Available online at http://www.ifgdg.org

Int. J. Biol. Chem. Sci. 19(6): 2373-2387, December 2025

ISSN 1997-342X (Online), ISSN 1991-8631 (Print)

International Journal of Biological and Chemical Sciences

Original Paper http://ajol.info/index.php/ijbcs http://indexmedicus.afro.who.int

Essais de microbouturage *in vitro* du Fraké (*Terminalia superba* Englers et Diels) à partir de graines de Côte d'Ivoire

Pyminnan TRAORE[1], Laddy OUATTARA[2*], Tchoa KONE[1], Yaya TOURE[3], Fousseni DIARRA[4] et Mongomaké KONE[1]

[1] *Laboratoire de Biologie et Amélioration des Productions Végétales, UFR Sciences de la Nature, Université NANGUI ABROGOUA, Abidjan, Côte d'Ivoire.*
[2] *Laboratoire de Phytotechnie et Amélioration des Plantes, UFR Sciences de la Nature, Université NANGUI ABROGOUA, Abidjan, Côte d'Ivoire.*
[3] *Laboratoire de Physiologie Végétale, UFR Ingénierie Agronomique, Forestière et Environnementale, Université de Man, Côte d'Ivoire.*
[4] *Centre des semences forestières, Société de développement des forêts (SODEFOR), Adzopé, Côte d'Ivoire.*
[*] *Auteur correspondant ; E-mail : ouattaralady@yahoo.fr*

Received: 17-11-2024 Accepted: 11-12-2025 Published: 31-12-2025

RESUME

Le Fraké est une essence forestière très exploitée en Côte d'Ivoire pour la qualité de son bois. La culture à grande échelle de l'espèce est nécessaire pour étendre les populations exploitables. Pour disposer de matériels de plantation à profusion, la micropropagation offre une opportunité de produire des populations clonales de l'espèce. L'objectif de cette étude a été de déterminer les conditions de régénération *in vitro* du Fraké à partir de graines pour maintenir une certaine diversité. Des traitements de désinfection et de mise en culture de graines de fraké dans des milieux appropriés ont été alors testés. Les résultats ont montré que les graines désinfectées à l'hypochlorite de calcium (3%), puis imbibées dans l'eau distillée stérile pendant 48 H et mises en culture dans un milieu contenant 10^{-3} M de GA3 avaient un bon pourcentage (68%), un délai réduit (7 jours) et une courte durée (15 jours) de germination. Les résultats ont aussi révélé que les meilleurs pourcentages, nombres moyens et délais de bourgeonnement (respectivement 67 à 70%, 6,11 bourgeons/explant et 28 jours) ont été obtenus avec les apex cultivés sur milieu contenant 1 mg/L de BAP. Les résultats ainsi obtenus sont encourageants et pourraient être améliorés.
© 2025 International Formulae Group. All rights reserved.

Mots clés : Bourgeonnement, désinfection, germination *in vitro,* micropropagation, *Terminalia superba*

Microbouturation trials of Fraké (*Terminalia superba* Englers and Diels) from seeds of Côte d'Ivoire

ABSTRACT

Fraké is a forest species that is widely exploited in Côte d'Ivoire for the quality of its wood. Large-scale cultivation of the species is necessary to expand exploitable populations. To have an abundance of planting material, micropropagation offers an opportunity to produce clonal populations of the species. The objective of

© 2025 International Formulae Group. All rights reserved.
DOI : https://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v19i6.5

this study was to determine the conditions for in-vitro regeneration of Fraké from seeds to maintain a certain diversity. Disinfection treatments and cultivation of fraké seeds in appropriate environments have been tested. The results showed that seeds disinfected with calcium hypochlorite (3%), then soaked in sterile distilled water for 48 H and cultured in a medium containing l10-3 M GA3 had a good percentage (68%), a reduced time (7 days) and a short germination time (15 days). The results also revealed that the best percentages, average numbers and budding times (67 to 70%, 6.11 buds/explant and 28 days, respectively) were obtained with apexes grown on medium containing 1 mg/L BAP. The results obtained are encouraging and could be improved.
© 2025 International Formulae Group. All rights reserved.

Keywords: Budding, disinfection, *in vitro* germination, micropropagation, *Terminalia superba.*

INTRODUCTION

La Côte d'Ivoire est confrontée à une déforestation massive et intensive depuis les années soixante. Ainsi, la forêt dense humide est passée de 15 millions d'hectares en 1956, à 9 millions en 1965 puis à 3 millions en 1991. Cela avait fait de la Côte d'Ivoire, il y a quelques décennies, le pays ayant le taux de déforestation le plus élevé d'Afrique subsaharienne, avec une perte estimée à plus de 200 000 ha par an (Achard et al., 2002 ; Hansen et al., 2013) et un taux de déforestation annuel avoisinant 1% (Tutu et Akol, 2009 ; Ruf et al., 2015). Cette situation dramatique a été causée par plusieurs facteurs, à savoir l'agriculture extensive, l'abattage abusif des ressources bioénergétiques, la surexploitation et l'utilisation inadéquate des sols, l'urbanisation grandissante et les infiltrations clandestines dans les forêts classées (Assale et al., 2016). Face aux menaces écologiques qui en découlent, au besoin de régénération du patrimoine forestier ivoirien et aussi à la nécessité de protéger les espèces ligneuses des forêts naturelles tout en permettant à l'industrie du bois de fonctionner, le reboisement et l'agroforesterie sont reconnus comme des solutions indéniables à promouvoir et à pérenniser (Eaux et Forêts, 2018). Le choix d'espèces ligneuses à croissance rapide et sollicitées par l'industrie du bois a été indiqué dans la mise en œuvre des politiques de reboisement.

En Afrique de l'Ouest, certaines espèces du genre *Terminalia* (*Terminalia superba* Englers et Diels ; *Terminalia ivoirensis* Chev.) sont utilisées, de manière régulière, en exploitation forestière par les industries du bois et aussi comme ressources énergétiques et médicinales par les populations rurales (Chevalier, 2018). Pour assurer la conservation de ces espèces, plusieurs actions de reboisements ont été entreprises afin de renforcer les écosystèmes forestiers ivoiriens (Kouadio et al., 2021). Cependant, il existe toujours un déficit de vergers due en grande partie à l'insuffisance de matériels de plantation (Noufé et al., 2011). Chez *T. superba*, en particulier, le matériel de plantation peut être produit naturellement à partir de la germination des graines ou par voie végétative à partir du bouturage et de la taille qui permet d'obtenir des rejets de souches. Toutefois, ces méthodes sont lentes et ne permettent pas d'obtenir un grand nombre de plants de qualité sanitaire satisfaisante. En effet, même si le taux de germination naturelle des graines de *T. superba* peut atteindre jusqu'à 80-90% (Asomaning et al., 2011), la durée nécessaire à la levée de dormance est relativement longue et leur viabilité diminue fortement au fil du temps (Noufé et al., 2011). De même le bouturage et l'obtention de rejets par taille exigent l'utilisation d'arbres matures. Ainsi, avec ces approches, la production à grande échelle de l'espèce semble limitée.

