotique se fait également à partir de culture de cals. Les légumineuses sont généralement récalcitrantes à la callogenèse. La plupart des travaux réalisés chez le Voandzou indiquent une faible aptitude à la callogenèse [10-11]. Les explants couramment utilisés sont l'apex, le cotylédon et le nœud cotylédonnaire. Avant le développement de méthodes de régénération *in vitro* et vu l'importance des cals, la présente étude vise à développer chez le Voandzou, un protocole efficient d'induction et de prolifération de cals à partir de l'axe embryonnaire. Les objectifs spécifiques de ce travail consistent à : (i) identifier la partie la plus réactive de l'axe embryonnaire ; (ii) déterminer la combinaison et la concentration optimales de phytohormones et (iii) évaluer la réponse de divers génotypes à la formation des cals.

2. Matériel et méthodes

2-1. Matériel végétal

L'étude a été réalisée au Laboratoire de Biologie et Amélioration des Productions Végétales de l'UFR Sciences de la Nature à l'Université Nangui-Abrogroua (Côte d'Ivoire). L'axe embryonnaire, utilisé comme explant, a été prélevé à partir de graines matures de Voandzou. Ces graines ont été récoltées sur les parcelles expérimentales établies dans la région nord du pays au cours de la campagne 2010-2011.

2-2. Méthodes

2-2-1. Désinfection en surface des graines et préparation de l'explant

Les graines ont subi un trempage rapide (1min) dans l'éthanol 70 % (v/v), suivi de l'immersion pendant 30 min dans l'hypochlorite de calcium 7 % (m/v). Elles ont ensuite été abondamment rincées dans de l'eau distillée stérile. Après 48 heures d'imbibition à l'obscurité, les graines ont été débarrassées de leurs téguments. Les cotylédons ont soigneusement été excisés à l'aide d'une pince et d'un scalpel puis l'axe embryonnaire a été isolé. Cet axe a été utilisé en entier ou sectionné en zones apicale et basale. Toutes ces opérations ont été réalisées sous une hotte à flux laminaire.

2-2-2. Préparation et incubation des milieux de culture

Pour toutes les expériences réalisées, le milieu de base de Murashige et Skoog [12] additionné des vitamines B₅ de Gamborg [13] a été utilisé. Le pH a été ajusté à 5,5 avec le NaOH (0,1 N) ou le HCl (0,1N). Ensuite, le milieu a été stérilisé à l'autoclave pendant 30 min sous une pression de 1 bar et une température de 121 °C. Le milieu a été réparti sous la hotte en raison de 25ml / boîte de Pétri. Les explants ont ensuite été placés à la surface des milieux et l'ensemble a été incubé dans une salle de culture.

2-2-3. Influence du type et de la concentration d'auxine

L'axe embryonnaire a été placé sur le milieu MS + Vit. B₅ supplémenté respectivement avec l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D), l'acide α -naphtalène acétique (ANA) et le picloram (Pic) aux concentrations 0,1 - 0,5 - 1 - 2 - 5 et 10 mg/L.

2-2-4. Influence de la segmentation de l'axe embryonnaire

La concentration optimale de l'auxine ayant exprimé la meilleure réponse dans l'expérience précédente a été utilisée. L'axe embryonnaire excisé en trois parties (apicale, basale et entier) a été utilisé comme explant.

2-2-5. Effet de l'association des cytokinines avec le 2,4-D (0,5 mg /L)

L'explant axe embryonnaire basal (AEB) a été placé sur le milieu MS + Vit. B₅. Dans ce milieu, le 2,4-D à la concentration 0,5 mg/L a été combiné avec les concentrations 0,1 - 0,5 et 1 mg/L de Benzylaminopurine (BAP), de Kinétine (Kin), de Zéatine (Zea) ou de Thidiazuron (Tdz).

2-2-6. Effet de la concentration de saccharose

La combinaison optimale d'auxine et de cytokinine a été ajoutée au milieu MSB₅. Ces milieux ont été additionnés de saccharose aux concentrations : 28 ; 84 ; 168 et 252 mM.

