



**UNIVERSITE D'ANTANANARIVO
FACULTE DES SCIENCES**



**MEMOIRE D'OBTENTION DU DIPLOME D'ETUDE APPROFONDIE
EN BIOLOGIE ET ECOLOGIE VEGETALES
OPTION : PHYSIOLOGIE VEGETALE**

**TECHNIQUES POUR LA CULTURE ASEPTIQUE INITIALE
DE *Prunus africana* Hook.f (Kalkman, 1965)**



Présenté par : RASOANANDRASANA Razanabahoaka

Soutenu publiquement le 22 janvier 2010

Devant la commission d'examen composée de :

**Président : Professeur RAMAVOVOLOLONA, Professeur
à la Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo**

**Rapporteur : Docteur RALAMBOFETRA Eliane, Maître de conférences
à la Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo**

**Examineur : Docteur RAMANAMPAMONJY Nivohanintsoa, Maître de conférences
à la Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo**





**UNIVERSITE D'ANTANANARIVO
FACULTE DES SCIENCES**



**MEMOIRE D'OBTENTION DU DIPLOME D'ETUDE APPROFONDIE
EN BIOLOGIE ET ECOLOGIE VEGETALES
OPTION : PHYSIOLOGIE VEGETALE**

**TECHNIQUES POUR LA CULTURE ASEPTIQUE INITIALE
DE *Prunus africana* Hook.f (Kalkman, 1965)**



Présenté par : RASOANANDRASANA Razanabahoaka

Soutenu publiquement le 22 janvier 2010

Devant la commission d'examen composée de :

**Président : Professeur RAMAVOVOLOLONA, Professeur
à la Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo**

**Rapporteur : Docteur RALAMBOFETRA Eliane, Maître de conférences
à la Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo**

**Examineur : Docteur RAMANAMPAMONJY Nivohanintsoa, Maître de conférences
à la Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo**



Remerciements

Nous adressons nos plus vifs remerciements ainsi que notre profonde reconnaissance à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce mémoire.

- Madame RAMAVOVOLOLONA, Professeur à la Faculté des Sciences, Responsable de la Formation Doctorale en Biologie et Ecologie Végétales. Vous avez eu la bonne volonté de corriger la rédaction, de nous donner des conseils et vous nous avez fait le grand honneur d'accepter de présider la présentation du mémoire, malgré vos multiples préoccupations et vos lourdes tâches. Que vous trouvez ici l'expression de notre profonde reconnaissance ;
- Madame RALAMBOFETRA Eliane, Maître de Conférences à la Faculté des Sciences. Vous avez bien voulu nous encadrer pédagogiquement, guider énormément la rédaction et accepter d'être le Rapporteur de ce travail en dépit de vos multiples responsabilités. Nous sommes heureux de témoigner ici nos sincères remerciements ainsi que nos humbles respects ;
- Madame RAMANAMPAMONJY Nivohanintsoa, Maître de Conférences à la Faculté des Sciences. Malgré vos multiples responsabilités, vous avez bien voulu examiner et juger ce travail. Que vous trouvez ici l'expression de notre profonde gratitude ;
- Il nous est agréable d'annoncer que ce mémoire a pu être réalisé grâce au soutien matériel et financier du CNARP ; nous remercions tout particulièrement Monsieur ANDRIANTSOA Maminirina, Directeur du CNARP au moment où nous avons effectué nos travaux de stage et Monsieur RAKOTOBÉ Etienne, Directeur du CNARP ;

Madame ANDRIANTSOA Léontine, Chercheur au CNARP, Département de Botanique et d'Ethnobotanique. Vous avez bien voulu nous encadrer techniquement, inspirer et diriger tous nos travaux, vous n'avez pas ménagé votre temps et vos efforts jusqu'à la fin des travaux. Nous vous remercions d'avoir activement participé à notre formation ;

- Ceux qui, de près ou de loin, nous ont aidé à la réalisation de ce Mémoire :
 - Tout le Personnel du Laboratoire de Physiologie Végétale ;
 - Tout le Personnel et les techniciens du Laboratoire du CNARP ;
 - Notre Famille et notre Fils ZANAKAVOSOA Tafita,

Nous vous remercions de votre courtoisie et de votre aide.

« Que la grâce et la paix vous soient données de la part de Dieu notre Père et du Seigneur Jésus

Christ ». Philippiens 1/ 2.

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION	1
GENERALITES	
I. PRESENTATION DE LA PLANTE ETUDIEE.....	3
II. TRANSPLANTATION DES PLANTULES DE <i>Prunus africana</i>	4
III. BOUTURAGE	5
IV. MICROBOUTURAGE <i>IN VITRO</i>	5
METHODOLOGIE	
I. RECONNAISSANCE DE <i>Prunus africana</i> DANS SON MILIEU NATUREL.....	8
II. DOMESTICATION DE LA PLANTE	8
II.1. TRANSPLANTATION <i>ex situ</i> DES PLANTULES	9
II.1.1. Récolte des plantules, empotage et transport.....	9
II.1.2. Pépiniérisation et entretiens des plantules	9
II.1.3. Suivi du développement de <i>Prunus africana</i> transplantée en pépinière	11
II.1.4. Suivi de l'acclimatation de <i>Prunus africana</i> au milieu d'expérimentation.....	11
II. 2. BOUTURAGE.....	11
II.2.1. Différents types de boutures utilisées.....	12
II.2.2. Etude des effets du substrat et de la phytohormone sur la rhizogenèse des boutures	12
III. ETABLISSEMENT DE LA CULTURE ASEPTIQUE INITIALE DE LA.....	14
<i>VITROPROPAGATION</i>	14
III.1. PROTOCOLE DE REALISATION D'UNE CULTURE.....	14
III.2. CHOIX DE L'EXPLANT	15
III.3. RECHERCHE DES CONDITIONS DE DESINFECTION DE LA CULTURE ...	16
III.4. MISE AU POINT DES MILIEUX DE CULTURE.....	17

III.4.1. Test de l'effet de l'ANA et du BAP sur l'organogenèse de l'explant.....	17
III.4.2. Test de l'effet du 2,4-D et du BAP sur l'organogenèse de l'explant	18
III.4.3. Comparaison de l'effet du 2,4-D à celui de l'ANA sur l'organogenèse	
de l'explant	18
III.4.4. Test de l'effet de la gibbérelline (GA ₃) sur le développement de	18
l'explant noeud.....	18
III.4.5. Cultures effectuées avec les nœuds prélevés lors du repos végétatif.....	18

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

I. SITUATION DE <i>Prunus africana</i> DANS SON MILIEU NATUREL	20
II. TRANSPLANTATION DE <i>Prunus africana</i>	21
II.1. DEVELOPPEMENT DES PLANTULES DE <i>Prunus africana</i>	21
TRANSPLANTEES EN PEPINIERE	21
II.1.1. Reprise de végétation de <i>Prunus africana</i>	21
II.1.2. Vitesse d'élongation des axes de <i>Prunus africana</i>	22
II.1.3. Nombre de feuilles néoformées par plant.....	22
II.2. ADAPTATION DE <i>Prunus africana</i> AU MILIEU D'EXPERIMENTATION	22
II.3. CONCLUSION SUR LA TRANSPLANTATION.....	25
III. BOUTURAGE DE <i>Prunus africana</i>	25
III.1. APTITUDE DES DIFFERENTES PARTIES DU RAMEAU	
AU BOUTURAGE	26
III.2. EFFET DU SUBSTRAT OU DES PHYTOHORMONES SUR LA FORMATION	
DES EBAUCHES RACINAIRES	26
III.3. CONCLUSION SUR LE BOUTURAGE.....	27
IV. CONDITIONS D'OBTENTION DE CULTURE ASEPTIQUE INITIALE	28
IV.1. CHOIX DE L'EXPLANT DE <i>Prunus africana</i>	28
IV.2. CONDITIONS DE DESINFECTION DE LA CULTURE	29
IV.3. EFFETS DU MILIEU DE CULTURE SUR LE DEVELOPPEMENT DE	
L'EXPLANT DE <i>Prunus africana</i>	30
IV.3.1. Callogénèse des explants de <i>Prunus africana</i>	30
IV.3.2. Débournement du bourgeon axillaire du nœud de <i>Prunus africana</i>	32

IV.3.3. Différence entre l'effet de l'ANA et celui du 2,4-D sur l'organogenèse de <i>Prunus africana</i>	34
IV.3.4. Développement des explants nœuds lors du repos végétatif.....	34
IV.4. CONCLUSION SUR LA VITROPROPAGATION.	35
DISCUSSIONS	36
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	40
BIBLIOGRAPHIE	42

LISTE DES ABREVIATIONS

Produits chimiques :

AIB	: Acide Indole Butyrique
ANA	: Acide Naphtalène Acétique
BAP	: 6-Benzylaminopurine
CaOCl ₂	: Hypochlorite de calcium
GA ₃	: Acide gibbérellique
2,4 -D	: Acide Dichlorophénoxyacétique

Organismes

CITES	: Convention sur le Commerce International des Espèces de faune et de flore Sauvages menacés d'extinction
CNARP	: Centre National d'Applications des Recherches Pharmaceutiques
LDI	: Landcape Development Interventions
PDM	: Phelps Dots Madagascar
PRONATEX	: Produits Naturels d'Exportation
SODIP	: Société pour le Développement Industriel des Plantes
STOI	: Société Trading de l'Océan Indien

GLOSSAIRE

Acuminé : à extrémité pointue

Apex : extrémité d'une racine ou d'une tige

Cal : amas de cellules proliférées et indifférenciées

Callogenèse : néoformation de cal

Culture in vitro (micropropagation ou vitropropagation) : technique visant à régénérer une plante entière à partir de cellules ou de tissus végétaux en milieu nutritif, en utilisant des techniques modernes de culture cellulaire

Explant (microplant) : matériel végétal de base qui servira à produire des clones végétaux à partir d'une plante mère et éventuellement mis en culture *in vitro*

Ex situ : hors site

Feuilles alternes : Feuilles insérées isolément et à des niveaux différents sur une tige ou un rameau

In situ : sur place

Mull forestier : humus des forêts feuillues tempérées sur sol brun

Phyllotaxie : ordre dans lequel sont insérés les feuilles ou les rameaux sur la tige d'une plante

Principe actif : substance qui possède un effet thérapeutique

Rhizogenèse : processus qui conditionne la formation et le développement de racines des végétaux

Totipotence : propriété d'une cellule de se différencier en n'importe quelle cellule spécialisée et de se structurer en formant un être vivant multicellulaires. C'est l'aptitude à exprimer la totalité des potentialités du génome d'une espèce

LISTE DES TABLEAUX

1 : Différents types de substrats et de phytohormones utilisés par le bouturage suivant le cas étudié.....	13
2: Age relatif des explants.....	15
3: Différents types de milieux de cultures testés (mis au point) par la culture d'explant de <i>Prunus africana</i> selon le cas étudié.....	19
4 : Effet de la présence de feuilles et de la décapitation sur la reprise de végétation du plant de <i>Prunus africana</i>	21
5 : Vitesse d'élongation des axes pour chaque type de bourgeon.....	22
6 : Effet des fumures sur le développement de <i>Prunus africana</i> dans le milieu d'expérimentation.....	23
7 : Formation d'ébauches racinaires des boutures de <i>Prunus africana</i> sous l'effet du fumier <i>taroka</i> et de différentes phytohormones.....	26
8 : Aptitude des différents organes de <i>Prunus africana</i> à la culture dans le milieu de base en fonction de la durée de leur désinfection.....	28
9 : Désinfection des explants de <i>Prunus africana</i>	29
10 : Effet de la composition hormonale du milieu de culture sur la callogenèse chez <i>Prunus africana</i>	30
11 : Effet de la composition hormonale du milieu de culture sur le débourrement du bourgeon axillaire de l'explant nœud de <i>Prunus africana</i>	32
12: Efficacité du 2,4-D sur le débourrement du bourgeon axillaire du nœud chez <i>Prunus africana</i>	34
13 : Débourrement du bourgeon axillaire de <i>Prunus africana</i> lors du repos végétatif en fonction de la composition hormonale du milieu de culture.....	35