Pour améliorer la productivité de *T. superba*, la biotechnologie offre une opportunité de produire rapidement et massivement des clones de qualités sanitaires, lorsqu'elle est maitrisée. Cette technique est reconnue depuis longtemps comme un moyen de production efficace et rentable chez le caféier (Etienne et al., 2012). Dans les pays en

développement, elle a très peu été appliquée aux essences forestières (Louppe et al., 2008), comparativement aux cultures de rente telles que le palmier à huile, l'hévéa, le café, le cacao et d'autres cultures telles que la banane plantain (Dea et al., 2000 ; Koné et al., 2016). La micropropagation est une technique très rigoureuse qui nécessite la mise en place de protocole souvent spécifique à l'espèce ou au type d'organe utilisé. L'objectif de cette étude a été de déterminer les conditions de micropropagation du Fraké à partir des graines.

MATERIEL ET METHODES

Matériel végétal

Le matériel végétal a été constitué de graines de *Terminalia Superba* issus de fruits séchés, fournis par le Centre de semences forestière de la SODEFOR (Société de développement des forêts) à Adzopé. Ils ont été récoltés au cours de la campagne de novembre à décembre 2022 sur des semenciers (arbres sélectionnés pour leur bon état sanitaire et la qualité de leur fruit) en forêt naturelle au sud de la Côte d'Ivoire. Les fruits récoltés ont été conservés dans une chambre froide dont la température oscillait entre 5 et 10°C. Les fruits en conservation depuis six mois ont été fournis au Laboratoire de Biologie et Amélioration des Productions Végétales pour les essais de multiplication.

Méthodes

Sélection du matériel végétal mis en culture

Les fruits ont été préalablement lavés à l'eau distillée, puis trempés dans de l'eau savonneuse pendant 10 minutes et rincés abondamment à l'eau de robinet. Les fruits ont été débarrassés de leurs coques pour libérer les graines. Pour tester leur viabilité avant culture, les graines non dénudées ont d'abords été triées manuellement. Les graines apparemment de bonne qualité ont été immergées dans un récipient d'eau distillée stérile. Celles qui étaient projetées au fond du récipient ont été considérées comme saines et viables, tandis que celles qui flottaient ont été considérées comme immatures ou endommagées. Les graines apparemment saines et viables ont été dénudées, et celles perforées ou attaquées ont été retirées (Figure 1).

Etude de l'effet de la concentration d'hypochlorite de calcium, de la durée d'imbibition et de la GA3 sur la contamination et la germination des graines de Fraké

Trois lots de graines sélectionnées ont été constitués. Les graines du lot témoins (0 H) n'ont pas été imbibées. Les graines du second lot ont été imbibées pendant 24 H, et celles du troisième lot pendant 48 H dans l'eau distillée stérile. Tous les lots de graines ont subi des tests de désinfection avec des solutions d'hypochlorite de calcium (8° à 2,7% de chlore actif) à différentes concentrations (2 ou 3% ; v/v) pendant 5 minutes. Après désinfection, les graines ont été abondamment rincées avec de l'eau distillée stérile, pendant 15 minutes. Elles ont ensuite été mises en culture sur milieu MS (Murashig et Skoog, 1962) supplémenté de 30 g de saccharose et de 0,1 mg/L de Myo-inositol. Plusieurs milieux d'initiation ont été préparés et la différence de constitution est résumé dans le Tableau 1. Le pH des milieux a été ajusté à 5,7 à l'aide d'un pH-mètre et de solutions de NaOH et HCl à 1 N. Du phytagel (3g/L) y a été ajouté pour solidifier les milieux. Les milieux ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes à une pression de 1 bar.

Etude de l'effet de la concentration en cytokinines des milieux sur la production des bourgeons de T. superba

Les plantules de 45 jours, développées sur le milieu d'initiation, ont été utilisées pour cette phase de multiplication. Le milieu de multiplication a été composé des mêmes constituants que celui de l'initiation des cultures, à la différence qu'il n'y a pas été ajouté de la GA3. Trois cytokinines à différentes concentrations ont été testés dans cette étude afin d'évaluer l'effet de ces deux facteurs sur la prolifération de bourgeons de Fraké. Ainsi, la 6-Benzylaminopurine (BAP), la Kinétine (Kin) et le Thidiazuron (TDZ) ont été testés à 0 ; 0,1 ; 05 ; 1 ; 2 ; 3 et 4 mg/L. La

partie apicale des vitroplants au stade deux feuilles obtenus a été soigneusement coupée et utilisée comme explant. Ces explants ont été immédiatement ensemencés sur les différents milieux préparés.

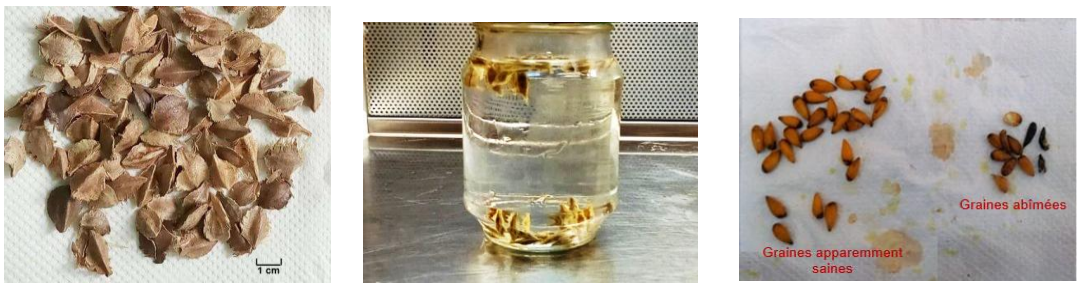
Conditions de culture et paramètres évalués

Après ensemencement, tous les bocaux ont été refermés et scellés à l'aide de film étirable puis étiquetés. Ils ont par la suite été conditionnés dans une chambre de culture dont la photopériode a été de 14 H /10 (Jour/nuit), sous une température de 25°C et une luminosité fournie par des lampes blanches (100 $\mu Em^{-2}s^{-1}$).

L'humidité relative de la chambre oscillait entre 70 et 80%. Les différentes évaluations ont été faites sur une période de 45 jours. Les paramètres évalués ont été : le pourcentage de contamination, la capacité de germination, le délai de germination, le pourcentage de bourgeonnement, le nombre de bourgeons produits et le délai de bourgeonnement.

Analyses statistiques

Les tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel STATISTICA version 7.1. Les données ont d'abord été soumises à une analyse multivariée (MANOVA). Lorsque cette dernière révèle un effet significatif pour un facteur ou une interaction, des analyses de variances (ANOVA) à travers le model linéaire Généralisé, à un, deux ou trois facteurs de classification ont été effectuées. Lorsqu'une différence a été observée, le test des rangs multiples de Newman keuls au seuil de 5% a été réalisé pour séparer les moyennes.



Fruits secs Test de viabilité Graines triées

Figure 1 : Méthode de sélection des graines.

Tableau 1 : Traitements utilisés pour l'étude de la concentration d'hypochlorite de calcium, de la durée d'imbibition et de la GA3 au cours de la phase d'initiation.

Durée d'imbibition	Concentration Ca(ClO)2	Milieu de culture
0 H	2%	GA3 0
		GA3 10^{-3}
24 H		GA3 0
		GA3 10^{-3}
48 H		GA3 0
		GA3 10^{-3}
0 H	3%	GA3 0
		GA3 10^{-3}
24 H		GA3 0
		GA3 10^{-3}
48 H		GA3 0
		GA3 10^{-3}

Ca(ClO)2 : hypochlorite de calcium ; GA3 : l'acide gibbérellique à 10^{-3} M

RESULTATS

Paramètres de contamination et de germination

Le Tableau 2 de l'analyse de variance des paramètres de contamination et de germination évalués a permis de mettre l'accent sur les significativités (au seuil de 5%) des facteurs pour chaque paramètre. Ainsi, pour le pourcentage de contamination, la triple interaction a été significative. L'effet observé par la triple interaction vient plus de la concentration en hypochlorite. Pour ce qui concerne le pourcentage de germination, une double interaction a été notée entre la concentration en hypochlorite de calcium et la durée d'imbibition et entre l'hypochlorite de calcium et la composition du milieu de germination en GA3. En plus de ces doubles interactions, tous les effets principaux ont été significatifs. La double interaction entre la durée d'imbibition et le milieu de culture a significativement influencé les paramètres délai et durée de germination (Tableau 2).