2-2-7. Effet de différentes sources de carbone

Les milieux de culture MS + Vit. B₅ additionnés à la combinaison optimale d'auxine et de cytokinine ont été supplémentés avec différentes sources de carbone (saccharose, glucose, fructose et maltose) à la concentration optimale de saccharose préalablement déterminée.

2-2-8. Influence du génotype

La combinaison optimale d'auxine, de cytokinine et de sucre a été additionnée au milieu MSB₅. L'explant axe embryonnaire basale des écotypes Ci2 - Ci3 - Ci4 - Ci5 - Ci6 - Ci7 - Ci10 - Ci12 et Ci21 a été placé sur ce milieu.

2-2-9. Dispositif expérimental et conditions de culture

Pour toutes les expériences réalisées, les boîtes de Pétri ont été placées sur les étagères de la salle de culture suivant un dispositif complètement aléatoire. Quinze explants par traitement et trois répétitions indépendantes (soit 45 observations pour chaque traitement) ont été réalisées. L'incubation des cultures a été réalisée sous les conditions suivantes : un cycle photopériodique de 16/8 h (16 h d'éclairage et 8 h d'obscurité), une température de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, une hygrométrie de 70 % (humidité relative) et une intensité lumineuse de 2000 lux fournie par des lampes fluorescentes blanches. Le taux d'induction des cals et l'intensité de prolifération des cals ont été évalués après quatre semaines de culture.

2-2-10. Analyse statistique

L'analyse statistique des données a été réalisée à l'aide du logiciel STATISTICA version 6.0 selon la procédure ANOVA. Lorsque la valeur de la probabilité **P** est inférieure à 5 %, l'analyse est complétée par une comparaison de moyennes à l'aide du test de Newman-Keuls au seuil de 5 %.

3. Résultats

3-1. Effet type et concentration de l'auxine sur l'induction des cals

Sur les milieux dépourvus d'hormones, aucune induction de cals n'a été observée. L'initiation des cals sur les milieux supplémentés avec l'ANA, le 2,4-D et le Pic a débuté après 7 à 10 jours de culture. Après quatre semaines de culture, des cals de couleurs et de textures variables ont été obtenus (*Figure 1A-B*). La formation de racines a principalement été observée chez les explants ayant exprimé une faible intensité de prolifération de cals (*Figure 1C*).

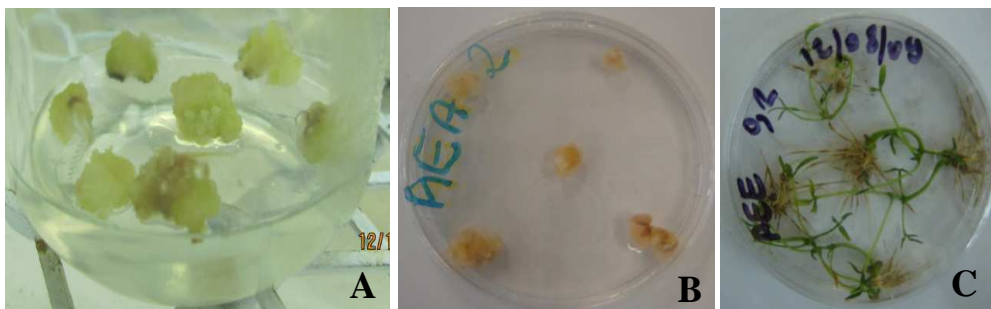


Figure 1 : Réponses morphogénétiques exprimées par l'axe embryonnaire du Voandzou après quatre semaines de culture sur le milieu de base MS supplémentés avec différentes auxines

- A**: Induction de cals blanc-jaunâtre et friables sur le milieu supplémenté avec le 2,4-D
- B**: Formation de cals pâteux et brunis sur le milieu supplémenté avec le picloram
- C**: Formation de racines à partir de l'axe embryonnaire sur le milieu contenant l'ANA