LISTE DES ANNEXES

1 : Nom vernaculaire de <i>Prunus africana</i> suivant la région où il se trouve	
2 : Fiches d'enquêtes suivant la méthode semi- directive dans la région de Moramanga	
3 : Composition du milieu MS	
4 : Fiche technique de STOI-AGRI : Compositions et caractéristiques du fumier <i>taroka</i>	
5 : Représentation de quelques protocoles expérimentaux par des figures	
6 : Carte de distribution géographique de <i>Prunus africana</i>	

INTRODUCTION

Prunus africana est une plante qui tient une place importante dans le domaine de l'ethnopharmacopée et de l'économie malgache. Son écorce renferme un principe actif de nature lipidique stéroïque (BRUNETON, 1993). Cette substance extraite de l'écorce est utilisée en médecine pour le traitement de l'hypertrophie bénigne de la prostate (DUFOUR *et al.*, 1984 ; CLAVERT *et al.*, 1986). Le produit fini est dénommé *tadenan* ou *pygényl* (RAVELOMANANTSOA, 1996).

La tige et les feuilles de cette plante sont utilisées sous forme de tisane en médecine traditionnelle (RANDRIAMBOLOLONA, 1994 ; DESCHEEMAEKER, 1986).

Mises à part les propriétés médicinales, elle peut être aussi utilisée comme bois de construction du fait de sa dureté.

Le Cameroun a été pendant plusieurs années jusqu'en 1996, le seul pays exportateur d'écorce et d'extrait de *Prunus africana*.

Madagascar a commencé à exporter le produit brut depuis 1972. Les sociétés qui ont exploité *Prunus africana* à Madagascar sont : SODIP, PRONATEX et Indena Madagascar (RAVELOMANANTSOA, 1996). En 2002, soixante pour cent (60%) du rendement économique par l'exportation des plantes médicinales proviennent de *Prunus africana*, soit quatre cent dix-huit milliards six cent millions (418.600.000.000) d'ariary (RAOEL, 2003).

Les récoltes ont été effectuées, d'une façon irrationnelle, par les populations riveraines des zones productrices. Les unes abattent les arbres abondamment et fréquemment avant le stade de maturation, soit 1 pied par jour et 4 à 6 fois par semaine ; les autres écorcent totalement le tronc (RANDRIAMBOLOLONA, 1994).

Suite à cette exploitation intensive et aux mauvaises méthodes de récolte, *Prunus africana* est devenue très rare, les porte-graines sont disparus et sa régénération naturelle est réduite (DAWSON et RABEVOHITRA, 1996 ; SVEN et RAKOTONIRINA, 1995). Cette espèce est actuellement menacée d'extinction et figure dans l'annexe II de la CITES depuis 1995, ainsi la récolte est défendue (DIRECTION DES EAUX ET FORETS 2002).

La plupart des essais de régénération et de multiplication de *Prunus africana* par la germination des graines, la transplantation et le bouturage entreprises par différents

organismes ont échoué (ANDRIANTSIFERANA, 1999 ; FANJANARIVO, 2000 RANDRIANIAINA, 2003).

Trois sociétés (PRONATEX, PDM et LDI) en collaboration (2000) et RANDRIANIAINA (2003) ont réussi d'adapter des plantules transplantées dans leur milieu d'expérimentation. Les taux de réussite sont respectivement de 5% et 100% (fiche N°3 annexe 2 ; RANDRIANIAINA, 2003).

Par le bouturage, RAJAONARIVONY (1998) et RABEMANANJARA (2003) ont obtenu la reprise de la bouture, avec des taux respectifs de 15,30% et de 12,50%. Les travaux de RAMAROSON (2006) ont donné un taux global d'enracinement de 40,70% ainsi que la régénération de la plante entière ; ceux effectués à l'extérieur de Madagascar ont abouti à l'enracinement mais le taux de réussite n'est pas mentionné dans les documents (ASSAH *et al*, 2002).

La *vitropropagation* appliquée par RANDRIANIAINA (2003) a conduit à la callogenèse et au débourrement des bourgeons axillaires, mais il n'a pas pu régénérer la plante entière.

En vue de la conservation de *Prunus africana*, le présent travail porte sur des essais de transplantation et de bouturage, et sur la mise au point de la culture aseptique initiale de la *vitropropagation* à partir de la feuille et de la tige.

GENERALITES

I. PRESENTATION DE LA PLANTE ETUDIEE

Prunus africana est une plante ligneuse de port arborescent. Au stade adulte, sa hauteur atteint une trentaine de mètres (RANDRIAMBOLOLONA ,1994).

En tant que prunier, cette espèce entre au repos végétatif en hiver et elle pousse sur le sol de pH acide (BRETAUDEAU et FAURÉ, 1991) ; elle est avide d'eau et préfère le sol de type MULL forestier humide et riche en humus (ANRIAMANALINTSOA, 2000).

D'après le système de classification de Cronquist (BRUMMITT, 1992), *Prunus africana* appartient aux :

- Règne : VEGETAL
- Sous - règne : TRACHEOBIONTA
- Embranchement : MAGNOLIOPHYTA
- Classe : MAGNOLIOPSIDA
- Sous - classe : ROSIDAE
- Ordre : ROSALES
- Famille : ROSACEAE
- Genre : *Prunus*
- Espèce : *africana* Hook. f.
- Synonymes : *Pygeum africanum*

Le nom vernaculaire varie suivant la région où se trouve l'espèce (Annexe 1) (EAUX ET FORETS, 2003). Elle a été exploitée depuis 1972 dans la région d'Anosibe an'Ala et sur l'axe Moramanga-Ambatondrazaka où son nom est *kotofihy*, actuellement c'est le nom vernaculaire le plus utilisé.

L'aire géographique de *Prunus africana* est délimitée dans les zones tropicales (CARDOT, 1908). Elle est rencontrée uniquement en Afrique et à Madagascar (GRAHAM, 1960 ; KALKMAN, 1965).

Avant son exploitation à Madagascar, *Prunus africana* a été trouvée à Fianarantsoa, à Anosibe an'ala, sur l'axe Moramanga-Ambatondrazaka, à Mandritsara, à Befandriana Nord,

à Bealalana, à Tsaratanàna et dans la région d'Anjozorobe, commune d'Ambongamarina (carte de distribution géographique : annexe 6).

Nos études ont débuté dans la forêt de Maromizaha en juillet 2001. Cette forêt est incluse dans la partie Ouest de la région de Moramanga qui est une région montagneuse de 900 à 1400 m d'altitude (ZEBROWSKI, 1967). Ce site se trouve sous un bioclimat régional humide tempéré (KOECHLIN *et al.*, 1974).

II. TRANSPLANTATION DES PLANTULES DE *Prunus africana*

La transplantation des plantules de *Prunus africana* prélevées de leur milieu naturel requiert certaines précautions, telles que : la lutte contre la dessiccation de la plante, la lutte contre les microorganismes parasites et l'amélioration de la nutrition de la plante.

En effet, les plantes sont souvent exposées à un risque de dessiccation au niveau des feuilles et des racines au cours de la transplantation (J. Cl. H., 1977). Pour éviter la déperdition d'eau, tout plant arraché le matin doit être planté le soir en évitant toute exposition au vent et au soleil. Si cette condition s'avère impossible, on procède au pralinage des racines, qui consiste à tremper les racines dans une bouillie liquide de terre additionnée de fumier d'étable (ROOK, 1970).

Pour lutter contre les microorganismes parasites, le traitement appliqué consiste à :

- laver la partie infestée avec du détergent;
- utiliser de produits chimiques antiparasites ;
- enlever les parties infestées ;
- réduire le courant d'air pouvant apporter des microorganismes

(ANDRIAMANALINTSOA, 2000).

La nutrition de la plante est améliorée par l'apport d'engrais. L'utilisation de l'engrais biologique est bénéfique étant donné qu'il présente moins de risque de toxicité pour la plante (RACHMELER, 1997).

III. BOUTURAGE

Le bouturage est un procédé selon lequel la plante se développe à partir de fragments d'organes détachés de la plante mère, placés dans des conditions favorables. Il peut être réalisé avec divers organes, tels que les rameaux feuillés ou non feuillés, la feuille, le bourgeon ou les racines (DOMINIQUE et BRON, 1989).

Deux types de substrat peuvent être utilisés pour le bouturage *in vivo* : le substrat sol et l'eau (BURLE, 1962).

Le bouturage est plus efficace au moment de la reprise de la végétation parce que la bouture vient de passer une phase de repos végétatif (HELLER, 1978). Ainsi, le repiquage doit être effectué à cette période.

La réussite du bouturage nécessite des boutures jeunes, bien aoûtées (en phase de reprise de végétation) et des facteurs de l'environnement bien équilibrés comme la température, la teneur en CO₂ et l'humidité (DOMINIQUE et BRON, 1989).

Le traitement de la bouture par les phytohormones ou par l'apport de fumier favorise l'enracinement (BURLE, 1962).

IV. MICROBOUTURAGE *IN VITRO*

Le microbouturage *in vitro* est une technique de *vitropropagation* ou culture *in vitro* qui présente certains avantages dont entre autres:

- la multiplication de la plante à partir de n'importe quel organe,
- l'obtention d'un nombre élevé de jeunes plants dans un délai relativement réduit,
- l'élaboration du programme indépendamment des saisons, la culture étant à l'abri de tout aléa climatique,
- la pratique ne nécessite que quelques mètres carrés de local climatisé,
- l'atténuation du prélèvement d'organes effectué *in situ*.

Cette technique peut être appliquée sur *Prunus africana* (RAHELINIRINA, 1977).

Le microbouturage *in vitro* comprend trois stades (BOXUS, 1989) :

- Stade I : établissement de la culture aseptique initiale,
- Stade II : multiplication des microplants,
- Stade III : enracinement des microplants.

On distingue deux méthodes fondamentales de microbouturage *in vitro*:

- la première consiste à multiplier et à développer les bourgeons préformés, par division des pousses axillaires, pour donner naissance directement à des plantes.
- la seconde est orientée vers la néoformation des bourgeons en provoquant l'apparition des bourgeons adventifs en des endroits inhabituels ou en favorisant la différenciation d'embryon somatique. (MARGARA, 1989). Les organes, fragments d'organe, tissus ou cellules peuvent proliférer de façon anarchique et constituer des amas de cellules indifférenciées appelées cals. Les bourgeons sont néoformés à partir de la différenciation de ces cals (ZRÝD, 1988).

Le bon déroulement de la culture *in vitro* réside dans les trois conditions suivante :

- état physiologique de l'explant

“Avec un matériel jeune, la multiplication et la réactivité *in vitro* sont souvent aisées à obtenir”(BOULAY, 1984). L'exigence d'une période de repos végétatif avant la levée de dormance doit être satisfaisante. Ainsi, les organes jeunes, en fin de croissance, ont une aptitude plus grande au bourgeonnement *in vitro* (CHAUSSAT et BIGOT, 1980).