Effet combiné de la concentration d'hypochlorite de calcium, la durée d'imbibition et de la présence de GA3 dans les milieux d'initiation

Le pourcentage de contamination a été influencé par la triple interaction (Figure 2). Cependant cette différence n'a pas été très significative. Les faibles pourcentages de contamination ont été obtenus avec l'hypochlorite de calcium (Ca(ClO)2) à 3% et les valeurs les plus élevées de contamination ont été observées avec les graines imbibées 24 heures puis désinfectées avec 2% de Ca(ClO)2 et incubées sur milieu enrichi de 10^{-3} M de GA3.

Effet combiné de la concentration d'hypochlorite de calcium et de la durée d'imbibition sur la capacité de germination des graines de Fraké

Le pourcentage de germination est significativement influencé par la combinaison des effets concentration de l'hypochlorite de calcium et de la durée d'imbibition dans de l'eau (Figure 3). Les graines imbibées 24 et 48 H, puis désinfectées avec 3% d'hypochlorite de calcium ont présenté les meilleurs pourcentages de germination (> 60%). Cependant, les graines n'ayant pas été imbibées ont présenté les plus faibles pourcentages de germinations (< 20%).

Effet combinée de la concentration d'hypochlorite de calcium et de la présence de GA3 dans les milieux d'initiation sur la capacité de germination des graines de Fraké

La double interaction concentration d'hypochlorite de calcium × présence de GA3 des milieux de culture a significativement influencé la capacité germinative des graines de *T. superba* (Figure 4). Les graines désinfectées avec 3% d'hypochlorite de calcium et mis en culture sur milieu enrichi de 10^{-3} M de GA3 ont présenté les meilleurs pourcentages de germination (60%).

Effet combinée de la durée d'imbibition et de la présence de GA3 dans les milieux d'initiation sur le délai de germination des graines de Fraké

Le délai de germination a été significativement influencé par la combinaison des effets durée d'imbibition et la présence de GA3 dans le milieu de culture (Figure 5). Ainsi, les graines non imbibées ont présenté un délai de germination plus long (plus de 25 jours après semis). Cependant, celles qui ont été imbibées 24 et 48 H dans de l'eau ont germées plus vites.

Effet combinée de la durée d'imbibition et de la présence de GA3 dans les milieux d'initiation sur la durée de germination des graines de Fraké

La Figure 6 présente l'influence de l'interaction entre la durée d'imbibition et la présence de GA3 des milieux de culture sur la durée de germination. En effet, les graines qui n'ont pas été imbibées ont mis plus de temps pour assurer leur germination. Ainsi, les lots de ces graines ont mis 30 à 36 jours pour réaliser leur germination sur milieu de culture. Les graines imbibées 24 H mettent moins de temps (15 jours) à germer par rapport à celles imbibées 48 H (entre 15 et 23 jours).

Effets de la concentration des cytokinines sur le bourgeonnement de *T. superba*

Le Tableau 3 présente l'influence combinée de la concentration de différentes cytokinines sur les paramètres de bourgeonnement de Fraké.

Il ressort de ces résultats que le pourcentage de bourgeonnement des fragments d'apex mis en culture variait significativement en fonction de la composition du milieu de culture en cytokinines. Le milieu contenant la BAP aux concentrations de 0,5 à 2 mg/L ont induit des pourcentages de bourgeonnement plus élevés (entre 60 et 70%). Cependant, les milieux sans cytokinines n'ont pas produit de bourgeons.

Les délais ou temps minimum de bourgeonnement ont été les plus faibles (de 25 à 29 jours) lorsque les milieux sont enrichis de BAP et de KIN aux concentrations 0,1 à 0,5 mg/L. ces délais ont été les plus longs sur les milieux contenant de la BAP à 2, 3 et 4 mg/L et de la KIN à 1 et 2 mg/L (valeurs oscillantes entre 34 et 37 jours).

Le nombre de bourgeons variait également selon la nature et la concentration en cytokinines. Le milieu contenant de la BAP à 1 mg/L a produit le plus de bourgeons (6,11 bourgeons/explant). Aussi, pour chaque cytokinine, il y a eu une concentration maximale de production de bourgeons. Dans cette étude, la TDZ a produit plus de bourgeons à 0,5 mg/L (3,13 bourgeons). Quant à la KIN, elle a produit plus de bourgeons (3,76) à 1 mg/L.

Tableau 2 : Niveaux de probabilité de l'analyse multiple de la variance (MANOVA) des paramètres de contamination et de germination.

	Paramètres évalués			
Facteurs	**Pourcentage de contamination**	**Capacité de Germination**	**Délai de germination**	**Durée de germination**
Concentration Ca(ClO)2 (1)	< 0,001	< 0,001	0,225260	0,952887
Durée d'imbibition (2)	0,222290	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Milieu de culture (3)	0,149995	< 0,001	< 0,001	0,218368
Double Interaction (1) x (2)	0,680126	< 0,001	0,864356	0,301041
Double Interaction (1) x (3)	0,333190	< 0,001	0,615284	0,516677
Double Interaction (2) x (3)	0,078782	0,748404	0,022822	< 0,001
Triple Interaction (1)x(2)x(3)	0,030400	0,359172	0,864356	0,433710

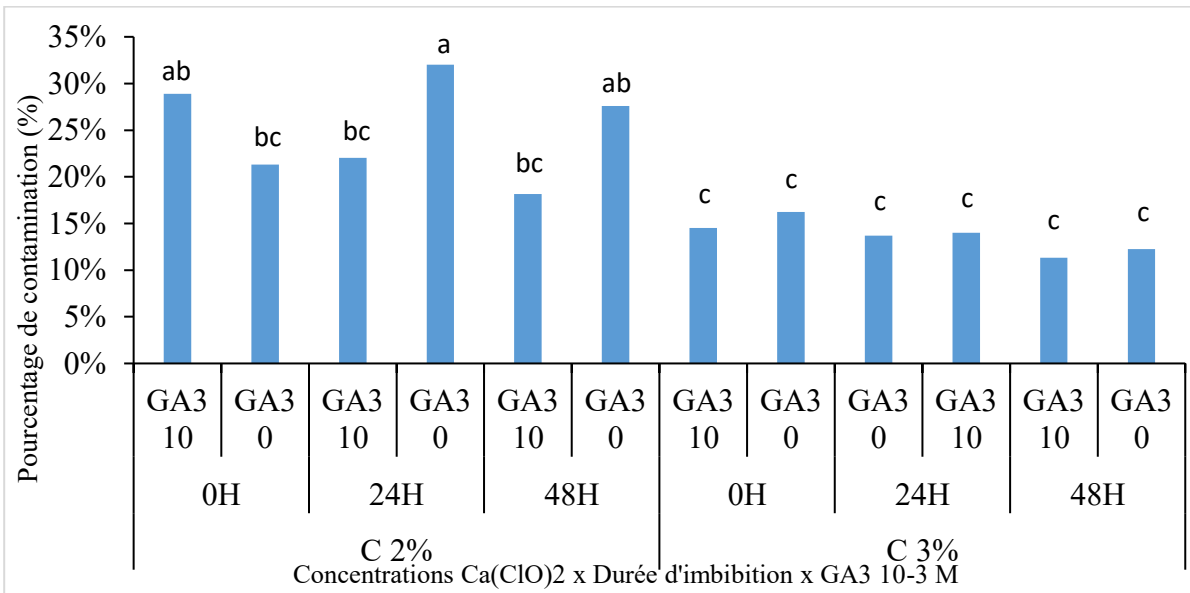


Figure 2 : Influence de la triple interaction concentration d'hypochlorite de calcium, durée d'imbibition et milieu de culture sur la désinfection des graines de *T. superba*.