Les valeurs expérimentales relatives à l'influence de différentes auxines sur la formation des cals ont été regroupées dans le **Tableau 1**. Les taux d'induction de cals les plus faibles ont été obtenus avec la concentration 0,1 mg/L chez toutes les auxines testées. Quelle que soit l'auxine utilisée, aucune différence significative n'a été observée dans l'induction de cals pour les concentrations variant de 0,5 à 10 mg/L. Toutefois, une réduction des taux de formation de cals est enregistrée lorsque la concentration l'auxine est ajoutée aux milieux de culture à la concentration de 10 mg/L. Les taux d'induction de cals les plus élevés ont été obtenus en présence de picloram (84-98%) alors que les taux les plus faibles ont été observés sur les milieux supplémentés avec l'ANA (52-69%). Les intensités de prolifération cellulaires les plus importantes ont respectivement été exprimées aux concentrations 0,5 mg/L (2,90) pour le 2,4-D, 5 mg/L (2,85) pour le picloram et 0,5 mg/L (1,93) pour l'ANA. Une meilleure prolifération de cals friables a été obtenue à faible concentration avec le 2,4-D. Cette hormone a donc été utilisée pour la suite des manipulations.

Tableau 1 : Effets nature et concentration des auxines sur la callogenèse à partir de l'axe embryonnaire de *V. subterranea* (L.)

| Phyto (mg/L) | Fréquences d'induction de cals (%) | | | Intensités de prolifération des cals | | |
|--------------|------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | 2,4-D | ANA | Piclo | 2,4-D | ANA | Piclo |
| 0 | 0,00 ± 0,00 ^f | 0,00 ± 0,00 ^f | 0,00 ± 0,00 ^f | 0,00 ± 0,00 ^g | 0,00 ± 0,00 ^g | 0,00 ± 0,00 ^g |
| 0,1 | 17,78 ± 8,12 ^f | 0,00 ± 0,00 ^f | 78,89 ± 9,92 ^{abc} | 0,76 ± 0,31 ^f | 0,00 ± 0,00 ⁱ | 1,12 ± 0,04 ^{ef} |
| 0,5 | 72,44 ± 12,81 ^{bcd} | 69,56 ± 8,01 ^{bcde} | 84,00 ± 5,52 ^{ab} | 2,90 ± 0,44 ^a | 1,93 ± 0,15 ^{cd} | 2,67 ± 0,07 ^a |
| 1 | 73,17 ± 10,51 ^{bcd} | 70,14 ± 15,54 ^{bcde} | 86,89 ± 5,63 ^{ab} | 1,68 ± 0,46 ^{bcd} | 1,91 ± 0,25 ^{cd} | 2,74 ± 0,11 ^a |
| 2 | 77,78 ± 8,12 ^{abc} | 61,11 ± 14,18 ^{cde} | 95,00 ± 2,35 ^a | 2,45 ± 0,22 ^{ab} | 1,43 ± 0,37 ^{de} | 2,54 ± 0,07 ^a |
| 5 | 84,44 ± 10,81 ^{ab} | 52,22 ± 14,31 ^e | 98,33 ± 1,17 ^a | 2,27 ± 0,34 ^{bc} | 1,22 ± 0,33 ^{ef} | 2,85 ± 0,04 ^a |
| 10 | 67,78 ± 9,39 ^{bcde} | 54,44 ± 16,08 ^{de} | 85,00 ± 5,13 ^{ab} | 2,20 ± 0,43 ^{bc} | 1,83 ± 0,30 ^{cd} | 1,93 ± 0,11 ^{cd} |

Pour un même paramètre et dans une même colonne, les chiffres suivis de la même lettre ne sont pas significativement différents au seuil de 5 % (test Newman-Keuls)

± : erreur standard ; Phyto : Phytohormones

3-2. Effet de la segmentation de l'axe embryonnaire sur les réponses à la callogenèse

Les résultats de l'influence de la segmentation de l'axe embryonnaire sur l'induction et la prolifération des cals ont été indiqués dans le **Tableau 2**.