Les cellules doivent être totipotentes, c'est-à-dire, elles doivent posséder toutes les informations génétiques nécessaires à la régénération de la plante entière (STEWART et MEARS, 1958).

Le développement de l'explant varie selon sa localisation sur le pied de la plante mère (AUGE et al., 1986).

- désinfection de la culture

En général, le milieu de culture est stérilisé par autoclavage, et la désinfection du matériel végétal se fait à l'aide d'agents oxydants, parmi ceux-ci, les plus utilisés sont l'hypochlorite de calcium ou de sodium (BOXUS, 1995).

- qualité du milieu de culture

Les phytohormones constituent un des principaux facteurs de l'organogénèse.

- La cytokinine.

Pour déclencher le bourgeonnement, le Benzyl Amino Purine (BAP) convient en général mieux pour les ligneux (BOXUS, 1995). Cette efficacité du BAP a été vérifiée dans la culture de *Tamarindus indica* (PAWAN *et al.*, 1991).

- L'auxine.

Pour déclencher l'enracinement, les types d'auxine les plus utilisés sont l'Acide Naphtalène Acétique (ANA) et l'Acide Dichlorophénoxyacétique (2,4-D). L'ANA est une auxine plus stable et résiste même à l'autoclavage et à la lumière (MARGARA, 1989). Le 2, 4-D est une auxine très forte et devient rapidement toxique à l'explant, elle doit être donc utilisée à faible dose (MARGARA, 1989).

- La gibbérelline.

L'Acide Gibbérellique (GA₃) a pour rôle de lever la dormance du matériel végétal et de stimuler la croissance en longueur de la tige (ZRÝD, 1988).

Lorsque le rapport auxine/cytokinine dans le milieu de culture est inférieur à l'unité, on obtient la néoformation de bourgeon, mais lorsque ce rapport est supérieur à l'unité, on s'attend à la néoformation de la racine (SKOOG et MILLER 1957).

(Figure3 : annexe 5)

METHODOLOGIE

Trois étapes ont été suivies dans le présent travail en vue de la multiplication de *Prunus africana* :

- reconnaissance de l'espèce dans son milieu naturel. Ces études ont été complétées par des enquêtes et de visite de pépinière de *Prunus africana* ;
- domestication de la plante dans notre milieu d'expérimentation ;
- établissement de la culture aseptique initiale en vue de la *vitropropagation* de cette espèce.

I. RECONNAISSANCE DE *Prunus africana* DANS SON MILIEU NATUREL

Dans le but de nous familiariser avec l'espèce, nous avons procédé :

1- à des enquêtes ethnobotaniques dans la région de Moramanga, suivant la méthode par entretien semi directif (FABIENNE *et al.* 1995). Ces enquêtes portent sur la connaissance de l'espèce au niveau de la population riveraine, le mode et la fréquence de récolte ainsi que la régénération de la plante.

2- à la visite d'une pépinière de *Prunus africana* réalisée par LDI à Ambatovy Moramanga pour nous renseigner sur la technique de sa régénération.

3- aux observations directes de cette espèce dans la forêt de Maromizaha à Moramanga. Nos travaux ont été axés sur :

- sa morphologie, par détermination de la forme de ses feuilles, de la phyllotaxie et du type de son port.
- l'identification du type de sol dans cette forêt à partir d'un échantillon prélevé.
- la densité de l'espèce dans son site naturel, par comptage des pieds par hectare.

II. DOMESTICATION DE LA PLANTE

Nos travaux ont porté sur la transplantation des plantules et le bouturage, effectués dans le jardin d'expérimentation du CNARP d'Androhibe à Antananarivo. Les plants obtenus nous ont servi de sources d'explants pour approvisionner la *vitropropagation*.

Avant toute opération, une mesure de l'altitude ainsi qu'une étude succincte du sol du milieu d'expérimentation ont été effectuées.

Le développement des plants a été suivi pendant une année (de juillet 2001 à juin 2002).

II.1. TRANSPLANTATION *ex situ* DES PLANTULES

Nos objectifs ont été d'étudier l'adaptation, la vitesse de croissance et le développement de *Prunus africana* dans le milieu d'expérimentation.

II.1.1. Récolte des plantules, empotage et transport

Soixante quatre plantules ont été récoltées dans la forêt de Maromizaha en Juillet 2001. Leur taille varie de 15 à 120 cm. Leur pied est arraché en veillant à ce que leurs racines ne soient pas abîmées.

L'empotage a été fait sur place dans la matinée du jour même de la récolte (ROOK, 1970). Le substrat d'empotage est composé d'un mélange à parts égales de sol noir en provenance de la forêt, site naturel de l'espèce et de sol rouge prélevé d'une colline voisine. Ce substrat a été mis dans un sachet en plastique noir de 15 cm de diamètre et de 20 cm de hauteur (annexe 5 : figure 1).

Les plants empotés ont été bien arrosés, tenus à l'ombre et mis à l'abri de tout facteur mécanique pour éviter la chute des feuilles pendant le transport.

II.1.2. Pépiniérisation et entretiens des plantules

Les 64 plants récoltés ont été répartis en deux lots: plants feuillés et plants défoliés.

Arrivés au lieu d'expérimentation, les plants empotés ont été mis en pépinière pendant six mois, dans une parcelle de 1,50 x 1,20 m, et les pieds sont répartis au hasard, distant de 15 cm les uns des autres. Les plants ont été protégés du fort courant d'air par une feuille de plastique transparente et de l'insolation par une plaque de tige de *Cyperus sp.*

Au cours de la pépiniérisation, les techniques d'entretien suivantes ont été appliquées aux plantules : arrosage, décapitation, lutte contre les microorganismes parasites et apport de fumier.

- Arrosage

Un arrosage a eu lieu 2 fois par jour pendant les deux premières semaines, puis une fois par jour pendant la troisième et quatrième semaine, et tous les deux jours jusqu'à la fin de l'expérience.

- Décapitation

C'est une technique qui provoque la ramification par la levée de la dominance apicale (CHAMPAGNAT, 1963 ; CHAMPAGNAT et al., 1969). Cette opération a été effectuée pendant la phase de repos végétatif, avant le débourrement, sur 33 plants dont 26 feuillés et 7 défeuillés. Les plants servant de témoins n'ont pas été décapités, soit 25 feuillés et 6 défeuillés.

- Lutte contre les microorganismes parasites

Pour protéger le principe actif du matériel végétal, seule la lutte prophylactique a été appliquée : lorsque la contamination n'atteint que la surface de l'organe, on pratique un lavage avec un détergent suivi de plusieurs rinçages de la partie infestée ; quand celle-ci attaque le tissu en profondeur, on enlève entièrement la partie endommagée.

(ANDRIAMANALINTSOA, 2000).

- Apport de fumier

Pour les 50% des pots, au substrat d'empotage a été ajouté du fumier organique *taroka* à raison de 100 g par pied (STOI-AGRI : fiche technique).

Pour le suivi, la fréquence des observations a été de trois fois par semaine pendant les quatre premiers mois ; ensuite, une fois par semaine pour le cinquième mois et enfin, une fois par mois.

II.1.3. Suivi du développement de *Prunus africana* transplantée en pépinière

Cette étude est basée sur :

- la détermination de la date du débourrement de chaque plant qui indique la reprise de végétation,
- la mesure de la longueur de l'axe des bourgeons néoformés pour évaluer la vitesse de croissance en longueur de l'espèce,
- le comptage du nombre de feuilles néoformées pour évaluer la vitesse d'augmentation de la biomasse foliaire.

II.1.4. Suivi de l'acclimatation de *Prunus africana* au milieu d'expérimentation

Le transfert des plants de la pépinière au milieu de plantation a été effectué pendant la saison de pluie, au mois de décembre 2002 (après six mois de passage en pépinière).

Des trous de dimensions de 50 x 50 x 50 cm et distants de 2 m ont été mis en place. Chaque trou est rempli d'une brouette de fumure qui est constituée par un mélange en partie égale de fumier et de sol du milieu d'expérimentation.

Deux types de fumier ont été utilisés :

- le fumier d'étable (RAJAONARIVONY, 1998),
- le fumier de ferme mélangé avec de la sciure de bois (BURLE, 1962).

Pour chaque type de fumier, 16 plants (12 décapités et 4 non décapités) ont été plantés. Des trous sans fumier ont été utilisés comme milieux témoins et 11 plants (4 décapités et 7 non décapités) y ont été plantés.

Le suivi des plants a été effectué de la même façon qu'au début de la pépiniérisation.

II. 2. BOUTURAGE

Les expérimentations ont été effectuées avec utilisation de rameaux primaires de *Prunus africana*, d'engrais biologique (*taroka*, produit par STOI-AGRI) et de phytohormones. Les boutures utilisées ont été récoltées dans la forêt de Maromizaha au mois de juillet 2001.

II.2.1. Différents types de boutures utilisées

Il existe un gradient d'aptitude à l'enracinement le long d'un même rameau (FAVRE, 1980). Ainsi les boutures simples utilisées ont été prélevées sur différentes parties du rameau primaire :

- partie terminale
- portion médiane ou médiane -basale
- portion basale (annexe 5 : figure 2)

II.2.2. Etude des effets du substrat et de la phytohormone sur la rhizogenèse des boutures

Le tableau 1 montre les différents types de substrats et de phytohormones utilisées par le bouturage pour étudier leurs effets sur la rhizogenèse.

Deux types de substrat ont été utilisés : sol ou eau.

- Bouturage avec le substrat sol

Un substrat témoin S1 constitué par 50% sol du milieu d'expérimentation et 50% sable de rivière, et un substrat S2 composé par S1 additionné de *taroka*, ont été mis en place.

Les substrats ont été mis dans des sachets en plastique noir de 5 cm de diamètre et de 15 cm de hauteur. Ces pots ont été disposés dans un milieu d'expérimentation qui mesure 1 m de largeur et 4 m de longueur. Ce milieu est recouvert de tissu en plastique transparent en guise de mini- serre.

- Bouturage à l'eau

Le substrat S3 est composé d'eau additionnée de bécovit et de charbon de bois. Le bécovit renferme de la vitamine B1 qui empêche le flétrissement de la bouture (EVANS, 1951). Le charbon de bois évite le croupissement de l'eau (Tableau 1) (MISSION *et al.*, 1983).

Pour chaque type de substrat, les boutures ont été traitées par trempage dans la solution contenant les phytohormones Acide Indole- Butyrique (AIB) ou le mélange AIB + Acide Naphtalène Acétique (ANA), pendant 24h (EVANS, 1951). (Tableau 1).

Tableau 1 : Différents types de substrats et de phytohormones utilisés par le bouturage suivant le cas étudié

Cas étudiés	Type de substrat et sa composition	Phytohormones utilisées au traitement de la bouture
Témoin	Substrat S1 : 1/2 sable + 1/2 sol rouge	–
Effet du fumier <i>taroka</i>	substrat S2 : 1/3 sable + 1/3 sol rouge +1/3 <i>taroka</i>	–
Effet des phytohormones	substrat S1 : 1/2 sable + 1/2 sol rouge	AIB (40 mg/l)
		AIB (35 mg/l) + ANA (35 mg/l)
Effet combiné du <i>taroka</i> et des phytohormones	substrat S2 : 1/3 sable + 1/3 sol rouge + 1/3 <i>taroka</i>	AIB (40 mg/l)
		AIB (35 mg/l) + ANA (35 mg/l)
Le bouturage à l'eau	substrat S3 : Eau + Becovit (200 mg/l) + charbon 100 g/l)	–
		AIB (40 mg/l)
		AIB (35 mg/l) + ANA (35 mg/l)

Le sol rouge est prélevé du jardin d'expérimentation du CNARP

Chaque condition de bouturage constitue un test, et chaque test a été répété 3 fois. Chaque répétition comporte 6 boutures. Le repiquage n'a pu être effectué que trois jours après la récolte.