Les histogrammes portant de la même lettre sont statistiquement identiques au seuil de 5% ; Test posthoc de Newman-Keuls

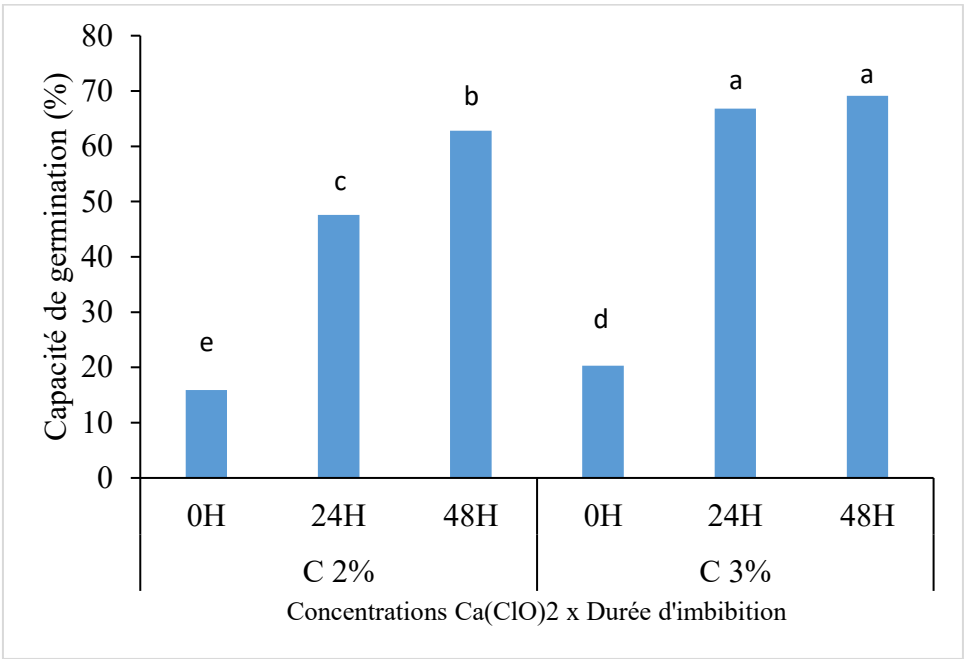


Figure 3 : Influence de la double interaction concentration d'hypochlorite de calcium et de la durée d'imbibition sur la capacité germinative des graines de *T. superba.*

Les histogrammes portant la même lettre sont statistiquement identiques au seuil de 5% ; Test posthoc de Newman-Keuls

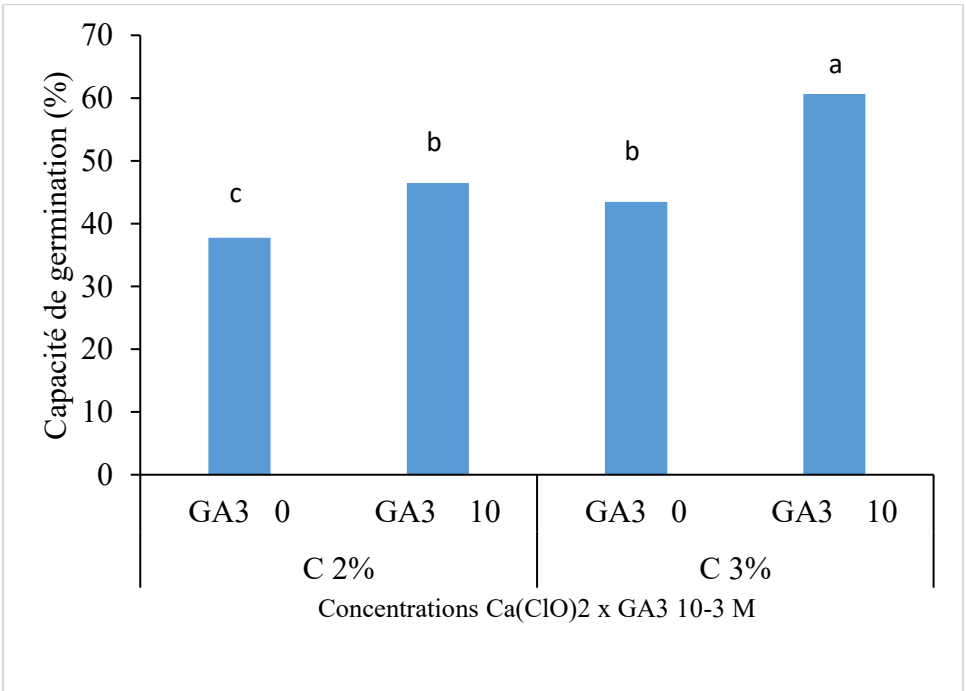


Figure 4 : Influence de la double interaction concentration d'hypochlorite de calcium et le milieu de culture sur la capacité germinative des graines de *T. superba.*

Les histogrammes portant la même lettre sont statistiquement identiques au seuil de 5% ; Test posthoc de Newman-Keuls

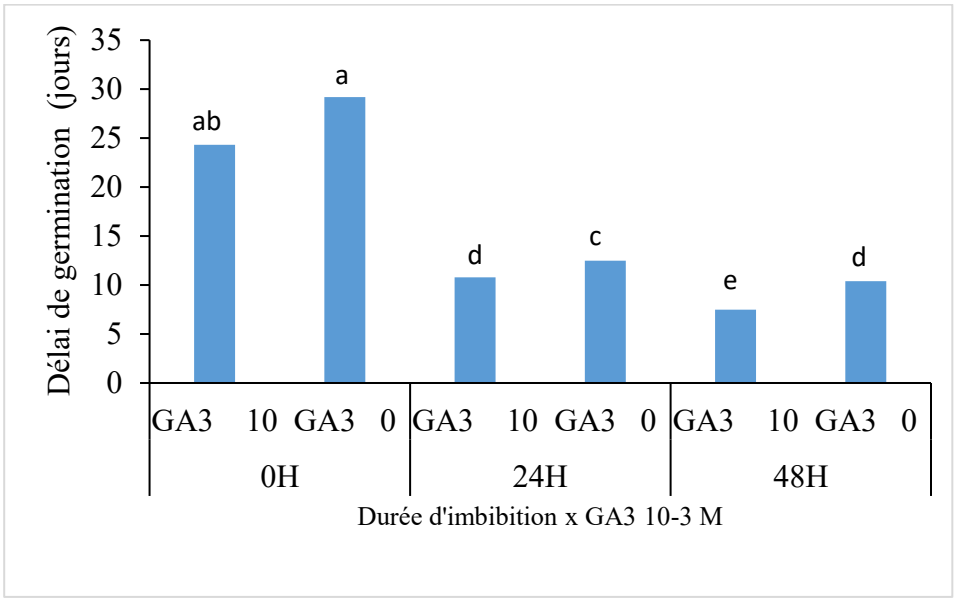


Figure 5 : Influence de la double interaction durée d'imbibition et de la présence de GA3 dans le milieu de culture sur le délai de germination des graines de *T. superba.*