Tableau 2 : Influence de la segmentation de l'axe embryonnaire sur la callogenèse de *V. subterranea* (L.)

| Fréquences d'induction des cals (%) | | | Intensités de prolifération des cals | | |
|-------------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| AEA | AEB | AEE | AEA | AEB | AEE |
| 43,21 ± 4,98 ^c | 69,76 ± 4,97 ^a | 54,29 ± 5,56 ^b | 1,47 ± 0,15 ^b | 2,88 ± 0,15 ^a | 2,50 ± 0,16 ^a |

Pour un même paramètre et dans une même ligne, les chiffres suivis de la même lettre ne sont pas significativement différents au seuil de 5 % (test Newman-Keuls)

± : erreur standard

AEA : partie apicale ; AEB : partie basale ; AAE : axe entier

Les taux d'induction de cals ont varié de 43 à 69%. Le taux le plus élevé a été obtenu avec la partie basale (AEB) de l'axe embryonnaire et le taux le plus faible a été observé lorsque la partie apicale (AEA) de l'axe embryonnaire a été utilisée. Les intensités de prolifération de cals ont statistiquement été identiques avec AEB (2,88) et AEE (2,50). Ces valeurs ont significativement été supérieures à l'intensité de proliférations cellulaires observées avec AEA (1,47).

3-3. Effets de l'association du 2,4-D (0,5 mg/L) avec différentes concentrations des cytokinines (BAP – Kin – Zea - Tdz) sur les réponses à la callogénèse

La partie basale de l'axe embryonnaire a été placée sur différents milieux supplémentés avec le 2,4-D (0,5 mg/L) en combinaison avec les cytokinines BAP, Kin, Zea et Tdz aux concentrations respectives de 0,1 ; 0,5 et 1mg/L. Les résultats obtenus ont été consignés dans le **Tableau 3**.

Tableau 3 : Effets de l'association 2,4-D (0,5 mg/L) - cytokinines sur la callogénèse à partir de l'axe embryonnaire basal de *V. subterranea* (L.)

| | Conc (mg/L) | Fréquences d'induction de cals (%) | Intensités de prolifération des cals |
|------|-------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| Cyto | 0 | 100,00 ± 0,00 a | 3,00±00a |
| | 0,1 | 100,00 ± 0,00 a | 2,17±0,02bcd |
| BAP | 0,5 | 96,67±1,93a | 1,52±0,01ef |
| | 1 | 96,67±1,93a | 1,33±0,01f |
| Kin | 0,1 | 80,00±11,55ab | 2,40±0,04abc |
| | 0,5 | 60,00±23,09bcd | 2,20±0,27bcd |
| | 1 | 76,67±13,47abc | 1,64±0,21df |
| Tdz | 0,1 | 100,00±00a | 2,75±0,14ab |
| | 0,5 | 100,00±00a | 1,80±0,35cdef |
| | 1 | 100,00±00a | 1,97±0,33cde |
| Zea | 0,1 | 70,00±5,77bcd | 2,22±00bcd |
| | 0,5 | 50,00±5,77def | 2,59±0,05ab |
| | 1 | 83,34±1,93ab | 1,95±0,03cde |

Pour un même paramètre et dans une même colonne, les chiffres suivis de la même lettre ne sont pas significativement différents au seuil de 5 % (test Newman - Keuls)

± : erreur standard ; Cyto : cytokinines ; Conc ; concentration

L'association du 2,4-D (0,5 mg/L) avec les cytokinines Kin (0,1mg/L), et Tdz (0,1mg/L) a exprimé le même taux d'induction de cals et la même intensité de prolifération de cals que le 2,4-D (0,5 mg/L) seul. Les autres combinaisons de cytokinines avec le 2,4-D (0,5mg/L) ont plutôt résulté en une réduction des réponses à la callogénèse. Le milieu de base MS supplémenté avec le 2,4-D a donc été retenu pour étudier l'influence de différentes concentrations de saccharose.

3-4. Effet de la teneur en saccharose sur la callogenèse

Différentes concentrations de saccharose ont été additionnées au milieu de culture. Après quatre semaines de culture, leur influence sur la callogenèse a été évaluée et les résultats obtenus ont été enregistrés dans le **Tableau 4**.