III. ETABLISSEMENT DE LA CULTURE ASEPTIQUE INITIALE DE LA VITROPROPAGATION

La *vitropropagation* appliquée à la culture de méristème de *Prunus pandora* par BOXUS en 1971 a été appliquée dans ce travail.

Nos travaux ont été focalisés sur l'établissement de la culture aseptique initiale ou stade I de la *vitropropagation*. Ce stade est le plus délicat et constitue la majeure partie des travaux de régénération *in vitro* (BOXUS, 1989). Il s'agit de :

- la détermination de l'explant à utiliser;
- la recherche des conditions de désinfection de la culture ;
- la mise au point des milieux de culture.

Pour permettre l'adaptation de la plante dans son nouveau milieu, ainsi que le prélèvement des explants sur celle-ci, les expérimentations n'ont pu commencer qu'un an après la transplantation, et elles ont été effectuées au laboratoire du CNARP d'Androhibe à Antananarivo.

Les méthodes utilisées sont la callogenèse et le bourgeonnement direct.

Pour chaque essai, 12 tubes ont étéensemencés avec 3 répétitions.

III.1. PROTOCOLE DE REALISATION D'UNE CULTURE

La réalisation d'une culture suit les étapes suivantes :

- lavage des rameaux de 2 à 3,5 cm portant des feuilles ou des bourgeons à l'eau du robinet ;
- fragmentation du matériel végétal en explants ;
- trempage dans l'éthanol à 70% pendant 2 mn (ZRÏD, 1988) ;
- rinçage à l'eau distillée stérile 3 à 5 fois ;
- désinfection à l'hypochlorite de calcium (CaOCl_2) à 6% ;
- rinçage à l'eau distillée stérile 3 à 5 fois ;
- ensemencement effectué sous une hotte à flux laminaire.

Les tubes ensemencés sont placés dans un local climatisé à une température comprise entre 25 et 28°C et une intensité lumineuse de 3000 lux durant 16 sur 24 heures.

Après l'application de CaOCl_2 , les explants ont été trempés dans une solution de pénicilline 1 mg/l pendant 1 heure avant la mise en culture.

III.2. CHOIX DE L'EXPLANT

Le choix de l'explant tient compte du type d'organe, de son âge et de son état physiologique (BOXUS, 1989). Les organes testés ont été les nœuds, les entre-nœuds et les feuilles.

Les feuilles de dimension 0,5 à 1 cm de côté sont disposées de deux façons :

- face inférieure tournée vers le haut (Position Fi)
- face supérieure tournée vers le haut (Position Fs).

La polarité de la tige est respectée (partie apicale tournée vers le haut).

Des explants de différents âges ont été récoltés sur un même pied. L'âge de l'explant est évalué par sa localisation sur le rameau pour la tige et par le nombre de jour, compté à partir du début de débourrement pour la feuille (AUGE *et al.*, 1986). Cette évaluation est consignée dans le tableau 2.

Tableau 2 : Age relatif des explants

Organes	Age relatif	Très jeune	Jeune	Peu âgé	Agé
Feuille	en jour	Moins de 14 jours	14 à 20 jours	20 à 30 jours	Plus de 30 jours
Tige	localisation à partir de l'apex	De l'extrémité supérieur à 1 cm	1 à 2,5 cm	2,5 à 3,5 cm	3,5 cm et plus

Les explants choisis sont ceux vigoureux et sains. La connaissance de cet état physiologique dépend des observations directes sur le pied mère.

La récolte a été effectuée à la reprise de végétation (entre mois d'août et mars) et pendant le repos végétatif (entre le mois d'avril et juillet).

L'aptitude de l'explant à la culture est évaluée par le pourcentage des cals ou des bourgeons obtenus.

Le milieu de culture utilisé a été le milieu de base (MO) qui est composé de :

- MS (4,4 g/l), milieu de Murashige et Skoog (MURASHIGE ET SKOOG, 1962), (annexe 3) ;
- saccharose (20 g/l) ;
- agar (solidifiant) (8 g/l), (DEBERG, 1983).

Le MS constitue donc le 13,58% du milieu de base (MO).

III.3. RECHERCHE DES CONDITIONS DE DESINFECTION DE LA CULTURE

La technique de désinfection des explants adoptée a été l'utilisation de l'hypochlorite de calcium (CaOCl_2), étant donné que ceci est un produit qui ne pénètre pas profondément dans le tissu (BOXUS, 1995). Des tests préliminaires ont été effectués avec les concentrations de 5%, 6% et 7% selon la méthode de KNUDSON (1948) et 9% selon la méthode de BOXUS et QUOIRIN (1974). Ces concentrations ont été combinées avec différents temps de trempage : 5, 10, 15 et 20 mn.

Les milieux de culture ont été stérilisés par autoclavage à 110°C pendant 15 mn (BOXUS et QUOIRIN, 1974).

Notons que pour le matériel provenant des régions humides, la contamination primaire est principalement constituée de bactéries qui sont parfois difficiles à éliminer (DUHEM, 1988). Ainsi, ces tests préliminaires ont permis de fixer la dose du désinfectant (CaOCl_2) à 6% et le temps de trempage à 10 mn pour la feuille et 15 mn pour la tige ; de traiter tout explant par la pénicilline 1 mg/l pendant 1 h, après l'application de CaOCl_2 .

III.4. MISE AU POINT DES MILIEUX DE CULTURE

En vue d'étudier l'effet des phytohormones sur le développement de l'explant, le milieu de base MO est additionné :

- de cytokinine : Benzyl Amino Purine (BAP),
- d'auxine : Acide Naphtalène Acétique (ANA) ou Acide Dichlorophénoxyacétique (2,4-D),
- de gibbérelline : Acide Gibbérellique (GA₃).

L'effet de l'ANA et celui du 2,4-D ont été testés sur l'organogenèse des explants nœuds ou feuilles en position Fs (face supérieure tournée vers le haut).

Le milieu de culture est ajusté à un pH voisin de 5 (BOXUS et QUOIRIN, 1974).

III.4.1. Test de l'effet de l'ANA et du BAP sur l'organogenèse de l'explant

La cytokinine la plus utilisée au microbouturage des plantes ligneuses est le BAP (MARGARA, 1989). Cet auteur préconise une concentration de 0,1 mg/l d'ANA et 1 mg/l de BAP. Ceci donne pour le rapport auxine/cytokinine une valeur de 1/10.

L'optimisation du milieu de culture a permis d'effectuer deux groupes de manipulation :

- d'une part, selon PADMANABAN en 1974, la néoformation de bourgeons dépend aussi bien de la concentration des phytohormones que de leur proportion. Les concentrations des deux types d'hormone ont varié de 0,1 à 0,8 mg/l pour l'ANA et de 1 à 8 mg/l pour le BAP (tableau 3).

- d'autre part, la proportion entre l'auxine et le cytokinine a varié de 0/1 à 1/100 (tableau 3). Cette modification du rapport ANA/BAP tient compte de la théorie de SKOOG et MILLER en 1957, sur le rôle de l'équilibre auxine-cytokinine dans l'orientation de l'organogenèse en culture *in vitro* (annexe5 : figure 3).

III.4.2. Test de l'effet du 2,4-D et du BAP sur l'organogenèse de l'explant

Le milieu composé de 0,02 mg/l de 2,4-D et de 1 mg/l de BAP a déclenché le bourgeonnement axillaire dans les travaux sur trois espèces de *Prunus* : *P. pandora*, *P. accolade* et *P. serrulata* (BOXUS et QUOIRIN, 1974). Le rapport 2,4-D/BAP a été donc de 1/50. Ce milieu a été utilisé dans la culture de *Prunus africana* (milieu de culture MO8).

Le seuil de concentration efficace en 2,4-D et en BAP a été déterminé en diminuant leur concentration, tout en gardant la proportion 1/50.

III.4.3. Comparaison de l'effet du 2,4-D à celui de l'ANA sur l'organogenèse de l'explant

Les travaux ont été effectués avec les milieux de culture qui ont donné les meilleurs résultats à la callogenèse ou au débourrement à partir de nos expérimentations sur l'étude de l'effet de l'ANA ou du 2,4-D sur l'organogenèse de l'explant. L'ANA a été utilisé de la même façon que le 2,4-D pour ces milieux.

III.4.4. Test de l'effet de la gibbérelline (GA₃) sur le développement de l'explant nœud

Au milieu de culture MO8 a été ajouté de 0,01 mg/l de GA₃. La proportion hormonale utilisée a été tirée de la méthode proposée dans la culture de *Prunus avium* (BOXUS et QUOIRIN, 1974).

III.4.5. Cultures effectuées avec les nœuds prélevés lors du repos végétatif

Les cultures ont été faites au cours du repos végétatif de l'espèce.

Les expérimentations ont été effectuées avec les mêmes milieux de culture qui ont donné des résultats positifs au cours de la reprise de végétation.

Les milieux mis au point sont consignés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Différents types de milieux de culture testés (mis au point) par la culture d'explant de *Prunus africana* selon le cas étudié

Cas étudiés	Dénomination du milieu	Substances ajoutées au milieu de base MO à MS 13,58% (mg/l)				Rapport aux /cytok
		ANA	2,4-D	BAP	GA ₃	
Témoin	MO	-	-	-	-	-
Effet de la concentration en hormones ANA et BAP	MO1	0,1	-	1	-	1/10
	MO2	0,2	-	2	-	
	MO3	0,4	-	4	-	
	MO4	0,6	-	6	-	
	MO5	0,8	-	8	-	
Effet du rapport ANA / BAP	MO/P	0,0	-	1	-	0/1
	MO6	0,1	-	2	-	1/20
	MO7	0,1	-	10	-	1/100
Effet du rapport 2,4-D / BAP	MO8	-	0,02	1	-	1/50
	MO9	-	0,018	0,9	-	
Comparaison de l'effet de l'ANA et du 2,4-D	MO8 / AN	0,02	-	1	-	1/50
	MO5 / D	-	0,8	8	-	1/10
Effet de GA ₃	MO8 / G	-	0,02	1	0,01	1/50

Rapport aux/cytok = Rapport auxine/cytokinine

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

Les résultats obtenus par nos expérimentations sur *Prunus africana* portent sur :

- des renseignements sur son importance et son exploitation,
- son développement au cours de la transplantation,
- sa multiplication par bouturage *et par vitropropagation*.

I. SITUATION DE *Prunus africana* DANS SON MILIEU NATUREL

Lors des enquêtes effectuées dans la région de Moramanga, nous avons recueilli des renseignements sur l'exploitation de *Prunus africana* (annexe 2).

Dans cette région, cette espèce est connue sous le nom de *Kotofihy* ; son exploitation constitue une offre d'emploi ainsi qu'une source de revenu pour les paysans. Seule l'écorce intéresse les exploitants ; alors, les récolteurs abattent les pieds d'arbre et après les avoir écorcé, ils abandonnent les troncs dans la forêt.