Les histogrammes portant la même lettre sont statistiquement identiques au seuil de 5% ; Test posthoc de Newman-Keuls

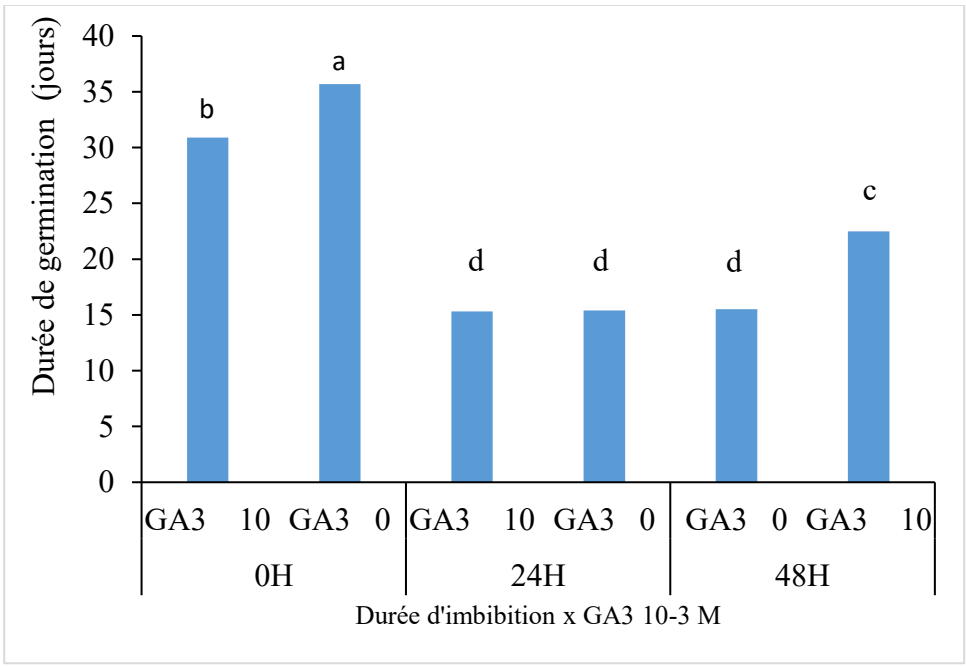


Figure 6 : Influence de la double interaction durée d'imbibition et la présence de GA3 dans le milieu de culture sur la durée de germination des graines de *T. superba.*

Les histogrammes portant la même lettre sont statistiquement identiques au seuil de 5% ; Test posthoc de Newman-Keuls

Tableau 3 : Influence de la concentration de différentes cytokinines sur les paramètres de bourgeonnement de Fraké.

Nature Cytokinines	Concentration (mg/L)	Pourcentage de bourgeonnement (%)	Délai de bourgeonnement (jours)	Nombre de bourgeons produits
TDZ	Co = 0	0,62 ± 0,0032 ^{j}	0,00 ± 0,00 ^{i}	0,03 ± 0,0007 ^{m}
	C1 = 0,1	30,80 ± 0,4276 ^{h}	31,09 ± 0,3115 ^{cde}	1,73 ± 0,2481 ^{kl}
	C2 = 0,5	60,33 ± 0,9984 ^{c}	30,54 ± 0,2167 ^{def}	3,13 ± 0,2737 ^{d}
	C3 = 1	34,87 ± 0,4008 ^{g}	32,33 ±0,3111 ^{cde}	1,63 ± 0,1884 ^{l}
	C4 = 2	24,8à ± 0,2960 ^{i}	33,07 ± 0,3304 ^{bc}	2,10 ± 0,0468 ^{hilk}
	C5 = 3	31,00 ± 0,3086 ^{h}	32,07 ± 0,3157 ^{cde}	2,23 ± 0,0182 ^{fghij}
	C6 = 4	29,93 ± 0,2482 ^{h}	32,17 ± 0,1868 ^{cde}	0,32 ± 0,0502 ^{m}
BAP	Co = 0	0,00 ± 0,00 ^{j}	0,00 ± 0,00 i	0,02 ± 0,0004 ^{m}
	C1 = 0,1	55,27 ± 0,3003 ^{d}	25,73 ± 0,2667 ^{h}	2,83 ± 0,04745 ^{de}
	C2 = 0,5	70,00 ± 0,6399 ^{a}	28,00 ± 0,4364 ^{g}	5,30 ± 0,1195 ^{b}
	C3 = 1	67,33 ± 1,1859 ^{b}	30,73 ± 0,686' ^{def}	6,11 ± 0,1157 ^{a}
	C4 = 2	59,87 ± 0,6960 ^{c}	36,33 ± 0,5225 ^{a}	2,63 ± 0,0779 ^{efg}
	C5 = 3	44,47 ± 0,7676 ^{f}	36,73 ± 0,3157 ^{a}	2,65 ± 0,0542 ^{efg}
	C6 = 4	36,20 ± 0,5707 ^{g}	36,33 ± 0,6068 ^{a}	1,81 ± 0,0486 ^{ijkl}
KIN	Co = 0	0,02 ± 0,00 ^{j}	0,01 ± 0,0005 ^{i}	0,00 ± 0,00 ^{m}
	C1 = 0,1	30,20 ± 0,6561 ^{h}	29,93 ± 0,5021 ^{ef}	2,38 ± 0,1448 ^{fgh}
	C2 = 0,5	36,40 ± 0,7419 ^{g}	28,80 ± 0,6187 ^{fg}	3,21 ± 0,0796 ^{d}
	C3 = 1	49,87 ± 1,2026 ^{e}	35,67 ± 0,7281 ^{a}	3,76 ± 0,0826 ^{c}
	C4 = 2	50,80 ± 0,9817 ^{e}	34,80 ± 0,9217 ^{ab}	1,79 ± 0,0968 ^{ijkl}
	C5 = 3	36,40 ± 0,6676 ^{g}	33,27 ± 0,9974 ^{bc}	2,22 ± 0,1163 ^{fghij}
	C6 = 4	30,87 ± 1,154e ^{h}	32,00 ± 1,0997 ^{cde}	3,25 ± 0,1257 ^{d}
$P_{\text{Cytok.}}$		< 0,001	0,243470	< 0,001
	$P_{Conc.}$	< 0,001	< 0,001	< 0,001
$P_{inter.x\ Cy/Con}$		< 0,001	< 0,001	< 0,001

TDZ : Thidiazuron ; BAP : 6-Benzylaminopurine ; KIN : Kinetine ; $P_{\text{Cytok:}}$ Effet principal nature cytokinine ; $P_{Conc.}$: Effet principal Concentration ; $P_{inter.x\ Cy/Con}$: effet interaction Nature cytokinine par Concentration en cytokinine : les moyennes ± erreur type suivis de la même lettre sont statistiquement identique au seuil de 5% ; Co = 0 mg/L ; C1 = 0,1 mg/L ; C2 = 0,5 mg/L ; C3 = 1 mg/L ; C4 = 2 mg/L ; C5 = 3 mg/L ; C6 = 4 mg/L.