Tableau 4 : *Effets de différentes concentrations de saccharose sur les réponses à la callogenèse à partir de l'axe embryonnaire basal de V. subterranea (L.)*

| Teneurs de saccharose (mM) | Fréquences d'induction des cals % | Intensité de prolifération des cals |
|----------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| 28 | 100,00±00a | 2,00± 0,00cd |
| 84 | 100,00±00a | 3,00± 0,00 a |
| 168 | 96,67±1,93a | 2,43± 0,25b |
| 252 | 100,00±00a | 2,10± 0,13bc |

Pour un même paramètre et dans une même colonne, les chiffres suivis de la même lettre ne sont pas significativement différents au seuil de 5 % (test Newman-Keuls)

± : erreur standard

Aucune différence significative n'a existé entre les différentes concentrations de saccharose dans l'induction des cals. L'intensité de prolifération a varié de 2 à 3. La plus importante prolifération de cals a été exprimée sur le milieu additionné avec 84 mM de saccharose. Cette concentration a été utilisée pour estimer l'influence de différents sucres sur la callogenèse.

3-5. Effet de la nature du sucre sur la callogenèse

Le milieu de base MS supplémenté avec le 2,4-D (0,5 mg/L) a respectivement été additionné avec le saccharose, le glucose, le fructose et le maltose. Le **Tableau 5** renferme les résultats obtenus après quatre semaines de culture. L'analyse des résultats montre que les taux d'induction de cals observés sur les milieux additionnés respectivement avec le saccharose et le glucose sont identiques (100%). Ces taux sont significativement plus élevés que ceux obtenus avec le maltose (83,34 %) et le fructose (80 %). La prolifération de cals la plus importante a été obtenue avec le saccharose (3).

Tableau 5 : *Effets de différentes sources de carbone sur la callogenèse à partir de l'axe embryonnaire basal de V. subterranea (L.)*

| Sucres | Fréquences d'induction de cals (%) | Intensités de prolifération des cals |
|------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| Saccharose | 100,00 ± 00a | 3,00± 00a |
| Glucose | 100,00 ± 00a | 2,00± 0,05b |
| Fructose | 80,00±7,70b | 2,04± 0,02b |
| Maltose | 83,34±1,93b | 2,17± 0,09b |

Pour un même paramètre et dans une même colonne, les chiffres suivis de la même lettre ne sont pas significativement différents au seuil de 5 % (test Newman-Keuls)

± : erreur standard

3-6. Effets des écotypes sur la callogénèse à partir de l'axe embryonnaire basal

L'aptitude à induire des cals à partir de l'axe embryonnaire basal a été étudiée avec différents écotypes de voandzou. Les valeurs expérimentales ont été résumées dans le **Tableau 6**.

Tableau 6 : Influence du génotype sur les réponses à la callogénèse à partir de l'axe embryonnaire basal de *V. subterranea* (L.)

| Écotypes | Fréquences d'induction de cals (%) | Intensités de prolifération des cals |
|----------|------------------------------------|--------------------------------------|
| Ci2 | 100,00±00a | 3,00±00a |
| Ci3 | 100,00±00a | 3,00±00a |
| Ci4 | 100,00±00a | 3,00±00a |
| Ci5 | 100,00±00a | 3,00±00a |
| Ci6 | 96,67±1,93a | 2,74±0,0a |
| Ci7 | 100,00±00a | 3,00±00a |
| Ci10 | 100,00±00a | 3,00±00a |
| Ci12 | 73,34±3,85b | 2,40±00c |
| Ci15 | 83,34±1,93ab | 2,60±0,01bc |
| Ci21 | 100,00±00a | 2,80±0,04ab |

Pour un même paramètre et dans une même colonne, les chiffres suivis de la même lettre ne sont pas significativement différents au seuil de 5 % (test Newman-Keuls)

± : erreur standard

L'analyse du tableau montre que deux groupes d'écotypes ont nettement été identifiés en relation avec leur potentialité à la callogénèse. Les écotypes du premier groupe ont exprimé les fréquences d'induction de cals variant de 96 à 100% et les intensités de proliférations cellulaires compris entre 2,74 et 3. Ce groupe est constitué des écotypes Ci2, Ci3, Ci4, Ci5, Ci6, Ci10 et Ci21. Le deuxième groupe composé des écotypes Ci12 et Ci15 ont présenté les plus faibles réponses à la callogénèse.