Les observations de l'arbre dans son site naturel ont été effectuées dans la forêt de Maromizaha à Moramanga. Dans ce milieu, le sol est de type Mull forestier avec un pH acide (voisin de 5).

Prunus africana est une espèce ligneuse arborescente. Les feuilles sont allongées, entières, acuminés, à bord denté et à phyllotaxie alterne.

Sur une superficie de 1 ha, nous n'avons trouvé qu'un seul plant adulte abattu, entouré de 27 individus de 1,5 à 10 m de haut avec 2 à 10 cm de diamètre ; les pieds sont distants de 0,5 à 7 m. A une distance environ 800 m, il y a un groupe de plusieurs jeunes plants, plus de 100 pieds.

Ce sont les deux seuls endroits où nous avons pu rencontrer des pieds de *Prunus africana* dans cette forêt et les pieds semenciers n'existent plus.

Ces observations nous ont suggéré que les jeunes pousses peuvent nécessiter une plus forte luminosité, ainsi elles ne pourront se développer qu'après abattage du pied mère.

II. TRANSPLANTATION DE *Prunus africana*

II.1. DEVELOPPEMENT DES PLANTULES DE *Prunus africana*

TRANSPLANTEES EN PEPINIERE

Au cours de la pépiniérisation, le développement de cette espèce a été évalué par sa reprise de végétation et sa vitesse de croissance.

II.1.1. Reprise de végétation de *Prunus africana*

La reprise de végétation est exprimée par le débourrement des bourgeons du plant. Elle a commencé 6 semaines après la mise en pépinière des plantules (dernière semaine du mois d'août) et dure pendant 5 mois (jusqu'au mois de janvier).

Les résultats obtenus six mois après la pépiniérisation sont consignés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Effet de la présence de feuilles et de la décapitation sur la reprise de végétation du plant de *Prunus africana*

Nombre de plants par groupe	Plants feuillés (51)				Plants défoliés (13)			
	décapités (26)		non décapités (25)		décapités (7)		non décapités(6)	
	Avec <i>taroka</i>	Sans <i>taroka</i>	Avec <i>taroka</i>	Sans <i>taroka</i>	Avec <i>taroka</i>	Sans <i>taroka</i>	Avec <i>taroka</i>	Sans <i>taroka</i>
Nombre de plantules qui débourrent	13	13	9	6	1	1	0	0
Taux de réussite (%)	100		60		29		0	

Pour les 64 plants récoltés, 13 ont perdu leurs feuilles et 51 les ont gardé. Les plants feuillés présentent le taux de performance au débourrement le plus élevé, soit 100% pour les décapités (26 sur 26 plants) et 60% pour les non décapités (15 sur 25 plants) ; alors que pour les plants défoliés, ce taux est de 29% pour les décapités (2 sur 7 plants) et 0% pour les non décapités (0 sur 6 plants).

Le meilleur résultat a été obtenu en décapitant les plants lors de la transplantation.

Ce sont les plants traités par l'engrais biologique *taroka* qui débourrent en premier.

II.1.2. Vitesse d'élongation des axes de *Prunus africana*

Au cours de la reprise de végétation (mois d'août au janvier), les axes néoformés se développent, leur vitesse d'élongation est consignée dans le tableau 5.

Tableau 5 : Vitesse d'élongation des axes pour chaque type de bourgeon

		Bourgeon apical (sur l'axe principal)	Bourgeon latéral du plant non décapité (sur l'axe latéral)	bourgeon latéral du plant décapité (sur l'axe latéral)
Vitesse d'élongation de l'axe (cm/mois)	lente	0,1	0,2	0,2
	rapide	1,32	2,10	2,80

D'après le tableau 5, l'élongation de l'axe latéral est plus rapide que celle de l'axe principal, soit 0,1 à 1,32 cm par mois pour les bourgeons terminaux, tandis que celle des bourgeons latéraux a été de 0,2 à 2,10 cm par mois pour les plants non décapités et de 0,2 à 2,80 cm par mois pour les plants décapités.

La vitesse de croissance la plus rapide est observée pendant la saison chaude (entre mois de septembre et novembre).

La décapitation semble ne pas avoir d'effet sur le développement du bourgeon latéral.

II.1.3. Nombre de feuilles néoformées par plant

Pour les plants décapités ou non, le nombre de feuilles néoformées pour chaque pied est en moyenne de 1 à 3 par mois pour chaque pied.

I.2. ADAPTATION DE *Prunus africana* AU MILIEU D'EXPERIMENTATION

Après 6 mois en pépinière, les plants ont été transférés au jardin d'expérimentation du CNARP. Ce milieu se trouve à 1250 m d'altitude et le sol a une coloration rouge de type ferrallitique avec un pH acide (voisin de 5). Les résultats relevés 8 mois après la plantation sont représentés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Effet des fumures sur le développement de *Prunus africana* dans le milieu d'expérimentation

Fumure utilisée (une brouette par trou)	Témoin		50% Bouse de vache fraîche + 50% S		50% Sciure de bois avec fumiers de ferme+ 50% S	
	Nombre de plants cultivés	4 décapités	7 non décapités	12 décapités	4 non décapités	12 décapités
Nombre de plantules qui se développent	2	0	12	4	10	2
Taux de réussite (%)	18,18		100		75	

S= Sol du milieu d'adoption

Le meilleur résultat est observé au niveau de l'utilisation du fumier d'étable avec un taux de réussite de 100%, il est suivi de celui avec utilisation de fumier de ferme additionné de sciure de bois. Les causes pourraient être la richesse en substances nutritives de ces fumiers et leur capacité de maintenir l'humidité du substrat (BURLE, 1962 ; RAJAONARIVONY, 1998).

Les plants cultivés sur le milieu témoin (sans fumier) se développent mal. Ils présentent des anomalies, signes de carence en substances nutritives comme le jaunissement et aussi une insuffisance de l'humidité (HELLER, 1981).

Les plants transplantés se développent bien dans le jardin d'expérimentation du CNARP. Cela montre la grande capacité d'adaptation de *Prunus africana* dans son nouvel habitat, or le milieu d'expérimentation et le site naturel de la plante diffèrent de la qualité du sol. Nous n'avons constaté aucune différence notable entre le développement des plantules de différentes tailles.

Les photos 1, 2 et 3 montrent l'effet de la fumure bouse de vache et de la décapitation sur le développement de *Prunus africana*, quatre mois après la transplantation.

La croissance est observée sur l'axe principal pour les plants non décapités (photo 1). Pour les plants décapités, ceux qui sont cultivés avec fumure bouse de vache sont bien développés et très ramifiés (photo 2) tandis que les plants cultivés sur le milieu sans fumier émettent des bourgeons latéraux mais à croissance lente (photo 3).

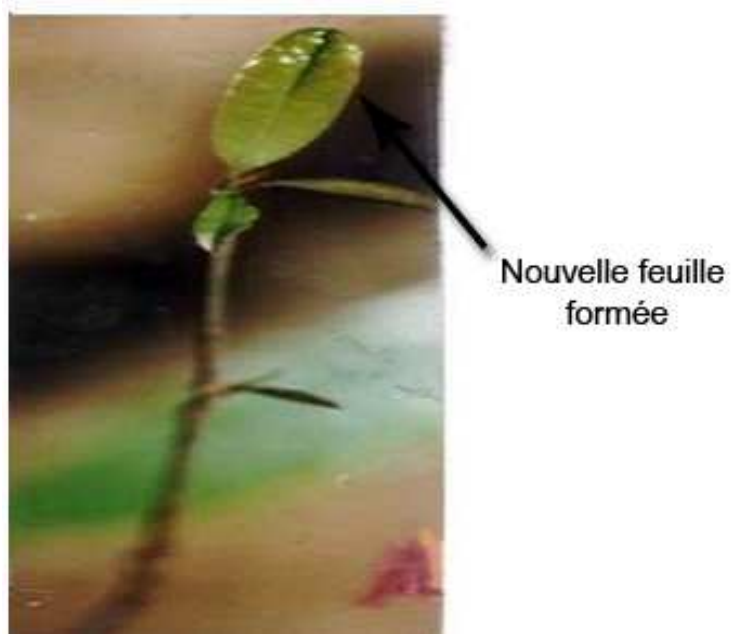


Photo1. Plant non décapité cultivé avec fumure bouse de vache



Photo2. Plant décapité cultivé avec fumure bouse de vache

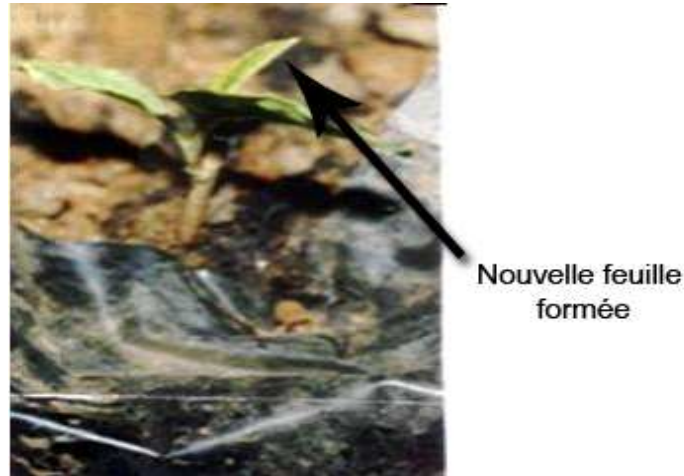


Photo 3. Plant empoté décapité

II.3. CONCLUSION SUR LA TRANSPLANTATION

Les plantules s'adaptent bien au milieu d'expérimentation (jardin du CNARP) étant donné qu'elles sont déjà enracinées ainsi qu'elles émettent facilement des bourgeons.

Le meilleur développement est obtenu par l'utilisation de fumure bouse de vache, la présence des feuilles portées par la plantule et l'application de la décapitation.

Notons qu'actuellement (2010), ces plantules se développent encore bien dans le milieu d'expérimentation.

III. BOUTURAGE DE *Prunus africana*

Des boutures prélevées des différentes parties du rameau (partie apicale, médiane ou médiane -basale et basale) ont été utilisées.

L'objectif de nos études a été de déterminer la bouture efficace et les effets de substrat ou des phytohormones sur l'enracinement de la bouture de *Prunus africana*.

III.1. APTITUDE DES DIFFERENTES PARTIES DU RAMEAU AU BOUTURAGE

Après 15 jours de repiquage, les boutures issues de la partie apicale du rameau ont pourri et celles de la partie basale sont desséchées.

Seules les boutures prélevées de la partie médiane ou médiane-basale restent en vie. Toutefois, 48 jours après la mise en terre, elles commencent à se dessécher et meurent après apparition d'ébauche de racine de 3 mm.

III.2. EFFET DU SUBSTRAT OU DES PHYTOHORMONES SUR LA FORMATION DES EBAUCHES RACINAIRES

Le taux de réussite de cette formation d'ébauche de racine est variable suivant le test effectué, selon le substrat ou la phytohormone utilisés (tableau 7).