DISCUSSION

Le succès de la propagation végétative des plantes *in vitro* dépend en grande partie de la réussite de la désinfection du matériel végétal utilisé pendant les différentes étapes. Elle permet de prévenir ou d'éviter la contamination microbienne et la détérioration du matériel végétal. En effet, les microorganismes, notamment les bactéries et les champignons, ainsi que certains acariens qui en sont vecteurs, peuvent être associés aux explants utilisés pour la régénération *in vitro* des végétaux (Omamor et al., 2007). Afin d'éviter ou de minimiser les risques de

contamination microbienne des organes, l'utilisation adéquate de bonnes techniques de désinfection est un préalable dans tout processus de régénération *in vitro* des végétaux. Elle devrait permettre l'élimination des risques de contamination microbienne (Naveena et Joy, 2016).

Dans cette étude, la désinfection des graines de *T. superba* à l'hypochlorite de calcium ($Ca(ClO)_2$) à 3% pendant 5 min, a considérablement réduit la contamination microbienne. Un résultat similaire a été rapporté par Muluken et Tileye (2018) chez les graines de *Echinops kebericho* Mesfin (Asteraceae) en utilisant du $Ca(ClO)_2$ à 5% pour une durée de désinfection de 4 min. Cela suggère que l'efficacité d'un protocole de désinfection dépendrait en partie de l'espèce à assainir. Selon certains auteurs, les techniques de désinfection des matériels végétaux utilisés en culture *in vitro* peuvent varier selon la nature et l'association des désinfectants, ainsi que leur concentration et la durée d'application (Soumahoro et al., 2014). En effet, les substances désinfectantes utilisées doivent avoir un double intérêt : d'une part éviter l'infection due à la propagation des bactéries et des champignons ; et d'autre part permettre d'éviter un traumatisme des tissus dû au désinfectant, qui pourrait conduire à leur nécrose et à la mort des tissus (Bouderrah, 1988). Il est donc conseillé d'éviter des produits agressifs ou des concentrations et des durées d'exposition qui pourraient altérer les organes utilisés (Abbasi et al., 2016 ; Dao et al., 2025).

Suite à la désinfection des graines ; l'imbibition des graines de *T. superba* dans l'eau pendant 48 H a favorisé la germination par rapport à une imbibition des graines pendant 24 H. L'entrée de l'eau dans la graine lors de l'imbibition, constitue la première phase du processus de germination des graines chez les angiospermes. En effet, l'eau est nécessaire pour hydrater les tissus et favoriser la croissance des organes (Gimeno, 2009). La durée d'imbibition est un facteur essentiel et tout aussi délicat du processus de germination. Selon certains auteurs, dans le processus de germination, une quantité minimum d'eau est exigée par la graine, mais un excès d'eau dans le milieu peut toutefois provoquer son asphyxie (Ren et al., 2018 ; Kumar Patel et al., 2019). La durée d'imbibition doit donc être juste suffisante. Pour des graines à téguments dures comme celles de *T. superba,* la perméabilité à l'eau des enveloppes de la graine peut exiger des durées d'imbibition relativement longues. Les résultats obtenus dans la présente étude suggèrent que l'imbibition des graines de *T. superba* pendant 24 H n'aurait pas favorisé une disponibilité en eau suffisante pour une bonne partie d'entre-elles, contrairement à l'imbibition pendant 48 H.

Par ailleurs, selon Vogt et Palma (1991), l'utilisation d'agents désinfectants avant l'imbibition des graines peut influencer les phases préliminaires de l'imbibition. Ces auteurs ont montré en effet que dès la phase de désinfection, les agents désinfectants peuvent détruire les enveloppes protectrices des graines permettant leur accès à l'eau sur toute leur surface et facilitant ainsi la phase d'imbibition. Ceci pourrait expliquer pourquoi, pour une même durée d'imbibition, les graines désinfectées avec le $Ca(ClO)_2$ 3% (plus concentré) ont une meilleure capacité de germination que celles désinfectées avec le chlorure de calcium 2 % (moins concentré). Ainsi, l'utilisation du $Ca(ClO)_2$ 3% pour la désinfection suivie d'une imbibition de 48 H a induit une capacité de germination plus grande.

La culture des graines sur milieu MS vitaminé suppléé de GA3 a augmenté significativement la capacité germinative ainsi que le taux de germination des graines de *T. superba*, qui étaient déjà considérables sur un milieu contenant uniquement du MS vitaminé. Le GA3 potentialiserait donc l'activité du MS vitaminé. Son action est encore plus grande quand les graines sont préalablement imbibées dans l'eau pendant 48 H. Il a été démontré que l'acide gibbérellique (GA3) induit la synthèse de l'α-amylase, responsable de la régulation des réserves d'amidon présentes dans la graine lors de la germination (Ochoa et al., 2015). Il est

largement utilisé comme promoteur ou inducteur de la germination chez plusieurs espèces de plantes (Tigabu et Odén, 2001). Ainsi, les effets de 48 H d'imbibition, qui ont favorisé essentiellement une entrée d'eau suffisante dans la graine, combinés à ceux du GA3 ont permis de créer de meilleures conditions de levée de dormance des graines de *T. superba* et donc une amélioration de la germination mise en évidence par des pourcentages plus élevés. Ces conditions ont été également favorables à des délais de germination plus courts et des durées plus longues. Tous ces facteurs sont intéressants pour la production rapide d'explants et la multiplication à grande échelle de la plante.

Les résultats de cette étude ont aussi révélé qu'en cuture *in vitro de T. superba,* le pourcentage de bourgeonnement, le nombre de bourgeons produits ainsi que le délai de bourgeonnement dépendaient de la concentration et de la nature de la cytokinine dans le milieu de culture. Ces résultats concordent avec ceux rapportés par Jawahar et al. (2008) sur des explants de (*Cardiospermum halicacabum* L.). Ces auteurs avaient observé que, les réponses morphogénétiques d'explants testés à différentes concentrations de BAP et KIN variaient en fonction du type de cytokinine utilisée. Ils ont démontré l'existence d'une concentration optimale spécifique de chaque cytokinine, au-dessus et en dessous de laquelle les réponses morphogénétiques des explants chutaient. Cela correspond à ce que les résultats obtenus dans la présente étude ont révélé. Toutefois, les délais de bourgeonnement diffèrent entre les cytokinines. Cette différence peut être due à la nature des cytokinines et des matériels biologiques utilisés dans chaque essai. En effet, *T. superba* qui a fait l'objet de cette étude, est une plante ligneuse alors que la *C. halicacabum* est une liane.

Par ailleurs, l'ajout de TDZ dans le milieu de multiplication, a induit le bourgeonnement de fragments d'apex de *T. superba* contrairement aux milieux sans TDZ. De nombreux auteurs ont montré que le TDZ est un régulateur de croissance très efficace dans la morphogenèse *in vitro* de nombreuses espèces de plantes dicotylédones, en particulier des espèces ligneuses récalcitrantes à la régénération *in vitro*, y compris les espèces forestières (El Kbiach et al., 2002 ; Wang et al., 2025 ; Kouassi et al. 2018). Son action serait de moduler le niveau d'hormone endogène des organes végétaux mis en culture en inhibant l'activité de la cytokinine oxydase (Wang et al., 2025). Cette action favoriserait l'élévation des niveaux endogènes de cytokinines par empêchement de leur dégradation en adénine et adénosine (Guo et Abbasi, 2011). Parmi les exemples des divers effets physiologiques mis en évidence, on peut citer la germination des graines, le débourrement accéléré, l'induction et la stimulation de la germination, l'induction de bourgeons, la croissance et le développement cotylédonaires (Mishra et al., 2018). Le taux de bourgeonnement et le nombre moyen de bourgeons par explant les plus importants ont été observés avec la concentration de 0,5 mg/L de TDZ. Pour des concentrations plus élevées (2 à 4 mg/L) ou plus faibles (0,1mg/L), le taux de bourgeonnement était environ deux fois moins élevé ou nul. En outre, les délais de bourgeonnement les plus courts sont observés pour les concentrations les plus faibles de TDZ utilisées, à savoir 0,1 et 0,5 mg/L. Ces observations indiquent qu'une plage de concentrations de TDZ située entre 0,1 et 0,5 mg/L peut être appliquée au milieu de multiplication de *T. superba*.