4. Discussion

Outre l'équilibre hormonal (auxine—cytokinine), de nombreux facteurs tels que la source d'explants, la nature et la concentration de l'auxine sont déterminants dans la réussite du processus de la callogénèse [14]. Les résultats de nos expériences ont montré qu'en absence d'auxines, aucune induction de cals n'a été observée. L'addition des auxines ANA, 2,4-D ou Pic au milieu de culture a induit des cals. Les auxines sont donc essentielles dans l'induction et la prolifération des cals. Cependant, les taux d'induction et de prolifération des cals dépendent du type et de la concentration d'auxines. Des observations similaires ont déjà été rapportées chez *Gossypium hirsutum* (L.) [15]. Les meilleures réponses ont été exprimées en présence du Pic et du 2,4-D. Toutefois, avec le 2,4-D, les cals ont été friables contrairement au Pic qui a induit des cals floconneux ou pâteux et donc peu aptes à exprimer des potentialités embryogéniques. L'importance du 2,4-D dans l'induction de cals a été signalée chez *Vigna mungo* (L.) [16-17] et *Vigna unguiculata*(L.) [18-19].

En général, toutes les parties d'un végétal peuvent initier des cals. La nature, l'âge, la position, l'orientation des explants, leurs besoins spécifiques en éléments nutritifs et leurs teneurs endogènes en hormones influencent la réponse à la callogenèse [20]. Dans la présente étude, la partie basale de l'axe embryonnaire a exprimé les meilleures réponses à la callogenèse. Il est fort probable que les capacités d'assimilation, de translocation et / ou de métabolisme du 2,4-D par les différentes parties de l'axe embryonnaire de *Vigna subterranea* soient différentes. L'association de BAP et de TDZ au 2,4-D n'a pas modifié le taux d'induction de cals obtenu uniquement avec celui-ci. Ces cytokinines ne sont donc pas indispensables pour l'induction des cals. Une diminution de la fréquence d'induction de cals a été constatée avec l'apport des cytokinines Kin et Zea. L'effet des cytokinines sur l'induction des cals chez le voandzou varierait suivant leur nature. Une réduction significative de la croissance des cals a cependant été observée avec toutes les combinaisons cytokinines - 2,4-D. Des observations similaires de l'effet réducteur des cytokinines sur la croissance de cals ont déjà été rapportées chez les espèces du genre *Phalaenopsis* [21]. Selon ces auteurs, la réduction de croissance observée serait plutôt due à l'effet antagoniste du 2,4-D sur l'action favorable qu'auraient induit la BAP et le TDZ sur la callogenèse. Contrairement à ces résultats, une amélioration de la croissance des cals a été assurée par l'association 2,4-D -cytokinines chez *Glycine max* (L.) [22].

Le saccharose est la source de carbone habituellement utilisée en culture *in vitro* à la concentration de 3% (84 mM) pour l'induction des cals [23-24]. Les résultats de la présente étude ont montré que toutes les teneurs de saccharose testées ont exprimé la même fréquence d'induction de cals, mais la croissance des cals a été plus importante à la concentration 84 mM. Cette concentration serait optimale pour la prolifération des cals telle que suggérée par de nombreuses études [25-26]. La présente étude a montré que différentes sources de carbone peuvent influencer la fréquence d'induction des cals. Toutefois, la plus importante prolifération de cals a été exprimée par le saccharose. Ce sucre, principalement localisé dans le phloème, est la source de carbone largement utilisée en culture *in vitro* chez la plupart des espèces végétales [27]. Deux groupes d'écotypes variant dans leurs réponses à la callogenèse ont été identifiés. D'une part, les écotypes Ci2, Ci3, Ci4, Ci5, Ci6, Ci7, Ci10, Ci21 et d'autre part, les écotypes Ci12 et Ci15. Les Réponses similaires exprimées dans un même groupe, supposeraient l'absence de variabilités intragroupe entre ces écotypes. Cependant, l'induction et la prolifération de cals plus importantes avec le premier groupe, suggéreraient l'existence de différences génotypiques entre ces groupes. L'influence du génotype dans l'induction et la croissance de cals a aussi été rapportée chez *Cicer arietinum*(L.) [28].