Tableau 7 : Formation d'ébauches racinaires des boutures de *Prunus africana* sous l'effet du fumier *taroka* et de différentes phytohormones

Tests effectués	Composition du substrat	Phytohormones utilisées au traitement de la bouture	Taux d'ébauches racinaires obtenus par le test (%)
Test témoin	S1 : 1/2 sable + 1/2 sol rouge	–	T1 : 22,22
S1 + fumier <i>taroka</i>	S2 : 1/3 sable + 1/3 sol rouge + 1/3 <i>taroka</i>	–	T2 : 33,33
S1 + phytohormone	S1 : ½ sable + ½ sol rouge	AIB (40 mg/l)	T3 : 44,44
		AIB (35 mg/l) + ANA (35 mg/l)	T4 : 11,11
S1 + <i>taroka</i> + phytohormone	S2 : 1/3 sable + 1/3 sol rouge + 1/3 <i>taroka</i>	AIB (40 mg/l)	T5 : 55,55
		AIB (35 mg/l) + ANA (35 mg/l)	T6 : 16,66
Bouturage à l'eau	S3 : Eau + Becovit (200 mg/l) + charbon (100 g/l)	–	E1 : 0
		AIB (40 mg/l)	E2 : 0
		AIB (35 mg/l) + ANA (35 mg/l)	E3 : 0

T1,T2 , T3, T4, T5, T6, E1, E2 et E3 = dénomination des tests effectués

Avec le substrat S1 constitué de 1/2 sable et 1/2 sol rouge, un taux de réussite de 22,22% a été observé par le témoin (T1). Cela suggère l'existence d'hormones d'enracinement endogènes dans l'organe et la capacité de la bouture à les utiliser.

Avec le substrat S2 qui renferme du fumier *taroka*, le taux de réussite est supérieur à celui obtenu par le test témoin, soit 33,3% (T2) contre 22,22% (T1). Le *taroka* a donc un effet favorable à la formation d'ébauches racinaires. Mais l'enracinement total n'a pas été obtenu, les boutures dépérissent 48 jours après la mise en terre.

Par rapport au résultat du test témoin (T1) qui est de 22,22%, le taux de réussite est plus élevé, 44,44% (T3), pour les boutures traitées par l'AIB, tandis que ceci est plus faible, 11,11% (T4), en utilisant le mélange AIB + ANA. L'AIB est donc efficace, tandis que le mélange montre que ces deux hormones (AIB et ANA) sont antagonistes.

Le taux de réussite le plus élevé est obtenu par la combinaison du fumier *taroka* et de l'hormone AIB, soit 55,55% (T5). Cela suggère une synergie de fonctions entre cette hormone AIB et ce fumier.

Le bouturage à l'eau a échoué quel que soit le test effectué. Cela suggère que ce type de bouturage ne convient pas à cette espèce.

III.3. CONCLUSION SUR LE BOUTURAGE

Le bouturage de *Prunus africana* peut être réalisé avec les boutures appartenant à la partie médiane ou médiane-basale du rameau primaire.

Parmi les phytohormones d'enracinement, l'AIB est efficace pour la formation d'ébauches racinaires dont le taux de réussite est augmenté par l'utilisation du mélange de cette hormone avec le fumier *taroka*.

La saison favorable à cette culture reste à déterminer.

Rappelons que nos expérimentations ont été conduites au mois de juillet 2001.

IV. CONDITIONS D'OBTENTION DE CULTURE ASEPTIQUE INITIALE

Nos résultats ont abouti à la détermination des critères des trois bases principales de l'établissement de la culture aseptique initiale. Il s'agit du choix de l'explant, de la désinfection de la culture et de la mise au point des milieux de culture.

IV.1. CHOIX DE L'EXPLANT DE *Prunus africana*

La capacité de multiplication *in vitro* de *Prunus africana* varie suivant le type et l'âge de l'organe mis en culture et les conditions de désinfection appliquées à l'explant. Avec le milieu de base MO, les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Aptitude des différents organes de *Prunus africana* à la culture dans le milieu de base en fonction de la durée de leur désinfection

Explant	Durée de Trempage au CaOCl ₂ 6%	Taux de cals obtenus (%)
Feuille (Fi)	5 mn	25
	10 mn	08, 33
Feuille (Fs)	5 mn	50
	10 mn	33, 33
Noeud	5 mn	-
	10 mn	-
	15 mn	25

Fs : face supérieure tournée vers le haut Fi : face inférieure tournée vers le haut)

Pour les feuilles, la callogenèse a un taux de réussite variable suivant la position de la feuille et suivant la désinfection.

- Suivant la position de la feuille: les feuilles en position Fs s'adaptent mieux que celles en position Fi. La cause pourrait être la polarité non respectée pour Fi.

- Suivant la désinfection: lorsque la concentration du désinfectant augmente, le taux de performance de l'explant diminue parce que le désinfectant tue ou affaiblit les cellules de l'explant, alors, il leur est difficile de former des cals.

Pour la tige, la formation des cals a été seulement obtenue à partir des nœuds. Cela

montre que les bourgeons interviennent dans la callogenèse de la tige.

Notons que l'aptitude à la callogenèse a été seulement observée au niveau des explants jeunes. Les très jeunes cellules et les cellules sénescents n'ont pas donné de cals.

IV. 2. CONDITIONS DE DESINFECTION DE LA CULTURE

Pour tout type d'explant, l'augmentation du taux de brunissement et la baisse de celui de la contamination ont été observées, parallèlement à l'augmentation de la concentration du désinfectant (CaOCl₂) et de la durée du trempage de l'explant. Les résultats obtenus sont représentés par le tableau 9.

Tableau 9 : Désinfection des explants de *Prunus africana*

DTE (mn)	Explant		Concentration de CaOCl ₂							
			5%		6%		7%		9%	
			bru	cont	bru	cont	bru	cont	bru	cont
0	F		0	100	0	100	0	100	0	100
		T	0	100	0	100	0	100	0	100
5	F		0	100	0	44.44	33.33	66.67	83.33	16.67
		T	0	94.44	0	38.88	33.33	66.67	66.67	33.33
10	F		0	94.44	0	0	50	0	91.66	0
		T	0	91.66	0	27.77	50	50	75	25
15	F		0	80.55	16.66	0	75	0	100	0
		T	0	58.33	0	0	58.33	0	91.66	0
20	F		0	75	27.77	0	83.33	0	100	0
		T	0	50	11.11	0	75	0	100	0

DTE : Durée de trempage de l'explant bru : brunie cont : contaminé F : feuille T : Tige

Avec une durée de trempage de 5 mn dans le CaOCl₂ 6%, le taux de cals formés par la feuille est élevé (50%) mais la culture est vite contaminée. Les conditions retenues sont donc celles qui présentent la culture aseptique. Elles sont obtenues par application de CaOCl₂ 6% pendant 15 mn pour la tige (nœud et entre-nœud) et 10 mn pour la feuille ; suivie du trempage de l'explant dans la pénicilline 1 mg/l pendant 1 h.

IV.3. EFFETS DU MILIEU DE CULTURE SUR LE DEVELOPPEMENT DE L'EXPLANT DE *Prunus africana*

Par amélioration du milieu d'une étape à une autre, quatorze types de milieu ont été utilisés jusqu'à l'obtention des milieux appropriés donnant soit la callogenèse, soit le débourement des bourgeons axillaires.

IV.3.1. Callogenèse des explants de *Prunus africana*

Le changement de la concentration en phytohormones exogènes ou de la proportion auxine cytokinine du milieu fait varier le taux de réussite de la callogenèse.

En utilisant les phytohormones ANA et BAP, les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Effet de la composition hormonale du milieu de culture sur la callogenèse chez *Prunus africana*

TM	Substances ajoutées au milieu de base MO (mg/l)		Exp	Rapport ANA/BAP	Taux de cals obtenus (%)
	ANA	BAP			
MO	-	-	F	-	33,33
			T		25
MO 1	0,1	1	F, T	1/10	-
MO 2	0,2	2	F, T		-
MO 3	0,4	4	F, T		-
MO 4	0,6	6	F, T		-
MO 5	0,8	8	F		47,22
			T		83,33
MO/P	-	1	F, T	0/1	-
MO 6	0,1	2	F	1/20	75
			T		33
MO 7	0,1	10	F	1/100	58,33
			T		16,66

TM : type du milieu F : feuille T : tige (nœud) SA/MO : Exp : explant

Avec le milieu de base (sans hormone) MO, la callogenèse a été obtenue aussi bien avec la feuille qu'avec la tige mais avec un taux de réussite faible, soit 33% pour la feuille et 25% pour la tige.

Le milieu de culture sans auxine (MO/P) ne donne pas de formation de cal.

Par rapport à la concentration en phytohormones et au rapport auxine/cytokinine dans le milieu de culture :

- la meilleure réussite de la callogenèse de la feuille (75%) a été obtenue avec le rapport auxine/cytokinine 1/20 où la concentration de l'ANA est de 0,1 mg/l et celle de BAP est de 2 mg/l ;

- pour la callogenèse de la tige, le meilleur résultat (83,33%) a été obtenu avec le rapport auxine/cytokinine 1/10 où la concentration de l'ANA est de 0,8 mg/l et celle de BAP est de 8 mg/l (milieu MO5).

La photo 4 montre la formation des cals à partir de la culture des nœuds.



Photo 4 : Cals obtenus après 8^{ème} semaine de culture de nœud dans le milieu MO5

IV.3.2. Débourrement du bourgeon axillaire du nœud de *Prunus africana*

Les phytohormones utilisées ont été le 2,4-D, le BAP et le GA₃. Le rapport Auxine/cytokinine du milieu de culture a été de 1/50 (tableau 11).

Tableau 11 : Effet de la composition hormonale du milieu de culture sur le débourrement du bourgeon axillaire de l'explant nœud de *Prunus africana*

Cas étudiés	Type de milieu	Substances ajoutées au milieu de base MO (mg/l)			Rapport aux/cytok	Début du débourrement	Taux de Bourgeons axillaires obtenus (%)
		2,4-D	BAP	GA ₃			
Effet du rapport 2,4-D/BAP	MO8	0,02	1	-	1/50	8 ^{ème} jour	97,22
Seuil de concentration efficace en hormone	MO9	0,018	0,9	-		-	-
Effet de GA₃	MO8/G	0,02	1	0,01		8 ^{ème} jour	100

D'après le tableau 11, le milieu composé de 0,02 mg/l de 2,4-D et de 1 mg/l de BAP (M08) permet le débourrement des bourgeons axillaires des nœuds avec un taux de réussite de 97,22%, au bout de 8^{ème} jour de culture. Avec le milieu contenant de la gibbérelline (M08/G), le débourrement des bourgeons axillaires a commencé au bout de 8^{ème} jour, avec une performance de 100%.

En diminuant la concentration du BAP inférieure à 1 mg/l (0,9 mg/l), aucun résultat positif n'est obtenu.



Photo 5 : Bourgeon axillaire obtenu après 4^{ème} semaine de culture de nœud dans le milieu M08



Photo 6 : Bourgeon axillaire obtenu après 4^{ème} semaine de culture de nœud dans le milieu M08/G

Quatre semaines après l'ensemencement, l'axe du bourgeon émis est de 0,2 à 0,4 cm pour les explants cultivés dans le milieu M08/G avec gibbérelline (photo 6) et celui des explants cultivés dans le milieu M08 sans gibbérelline est de 0,1 à 0,3 cm (photo 5).

IV.3.3. Différence entre l'effet de l'ANA et celui du 2,4-D sur l'organogenèse de *Prunus africana*

Rappelons que les milieux de culture MO5 et M08 ont été respectivement convenables à la callogenèse des nœuds et au déclenchement du débourrement des bourgeons axillaires de *Prunus africana*.

En utilisant l'ANA de la même façon que le 2,4-D, le milieu MO8 est remplacé par le MO8/AN et le milieu MO5 par le MO5/D.