Certains auteurs ont démontré que l'utilisation du TDZ donne un pourcentage de multiplication et un nombre moyen de bourgeons par culture d'autant plus élevés que sa concentration dans le milieu est faible (Singh et al., 2001). Guo et Abbasi (2011) suggèrent que pour commencer la régénération *in vitro* d'une nouvelle espèce à partir du TDZ, il faudrait conserver 100 nM comme concentration de référence et estimer deux trajectoires de préparations, c'est-à-dire certaines avec des concentrations au-dessus et d'autres au-dessous de ce seuil.

Par ailleurs, chez certaines espèces, l'utilisation du TDZ aurait des inconvénients dans les phases ultérieures à la phase de bourgeonnement. Ceux-ci comprennent l'hyperhydricité (Debergh et al., 1992), la morphologie anormale des feuilles (Cambecedes et al., 1991), des pousses courtes et compactes (Mundhara et Rashid, 2005) des difficultés d'élongation et d'enracinement des pousses (Mundhara et Rashid, 2005). Ainsi, il convient de poursuivre les investigations sur la multiplication de *T. superba*, en vue de définir tous les paramètres qui contribuent à la fois à une bonne quantité et qualité des vitro plants.

Conclusion

Au terme des expérimentations visant à élaborer un protocole de laboratoire pour améliorer la germination des graines et la multiplication *in vitro* de *Terminalia superba*, les résultats ont permis d'observer que l'hypochlorite de calcium 3% a réduit la contamination microbienne. Ainsi, pour obtenir un bon taux de désinfection et de germination, les graines doivent être imbibées 48 heures dans de l'eau distillée stérile avant d'être ensemencées sur milieu enrichi de 10^{-3} M de GA3. L'Etude de l'effet de la concentration en cytokinines sur la production des bourgeons de *T. superba* a révélé que 1 mg/L de BAP avait induit les meilleures réponses de bourgeonnement des apex. Pour donc disposer de matériels de plantation à profusion de *T. superba* selon les résultats de cette étude, les apex doivent être cultivés sur milieu contenant 1 mg/L de BAP. Les résultats obtenus dans cette étude sont encourageants ; toutefois, des investigations complémentaires sont nécessaires pour mieux affiner le processus, car des plants enracinés n'ont pu être obtenus dans cette étude.

CONFLIT D'INTERETS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts en lien avec cette étude.

CONTRIBUTIONS DES AUTEURS

PT a collecté et rédigé la première version du manuscrit ; LO a contribué à l'interprétation des résultats et à la révision du manuscrit ; TK a conçu l'étude, supervisé les expériences et à contribuer à l'analyse statistiques des données. YT a contribué à la rédaction et à la révision de l'article ; FD a contribué à la rédaction et à la révision critique de l'article ; MK a coordonné la recherche et validé les résultats. Tous les auteurs ont lu et approuvé la version finale du manuscrit.

REMERCIEMENTS

Nous remercions la SODEFOR pour avoir mis à notre disposition les graines de fraké. Bien que ces graines soient une ressource si précieuse dans leur collection, elle nous les a offertes gratuitement pour réaliser cette étude.

REFERENCES

Abbasi Z, Singh RP, Gautam DNS. 2016. A novel aseptic technique for micropropagation of *Aloe vera* Mill. *Adv. Herb. Med.*, **2**(3): 47-60. https://api.semanticscholar.org/CorpusID:58975467.

Achard F, Eva H, Stibig H, Mayaux P, Gallego J, Richards T, Malingreau J. 2002. Determination of deforestation rates of the world's humid tropical forests. *Science*, **297**(5583): 999-1002. DOI: 10.1126/science.107065.

Assalé AAY, Barima YSS, Kouakou, KA, Kouakou ATM, Bogaert J. 2016. Agents de dégradation d'une aire protégée après une décennie de conflits en Côte d'Ivoire : cas de la forêt classée du Haut-Sassandra. *Int. J. Innov. Sci. Res.*, **22**(1): 123-133. http://www.ijisr.issr-journals.org/.

Asomaning JM, Sacande M, Olympio NS. 2011. Germination responses of *Terminalia superba* Engl. and Diels seeds on the 2-way Grant's thermogradient

plate. *Res. J. Seed Sci.*, **4**(1): 28-39. DOI : 10.3923/rjss.2011.28.39.

Bouderrah M. 1988. Comparaison de deux modes de vitropropagation à partir de vitrosemis d'*Eucalyptus camaldulensis* provenance Lake albacutya « Micropropagation à partir de bourgeons axillaires, micropropagation à partir de bourgeons adventifs » et étude de la variabilité du comportement de différents clones. Thèse d'état, Université Henri Poincaré Nancy1 (France), p.143.

Cambecedes J, Duron M, Decourtye L. 1991. Adventitious bud regeneration from leaf explants of the shrubby ornamental honeysuckle, *Lonicera nitida* Wils. cv "Maigrun": effects of thidiazuron and 2,3,5-triiodobenzoic acid. *Plant Cell Report*, **10**: 471-474. https://doi.org/10.1007/BF00233817

Chevalier JF. 2018. Etude de capitalisation des acquis de l'expérience en plantations de bois d'œuvre en Côte d'Ivoire. Rapport d'étude, Association Technique Internationale des Bois Tropicaux, p.60.

Dao JP, Fofana B, Soumahoro BA, Kouakou C, Kouadio EYG, Cherif M, Kouakou KL. 2025. *In vitro* germination of Garcinia kola seeds and seedlings growth: Effects of disinfection protocols and culture media. *Int. J. Biol. Chem. Sci.,* **19**(4): 1350-1360. DOI: https://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v19i4.3

Dea GB, Carron M-P, Koffi EK, Keli JZ, Leconte A, Drémou C. 2000. Intégration de la culture in vitro dans la recherche pluridisciplinaire pour l'amélioration de l'hévéaculture en Côte d'Ivoire. *Agron. Afr.*, **12**(1): 11-21. DOI: 10.4314/aga.v12i1.1609.

Debergh P, Aitken-Christie J, Cohen D. 1992. Reconsideration of the term "vitrification" as used in micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.*, **30**: 135-140. DOI: https://doi.org/10.1007/BF00034307.

Eaux et forêts. 2018. L'exploitation forestière en Côte d'Ivoire. Magazine d'informations du Ministère des Eaux et Forêts, N°2, février 2018, pp 44.

El Kbiach ML, Lamarti A, Abdali A, Badoc A. 2002. Culture *in vitro* des bourgeons axillaires du Chêne-Liège (*Quercus suber* L.). *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **141**: 73-88.

Etienne H, Bertrand B, Montagnon C, Bobadilla Landey R, Dechamp E, Jourdan I, Alpizar E, Malo E, Georget F. 2012. Un exemple de transfert de technologie réussi dans le domaine de la micropropagation : la multiplication de *Coffea arabica* par embryogenèse somatique. *Cah. Agric.*, **21** : 115-24. DOI: 10.1684/agr.2012.0553.