5. Conclusion

Au terme de cette étude, un protocole d'induction et de prolifération de cals à partir de l'axe embryonnaire a été établi chez le voandzou. L'explant de choix a été la partie basale de l'axe embryonnaire. La composition optimale du milieu de culture contient le 2,4-D (0,5 mg/L) et le saccharose (84 mM). Les meilleures réponses à la callogenèse ont été exprimées avec les écotypes Ci2, Ci3, Ci4, Ci5, Ci6, Ci7, Ci10 et Ci21. Ce protocole ainsi développé peut être adopté pour la régénération de plantes entières, la production de métabolites secondaires et à long terme dans l'application de la transformation génétique pour l'amélioration variétale du Voandzou.

Références

- [1] - A.E. GOLI, *In*: J. Heller, F. Begemann & J. Mushonga, eds. Proceedings of the workshop on conservation and improvement of Bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc.), Harare, Zimbabwe, (1997) 4-10
- [2] - A.R. LINNEMANN, Bambara groundnut (*Vigna subterranea*) literature: a revised and updated bibliography. Tropical Crops Communication 7. Department of Tropical Crop Science, Wageningen Agricultural University, Netherlands, (1992) 124pp
- [3] - S.H. BROUGH and S.N. AZAM-ALI, "The effect of soil moisture on the proximate composition of Bambara groundnut (*Vigna subterranea* L. Verdc)." *J Sci Food Agric*, (60) (1992) 197-203
- [4] - S.H. BROUGH, S.N. AZAM-ALI and A.J. TAYLOR, The potential of Bambara groundnut (*Vigna subterranea*) in vegetable milk production and basic protein functionality systems. *Food Chem*, (47) (1993) 277-283
- [5] - M. GUEYE, E.K. JAMES, M. KIERANS and J.L. SPRENT, The development and structure of root nodules on Bambara groundnut ([Voandzeia] *Vigna subterranea* L.), *W J Microbiol Biotech* (14) (1998) 177–184
- [6] - C.U. ODUMODU, Antinutrients content of some locally available legumes and cereals in Nigeria, *Trop Geo and Med*, (44) (1992) 260-263
- [7] - Y. GWEKWERERE, in Zimbabwe. Proceedings of the conservation and Improvement of Bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc.), Harare, Zimbabwe, November, (1995) 14-16
- [8] - F. AYALI and N.E. LALE, Susceptibility of unprotected seeds and seeds of local Bambara groundnut cultivars protected with insecticidal essential oils to infestation by *Callosobruchus maculatus* (E) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal Stored product Research* (37) (2000) 47-62
- [9] - W. A. PARROTT, M.A. BAILLEY, R.E DUCHAM and H.V. MATHEW, *In*: Proc Int. Workshop on Biotechnology and Crop Improvement in Asia – ICRIASAT (Moss, J.P., ed.), India: Hyderabad, (1992) 115-148
- [10] - M. KONE, S. OCHATT, P.E. OCHATT, C. PONTECAILLE, R.S. SANGWAN and Y.J. KOUADIO, Régénération *in vitro* de plantules à partir de l'explant hypocotyle chez *Vigna subterranea* (L.) Verdc. Xe Journées Scientifiques du Réseau "Biotechnologies Végétales : amélioration des plantes et sécurité alimentaire" de l'AUF, Constantine – Algérie, 08-11 Mai (2006)
- [11] - M. KONE, P.E. OCHATT, C. CONREUX, R.S. SANGWAN and S. OCHATT, *In vitro* morphogenesis from cotyledon and epicotyl explants and flow cytometry distinction between landraces of Bambara groundnut [*Vigna subterranea* (L.) Verdc], an under-utilised grain legume, *Plant Cell Tissue Organ Culture* (88) (2007) 61-75
- [12] - T. MURASHIGE and F. SKOOG, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures, *Physiol Plant*, (15) (1962) 473–497
- [13] - M. GAMBORG, R.A. MILLER, K. OJIMA, Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells, *Exp Cell Res*, (50) (1968) 151–158
- [14] - R. RADHAKRISHNAN and B. D. RANJITHAKUMARI, Callus induction and plant regeneration of Indian soybean (*Glycine max* (L.) Merr. Cv. CO3) via half seed explant culture, *J of Agric Tech*, 3(2) (2007) 287-297
- [15] - E. ABDELLATEF and M.M. KHALAFALLAH, Influence of growth regulators on callus induction from hypocotyls of medium staple cotton (*Gossypium hirsutum* L.). cultivar barac b-67, *J. Soil. Nature*. 2 (1)(2008)17-22
- [16] - S. GIRIJA., A. GANAPATHI and G. ANANTHAKRISHNAN, Somatic embryogenesis in *Vigna radiata* (L.) Wilczek, *Ind. J. Exp. Biol*, 38 (12) (2000) 1241-1244