Le tableau 12 rapporte les résultats des cultures effectuées.

Tableau 12 : Efficacité du 2,4-D sur le débourrement du bourgeon axillaire du nœud chez *Prunus africana*

Type de milieu	Substances ajoutées au milieu de base MO (mg/l)			Rapport aux/cytok	Explant (nœud)	Début du débourrement	Taux de bourgeons axillaires obtenus (%)
	ANA	2,4-D	BAP				
MO8/AN	0,02	-	1	1/50	T	-	-
MO5/D	-	0,8	8	1/10	T	11 ^{ème} jour	75

L'essai avec le milieu MO8/AN n'a conduit ni à la formation de cal, ni au débourrement du bourgeon axillaire.

La substitution de l'ANA de ce milieu par le 2,4-D a abouti au débourrement des bourgeons axillaires au bout de 11^{ème} jour de culture. Le taux de réussite a été de 75%.

IV.3.4. Développement des explants nœuds lors du repos végétatif

Les cultures des nœuds effectuées lors du repos végétatif de *Prunus africana* ont donné les résultats représentés dans le tableau 13.

Tableau 13 : Débourrement du bourgeon axillaire de *Prunus africana* lors du repos végétatif en fonction de la composition hormonale du milieu de culture

Type de milieu	Substances ajoutées au milieu de base MO			Rapport aux/cytok	Explant (nœud)	Début du débourrement	Taux de bourgeons axillaires obtenus (%)
	2,4-D	BAP	GA ₃				
MO8	0,02	1	-	1/50	T	15 ^e jour	33,33
MO5/D	0,8	8	-	1/10	T	16 ^e jour	25
MO8/G	0,02	1	0,01	1/50	T	15 ^e jour	60

Les travaux de régénération *in vitro* de *Prunus africana* ont donné le débourrement du bourgeon axillaire même pour les explants prélevés en période de repos végétatif de la plante mère. Mais nous avons constaté la diminution du taux de réussite et le retard 7 à 8 jours du débourrement par rapport à ceux des explants prélevés au moment de la reprise de végétation.

Le taux de réussite le plus élevé est observé au niveau du milieu de culture avec gibbérelline GA₃ (MO8/ G).

IV.4. CONCLUSION SUR LA VITROPROPAGATION.

Les types d'explant de *Prunus africana* adaptés à la vitropropagation sont la feuille et la tige qui doivent être saines et jeunes. La culture aseptique est obtenue par application de la désinfection avec le CaOCl₂ à 6% pendant 10 mn pour la feuille et 15 mn pour la tige.

La culture de la feuille a donné des cals; celle de la tige aboutit à la callogenèse avec le milieu contenant d'ANA, et au débourrement des bourgeons en utilisant le 2,4-D.

DISCUSSIONS

L'absence de plant adulte dans l'habitat naturel montre la conséquence de la surexploitation de *Prunus africana*, qui est à l'origine de sa menace de disparition. Ainsi la notion de conservation de l'espèce est encore inappliquée.

La présence de jeunes pousses indique la possibilité de la régénération naturelle de cette espèce par les graines. Toutefois, ces plantules nécessitent encore des années pour fructifier ; elles doivent atteindre un DBH supérieur à 40 cm (RANDRIAMBOLOLONA, 1994).

En vue de la conservation de l'espèce de *Prunus africana*, nous avons procédé à l'étude de sa multiplication, par transplantation et bouturage, ainsi qu'à l'établissement de la culture aseptique initiale de la vitropropagation.

Le site naturel et le milieu d'expérimentation ont un climat humide tempéré ou frais ; ils diffèrent seulement de la qualité du sol. En effet, dans la forêt de Maromizaha, le sol est de type Mull forestier (humide et riche en humus), alors que celui du domaine du CNARP est de type ferrallitique. Mais l'adaptation des plantules dans leur nouvel habitat (au jardin d'expérimentation du CNARP d'Androhibe - Antananarivo) s'est effectuée sans difficulté, elles continuent à y pousser jusqu'à présent. Ces observations indiquent une relative non exigence de *Prunus africana* du point de vue adaptation.

Les feuilles assurent la production d'énergie nécessaire au développement de *Prunus africana* par le phénomène de photosynthèse.

La décapitation a un effet stimulateur sur le débourrement des axes latéraux, cela montre son rôle sur l'élimination de la dominance apicale.

L'engrais biologique *taroka* hâte la reprise de végétation de *Prunus africana* du fait de l'apport d'éléments nutritifs et du maintien de l'humidité du substrat.

La rapidité de la vitesse de croissance de l'axe latéral par rapport à celle de l'axe principal peut être due à la situation du bourgeon latéral éloignée du bourgeon terminal origine de la dominance apicale.

En ce qui concerne le bouturage, nos travaux ont été orientés vers la détermination du moment favorable, de la portion performante du rameau et de l'hormone la plus efficace

à la rhizogenèse.

Il est à remarquer que le moment de prélèvement des rameaux a son importance parce que les expérimentations effectuées au mois de juillet 2002 ont conduit à la formation d'ébauches racinaires et au maintien en vie des boutures pendant 48 jours. Au delà de cette durée, elles commencent à dépérir.

Les travaux de RAJAONARIVONY au mois d'août et novembre 1997 et ceux de RABEMANANJARA au mois de janvier 2002 ont abouti à la reprise de la bouture; alors que RAMAROSON (2006) a obtenu la régénération de la plante entière. Ces résultats nous permettent de tirer que pour le bouturage de *Prunus africana*, il est possible d'obtenir des résultats entre la fin du mois de juillet, début de la reprise de végétation, et le mois de janvier.

La portion du rameau répondant en partie au bouturage a été déterminée être la partie médiane, ce qui est en accord avec les résultats de RAJAONARIVONY (1998) et ceux de RABEMANANJARA (2003).

Nous avons obtenu l'amélioration de la formation des ébauches racinaires par le trempage de la bouture dans la solution d'AIB à 40 mg/l pendant 24 h ; sans toute fois régénérer la plante entière.

Par le même procédé, RABEMANANJARA (2003) a obtenu la reprise de la bouture ainsi que l'apparition de jeunes feuilles. Mais les boutures meurent 52 à 72 jours après la mise en terre.

RAJAONARIVONY (1998) a aussi mentionné que cette hormone en solution de 1% a activé la reprise de la bouture.

RAMAROSON (2006), par utilisation de poudre d'AIB à 1% a obtenu l'enracinement de la bouture.

Etant donné la différence pour les unités utilisées pour les concentrations en hormone et que les autres expérimentateurs n'ont pas mentionné la durée de trempage dans leur publication, il ne nous est pas possible de les comparer.

Toutefois, ces différents résultats permettent de penser que l'AIB a son efficacité sur le bouturage de *Prunus africana*, mais cela nécessite une dose élevée ou une durée de trempage plus longue qui sont à déterminer.

Dans nos expérimentations, l'utilisation du mélange AIB 35 mg/l + ANA 35 mg/l a fait diminuer le taux de bouture présentant une ébauche racinaire, alors que les travaux de BURLE (1962) sur le cacaoyer ont abouti au phénomène contraire. En effet, ce mélange a conduit au développement racinaire du cacaoyer, alors que l'AIB seul à 40 mg/l a fait diminuer le taux de réussite de cette espèce à la rhizogenèse.

Dans le but d'accélérer la multiplication de *Prunus africana*, un essai de bouturage *in vitro* de la partie apicale du rameau a été effectué. Nos travaux ont été focalisés sur la mise au point de la désinfection, le choix de l'explant et la mise au point du milieu de culture.

Il est reconnu que la désinfection des explants provenant du milieu naturel est difficile. Mais nous n'étions pas en possession de graines, ainsi nos explants ont été prélevés des plants transplantés dans le jardin d'expérimentation du CNARP.

Nous avons procédé à la désinfection des fragments d'organes utilisés dans le bouturage *in vitro*. Les feuilles nécessitent une solution de désinfectant moins concentrée que la tige ; par contre, la contamination apparaît plus vite chez les feuilles que chez les tiges. Les feuilles peuvent être plus exposées aux contaminations du milieu. La désinfection est obtenue par utilisation de CaOCl_2 à 6% pour une durée de trempage de 10 mn pour la feuille et 15 mn pour le nœud, suivi d'un trempage dans la solution de pénicilline à 1 mg/l pendant 1 h. L'utilisation d'une concentration plus élevée de CaOCl_2 et l'augmentation de la durée de trempage de l'explant dans le désinfectant ont conduit au brunissement du matériel.

RANDRIANAINA (2003), a utilisé des explants prélevés des plants transplantés à Andramasina. Il a obtenu la désinfection en utilisant du chlorox 15% pour une durée de trempage de 7 mn, mais la composition de ce produit n'a pas été mentionnée dans sa publication. Il est ainsi relativement facile de désinfecter l'explant de *Prunus africana* parce que pour les travaux de BOXUS (1995) sur d'autres plantes, la concentration du CaOCl_2 utilisé a été de 9%.

L'aptitude de l'explant à la callogenèse varie suivant son âge, cela indique l'existence d'une variation de totipotence cellulaire (aptitude à exprimer la totalité des potentialités du génome de l'espèce) suivant l'âge de l'explant (STEWERD, 1958). Seuls les jeunes explants

de *Prunus africana* sont performants. Les très jeunes explants brunissent facilement, tandis que les plus âgés sont vite contaminés. Cela vérifie l'hypothèse qui avance que les explants les plus jeunes sont plus sains mais leurs cellules ne sont pas encore totipotentes ; tandis que les plus âgés sont déjà plus contaminés par les microorganismes parasites dans leur milieu naturel (BOULAY, 1984).

Comme précédemment, c'est la partie médiane, sans bourgeon terminal, qui a répondu au bouturage *in vitro* différemment suivant le milieu de culture.

Le milieu de base (MS, sans hormone) et le milieu avec ANA + BAP ont conduit à la callogenèse, alors que celui qui renferme de 2,4-D + BAP a donné le débourrement.

Ces résultats suggèrent que pour *Prunus africana*, l'auxine favorable pour la callogenèse est l'ANA, tandis que celui du débourrement des bourgeons axillaires est le 2,4-D.

La nature de l'auxine a donc son influence sur le débourrement des bourgeons axillaires même à un rapport auxine/cytokinine faible. Toutefois, la concentration de cytokinine ne doit pas descendre en dessous de 1 mg/l.

Les mêmes résultats ont été obtenus par RANDRIANIAINA par utilisation de $\frac{MS}{2} + ANA + BA$ (RANDRIANIAINA, 2003).

Pour les milieux de base additionnés d'hormones, la callogenèse n'apparaît pour les deux types d'explant que si la proportion auxine/cytokinine est adéquate. Cependant, la concentration en hormones a aussi son importance.

La présence de gibbérelline (GA₃) améliore le taux de réussite du débourrement du bourgeon axillaire et stimule la croissance en longueur de l'axe de *Prunus africana*.

Ces résultats montrent qu'il est possible d'accélérer la multiplication de *Prunus africana* par la culture *in vitro*, car le bouturage des rameaux ont conduit aussi bien à la callogenèse qu'au débourrement dans un milieu de culture avec ou sans hormone.

Les hormones additionnées dans le milieu de culture ont remplacé les endohormones de l'explant prélevé en période de repos végétatif. De plus, le rôle de la gibbérelline sur la levée de dormance des bourgeons axillaires a été vérifié. Cela montre l'un des avantages de la *vitropropagation*, elle est applicable toute l'année.