Gimeno-Gilles C. 2009. Etude cellulaire et moléculaire de la germination chez *Medicago truncatula*. Thèse de doctorat. Biologie cellulaire et moléculaire. Université d'Angers, Angers (France), p.172.

Guo B, Abbasi BH, Zeb A, Xu L, Wei YH. 2011. Thidiazuron: A multidimensional plant growth regulator. *Afr. J. Biotechnol.*, **10**(45): 8984-9000. DOI : 10.5897/AJB11.636.

Hansen MC, Potapov PV, Moore R, Hancher M, Turubanova SA, Tyukavina A,Thau D, Stehman S, Goetz SJ, Loveland TR. 2013. High-resolution global maps of 21st-century forest cover change. *Science*, **342**: 850-853. DOI: 10.1126/science.12446.

Jawahar M, Karthikeyan AVP, Vijai D, Maharajan M, Ravipaul S, Jeyseelan M. 2008. *In vitro* plant regeneration from different explants of *Cardiospermum helicacabum* L. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **2**(1): 14-20.

Koné T, Soumahoro BA, Coulibaly KZ, Traoré S, Koné D, Koné M. 2016. Effects of substrates, weight and physiological stage of suckers on massive propagation of plantain (*Musa paradisiaca* L.). *Int. J. Res. Granthaalayah.*, **4**(1): 1-13. DOI: 10.29121/granthaalayah.v4.i1.2016.2837 .

Kouadio YJC, Cisse A, Kpangui BK, Tiebre M, Ouattara D, N'Guessan EK. 2021. Processus De Creation D'une Zone De Conservation De La Biodiversite Sur Le Barrage Hydroelectrique De Soubre, Sud-Ouest De La Côte D'ivoire. *Eur. Sci. J.*, **17**(40) : 56-73. DOI: https://doi.org/10.19044/esj.2021.v17n40p56.

Kouassi MK, Koffi EK, Silue O, Tahi MG, Toure M, Konan EPK. 2018. Comparison of systems combining auxins with thidiazuron or kinetin supplemented with polyvinylpirrolidone during embryogenic callus induction in three Theobroma cacao L. genotypes. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **12**(2): 804-811. DOI: https://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v12i2.15

Kumar Patel M, Pandey S, Burritt DJ, Phan Tran LS. 2019. Plant responses to low-oxygen stress: interplay between ROS and NO signaling pathways. *Environ. Exp. Bot.*, **161**: 134-142. DOI: https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.02.013.

Louppé D, Oteng-Amoako AA, Brink M. 2008. Ressources végétales de l'Afrique tropicale 7(1). Bois d'oeuvre 1. [Traduction de : Plant Resources of Tropical Africa 7(1). Timbers 1.]. Fondation PROTA, Wageningen, Pays-Bas / Backhuys Publishers, Leiden, Pays-Bas / CTA, Wageningen (Pays-Bas), p. 785.

Mishra JP, Bhadrawale D, Yadav U, Mohammad N, Shirin F. 2018. Effect of various plant growth regulators on in vitro seed germination and shoot organogenesis in *Tectona grandis* Lf. *Tro. Plant Res.*, **5**(2): 152-159. DOI: https://doi.org/10.22271/tpr.2018.v5.i2.

Muluken E, Tileye F. 2018. *In vitro* shoot regeneration from leaf explants of Echinops kebericho: an endangered endemic medicinal plant. *Plant. Biosyst-An Int. J. Dealing all Aspects Plant. Bio.*, **153**(2): 199-204. DOI: https://doi.org/10.1080/11263504.2018.1448014.

Mundhara R, Rashid A. 2005. TDZ-induced triple-response and shoot formation on intact seedling of Linum, putative role of ethylene in regeneration. *Plant Sci.*, **170**: 185-190. DOI: 10.1016/j.plantsci.2005.06.015.

Murashige T, Skoog F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Plant Physiol.*, **15**: 473-497. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

Naveena V, Joy PP. 2016. Plant tissue culture contaminants identification and its response to fumigation. *Biotechnol. Adv.*, **22**(4): 32-36.

Noufé D, Lidon B, Mahe G, Servat E, Brou YT, Bi Zueli K, Chaleard JL. 2011. Variabilité climatique et production de maïs en culture pluviale dans l'Est Ivoirien. *Hydrol. Sci. J.*, **56**(1): 152-167. DOI: https://doi.org/10.1080/02626667.2010.545247.

Ochoa MJ, González-Flores LM, Cruz-Rubio JM, Portillo L, Gómez-Leyva1 JF. 2015. Effect of substrate and gibberellic acid (GA3) on seed germination in ten cultivars of *Opuntia sps*. *J. Prof. Assoc. Cactus Dev.*, **17**: 50-60. DOI: https://doi.org/10.56890/jpacd.v17i.61.

Omamor IB, Asemota AO, Eke CR, Eziashi EI. 2007. Fungal contaminants of the oïl palm tissue culture in Nigerian Institute for Oil Palm Research (NIFOR). *Afr. J. Agric. Res.,* **2**(10): 534-537. http://www.academicjournals.org/AJAR.

Ren B, Zhang J, Dong S, Liu P, Zhao B. 2018**.** Responses of carbon metabolism and antioxidant system of summer maize to waterlogging at different stages. *J. Agron. Crop Sci.,* **204**(5): 505-514. DOI: https://doi.org/10.1111/jac.12275.

Ruf F, Schroth G, Doffangui K. 2015. Climate change, cocoa migrations and deforestation in West Africa: what does

the past tell us about the future? *Sustain. Sci.*, **10**: 101-111. DOI: https://doi.org/10.1007/s11625-014-0282-4.

Singh V, Tyagi A, Chauhan PK, Kumari P, Kaushal S. 2011. Identification and prevention of bacterial contimination on explant used in plant tissue culture labs. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, **3**: 160-163. https://api.semanticscholar.org/CorpusID:73602360.

Soumahoro AB, Koné T, Koné M, Konaté S, Kouadio JY, Zouzou M. 2014. Etablissement d'un protocole efficace de germination des graines du thé de savane (*Lippia multiflora* MOLD., Verbenaceae). *Agron. Afr.*, **26**(2): 137-145. DOI: https://doi.org/10.4314/aga.v26i2.

Tigabu M, Odén PC. 2001. Effect of scarification, gibberellic acid and temperature on seed germination of two multipurpose *Albizia* species from Ethiopia. *Seed Sci.Technol.*, **29**(1): 11-20. https://api.semanticscholar.org/CorpusID:89069366.

Tutu K, Akol C. 2009. Reversing Africa's deforestation for sustainable development. In *Appropriate Technologies for Environmental Protection in the Developing World: Selected Papers from ERTEP 2007, July 17–19 2007, Ghana, Africa* (pp. 25-34). Dordrecht: Springer Netherlands.

Vogt GF, Palma B. 1991. Influence de quelques produits désinfectants sur le pouvoir d'imbibition des graines d'Acacia senegal. Rôle des différentes parties du tégument. *Phyton* (Horn Austria), **31** : 97- 109.

Wang F, Li Y, Pang Y, Hu J, Kang X, Qian C. 2025. Thidiazuron Enhances Strawberry Shoot Multiplication by Regulating Hormone Signal Transduction Pathways. *Int. J. Mol. Sci.*, **26**(9): 4060. DOI: https://doi.org/10.3390/ijms26094060.