- [17] - S. AMUTHA, A. GANAPATHI and M. MURUGANANTHAM, *In vitro* organogenesis and plant formation in *Vigna radiata* (L.) Wilczek, *Plant Cell Tiss Org Cult*, (72) (2003) 203-207
- [18] - K. RAMAKRISHNAN, R. GNANAM, P. Sivakumar and A. Manicham, Developmental pattern formation of somatic embryos induced in cell suspension cultures of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp], *Plant Cell Rep*, (24) (2005) 501-506.
- [19] - F.C.S. NOGUEIRA, E.F.GONÇALVES, E.S. JEREISSATI, M. SANTOS, J.H.COSTA, O.B. OLIVEIRA-NETO, A.A. SOARES, G.B. DOMONT and F.A.P. CAMPOS, Proteome analysis of embryogenic cell suspensions of cowpea (*Vigna unguiculata* L.). *Plant Cell Rep* (26) (2007)1333-1343
- [20] - H. Mathews, Morphogenetic responses from *in vitro* cultured seedling explants of mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek), *Plant Cell, Tissue Org. Cult*,(11)(1987) 233-240
- [21] - Y.C. CHEN, C. CHANG and W.C.CHANG, A reliable protocol for plant regeneration from callus culture of phalaenopsis, *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*,(36) (2000) 420-423
- [22] - A.M. IMAKAWA, H. SAKA, S. YONEKAWA and A. HIRAI, Differences in the rates of ethylene production and growth between the calluses derived from rice (*Oryza sativa* L.) and soybean (*Glycine max*(L.) Merr.), *Plant Prod Sci* 5(1) (2002) 11-16
- [23] - R.V. SAIRAM, G.F. RANKLIN, R. HASSEL, B. SMITH, K. MEEKER, N. KASHIKAR, M. PARANI, D.A.L. ABED, S. ISMAIL, K. BERRY and S.L. GOLDMAN, A study on the effect of genotypes, plant growth regulators and sugars in promoting plant regeneration via organogenesis from soybean cotyledonary nodal callus, *Plant Cell Tiss Org Cult*, (75)(2003)79-85
- [24] - S. TIWARI and R. TULI, Factors promoting efficient *in vitro* regeneration from deembryonated cotyledon explants of *Arachis hypogaea* L., *Plant Cell Tiss Org Cult*,(92) (2008) 15-24
- [25] - S.C. DEBNATH, Effects of carbon source and concentration on development of lingon berry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) shoots cultivated *in vitro* from nodal explants, *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*,(41)(2005) 145-150
- [26] - O. KARAMI, A. DELJOU, M. ESNA-ASHARI and P.OSTAD-AHMADI, Effect of sucrose concentrations on somatic embryogenesis in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.), *Sci Hort*, (110)(2006)340-344
- [27] - J.C.V.VU, R.P. NEIDZ and G.YELONOSKY, Glycerol stimulation of chlorophyll synthesis, embryogenesis and carboxylation and sucrose metabolism enzymes in nucellar callus of 'Hamlin' sweet orange, *Plant Cell Tiss. Org. Cult*, 33(1993)75–80.
- [28] - H. ZARE MIRAKABAD, A.R. BAGHERI and M. ZARE MEHRJERDI, Efficient protocol for break impasses of regeneration via callus for 20 genotypes of chickpea. *Int J. of Plant Prod.*, 4 (2) (2010)1735-8043