CONCLUSION GENERALE
ET
PERSPECTIVES

Dans le but de la conservation de l'espèce, trois méthodes ont été appliquées dans nos expérimentations pour la multiplication de *Prunus africana* : transplantation, bouturage et établissement de la culture aseptique initiale de la *vitropropagation*.

D'abord, des plantules de 15 cm à 1 m ont été récoltées dans la forêt de Maromizaha dans la région de Moramanga. Elles sont principalement issues de la germination des graines dans leur milieu naturel (les drageons n'existent pas).

La transplantation de ces plantules a montré que les jeunes plants s'adaptent bien à cette manipulation ; même jusqu'à maintenant (année 2010), elles croissent et vivent encore très bien dans le jardin d'expérimentation du CNARP Androhibe Antananarivo.

Il semble que le bouturage est efficace par l'utilisation de la partie médiane du rameau. Mais cette efficacité n'est qu'à moitié car les ébauches de racine qui se forment ne permettent pas la survie de la bouture et la régénération de la plante entière.

Une étude plus approfondie est donc nécessaire.

L'établissement de la culture aseptique initiale a abouti à la formation des cals à partir de la culture de feuille et de nœud, en présence de l'auxine ANA.

Les nœuds en présence de 2,4-D ont donné de débourrement des bourgeons axillaires.

Ces résultats permettent d'espérer, par la *vitropropagation*, l'aboutissement à la régénération de la plante entière soit par différenciation des cals, soit par enracinement des microboutures.

La culture aseptique a été obtenue par la désinfection des explants par utilisation de CaOCl_2 à 6%, avec un trempage de 10 mn pour les feuilles et de 15 mn pour la tige, puis avec un traitement à la pénicilline 1 mg/l pendant 1 h.

Notons que ces explants proviennent des plants transplantés dans le jardin d'expérimentation du CNARP d'Androhibe Antananarivo.

Ces études doivent être complétées par la différenciation des cals, la multiplication des microplants, l'enracinement et l'acclimatation. Elles peuvent être aussi approfondies et

élargies en se penchant à l'étude phénologique de *Prunus africana*, en vue de l'obtention des graines et ainsi d'étudier sa physiologie.

Pour terminer, il est recommandé de ne pas abattre les arbres avant la fructification pour permettre la régénération naturelle des sites de *Prunus africana*.

Une formation des récolteurs sur l'écorçage partiel doit être prise en considération pour éviter la mort des plants après la récolte.

BIBLIOGRAPHIE

- 1.- ANDRIAMANALINTSOA, J.J., 2000. *Prunus africana*. Rapport d'activité. PRONATEX, Antananarivo. 6p.
- 2.- ANDRIANTSIFERANA, R., 1999. Les problèmes de la filière *Prunus africana* à Madagascar, méthodes d'interventions et outils de gestion. Toamasina.
- 3.- ASSAH, E., AVANA, M.L., BELL, J. M., DUGUMA, B., LEAKEY, R. R. B., SIMONS, A. J., TCHOUNDJEU, Z., 2002. Vegetative propagation of *Prunus africana* : effects of rooting medium, auxin concentrations and leaf area. *Agroforestry systems* 54 (3). pp. 183 – 192.
- 4.- AUGE, R., BEAUCHESNE, G. et BOCCON-GIBOD, J., 1986. La culture *in vitro* et ses applications horticoles. Tec. Doc. Lavoisier, Paris.152 p.
- 5.- BOULAY, M., 1984. Aspects pratiques de la multiplication *in vitro* des essences forestières. *Ann. Rech. Sylv.*, 4, AFOCEL. pp. 9-44.
- 6.- BOXUS, P., 1971. La culture de méristèmes de *Prunus*. Note préliminaire relative à l'espèce *Prunus pandora*. *Bull. Rech. Agron, Annales de Gembloux*, 6(1-2). pp. 3-5.
- 7.- BOXUS, P. et QUOIRIN, 1974. La culture de méristèmes apicaux de quelques espèces de *Prunus*. *Bull Soc.Roy. Bot., Belg.*, 107 (1). pp. 91-101.
- 8.- BOXUS, P., 1989. La multiplication *in vitro*, une biotechnologie intéressante pour le développement. Ses perspectives industrielles. *Annales de Gembloux*, 95. pp. 163-181.
- 9.- BOXUS, P., 1995. Biotechnologies végétales. Multiplication végétative: micropropagation. *Annales de Gembloux*, 95. pp. 5-58.
- 10.- BRETAUDEAU, J. et FAURÉ, Y., 1991. Atlas d'arboriculture fruitière. Pêcher – Prunier Cerisier – Abricotier – Amandier. Tec. Doc. Lavoisier, Paris.224 p., Vol. III.
- 11.- BRUMMITT, R. K., 1992. Vascular plant families and genera. Royal Botanic Gardens, Kew. 804 p.
- 12.- BRUNETON, J., 1993. Pharmacognosie phytochimie des plantes médicinales. Tec. Doc. Lavoisier, Paris, 2^e édition.152 p.
- 13.- BURLE, L., 1962. La multiplication végétative du cacaoyer. *Le cacaoyer*, Tome II. G. P. Maisonneuve et Larose, Paris. pp.363-399.

- 14.- CARDOT, J., 1908. Rosacées. CARDOT, J., CHERMEZON, H., EVRARD, F., GAGNEPAIN, F., GUILLAUMIN, A., LECOMTE, H., et VIGUIER, R., 1908-1920. *Flore générale de l'Indochine*, Tome II. Masson et Cie, Paris. pp. 613-621.
- 15.- CHAMPAGNAT, M., 1963. Néof ormation spontanée de bourgeon à partir de la tige. CHAUSSAT, R. et BIGOT, C., 1980. *La multiplication végétative des plantes supérieures*, Gauthier-Villars, Paris. pp. 81-140.
- 16.- CHAMPAGNAT, P., OZENDA, P. et BAILLAUD, L., 1969. Biologie végétale, Tome III : Croissance, morphogenèse, reproduction. Masson et Cie, Paris. 510 p.
- 17.- CHAUSSAT, R. et BIGOT, C., 1980. La multiplication végétative des plantes supérieures. Gauthier- Villars, Paris. 277 p.
- 18.- CLAVERT, A., GRANZ et RIFFAUD, J. P., 1986. Effet d'un extrait d'écorce de *Pygeum africanum* (V.1326) sur les sécrétions prostatiques du rat et de l'homme. *Ann Uro 5*. pp. 341-343, Vol XX.
- 19.- DAWSON, I. and RABEVOHITRA, R., 1996. Survey report : status of *Prunus africana* resources in Madagascar. Rapport, FOFIFA, Antananarivo. 3p.
- 20.- DEBERGH, P. 1983. Effect of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiol. Plant*, 59. pp. 270-276.
- 21.- DESCHEEMAER, A., 1986. Ravi-maitso. Ambositra. 228 p.
- 22.- DOMINIQUE, B. et BRON, G., 1989. Multiplication des plantes horticoles. Le bouturage. Tec. Doc. Lavoisier, Paris. 229 p.
- 23.- DIRECTION DES EAUX ET FORETS, dernière version du 3 au 15 novembre 2002. Liste des espèces malagasy inscrites aux annexes de la CITES.
- 24.- DUFOUR, B., CHOQUENET, C. et REVOL, M., 1984. Etude contrôlée des effets de l'extrait de *Pygeum africanum* sur les symptômes fonctionnels de l'adénome prostatique, *Ann. Urol.*, 3. pp. 193-195, Vol XVIII.
- 25.- DUHEM, K., 1988. Difficulties in the establishment of axenic in vitro cultures of field collected coffee and cocoa germplasm. *Acta Hort*, 225. pp. 67-75.
- 26.- EAUX ET FORETS, 2003. Manuel de vulgarisation de *Prunus africana*. *Communiqué National Prunus africana (CNP)*. p. 12.

- 27- EVANS, 1951. Investigations on the propagation of Cacao. *Tropical agriculture*, 8. pp.7-12.
- 28.- FABIENNE, M. (CNEARC) et FRANÇOISE, B. (CIRAD-FORET), Décembre 1995. L'enquête qualitative par entretiens semi-directifs, fiche technique, 17. *Guide d'aide à la décision en agroforesterie*, Tome II. pp. 7-157.
- 29.- FANJANARIVO, S. 2000. La production du *Kotofihy* menacée. *Dans les Média Demain (DMD), Hebdomadaire économique indépendant*, 661. p.10.
- 30- FAVRE, J. M., 1980. Rhizogenèse et bouturage. In CHAUSSAT, R. et BIGOT, C., 1980. *La multiplication végétative des plantes supérieures*. Gauthier-Willars, Paris. pp. 51-75.
- 31.- GOULD, A. R., 1986. Factors controlling generation of variability in vitro. *Vasil, I. K., Cell culture and somatic cell genetics of plants : plant regeneration and genetics variability*. Academic Press Inc. pp.549-567.
- 32.- GRAHAM, R. A., M. A., et F. L. S., 1960. Flora of tropical East Africa. 4 millbank, London, S.W. 61 p.
- 33.- HELLER, R., 1978. Développement. *Physiologie végétale*, Tome I. Masson et Cie, Paris. pp. 161-163.
- 34.- HELLER, R., 1981. Nutrition. *Physiologie végétale*, Tome II. Masson et Cie, Paris. pp. 67-109.
- 35.- J. Cl. H., 1977. Protection des plants au cours de la transplantation, *Fas., 94*, AFOCEL ARMEF, Paris. pp. 159-166, Vol. IV.
- 36.- KALKMAN, C., 1965. The old world species of *Prunus sugneus*. *Laurocerasus including those formerly referred to Pygeum*. Blumea. 174 p., Vol. XIII.
- 37.- KNUDSON, L., 1948. Clorox and calcium hypochlorite as disinfectants for orchid seed. *Amer Orchid. Soc. Bull.*, 17 (6). pp. 348-353.
- 38.- KOECHLIN, J. JEAN, GUILLAUMET, L. et PHILIPPE, M., 1974. Les bioclimats régionaux. *Flore et végétation de Madagascar*. FI- 9490 Vaduz, Paris. pp. 29-51.
- 39.- MARGARA, J., 1989. Base de la multiplication végétative : les méristèmes et l'organogenèse. I.N.R.A., Versailles. 262 p.

- 40.- MISSION, J. P. et BOXUS, P., 1983. Rôle du charbon de bois dans le milieu de culture de tissus végétaux. *Meded. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent.*, 48 (4). pp.1151-1157.
- 41.- MURASHIGE, T. et SKOOG, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15. pp. 473-497.
- 42.- PADMANABHAN, V., PADDOCK, E. et SHARP, W., 1974. Hormonal control of organogenesis in *Lycopersicon esculentum* Mill. Leaf callus. *3rd int. Congr. Plant tissue cell culture Leicester*. Abstr. 66. Press academic.
- 43.- PAWAN, K., JAIWAL et ANJU, G., 1991. *In vitro* high frequency plant regeneration of a tree legume *Tamarindus indica* L. *Reports communicated by PHILIPPE, G. C.* Press academic.
- 44 : - RABEMANANJARA Z., H., 2003. Etudes biologiques et socio-économiques en vue de la gestion durable du *Prunus africana* à Madagascar. Mém de DEA, Département des Eaux et Forêts. ESSA, Antananarivo. 56p.
- 45.- RACHMELER, D., Novembre 1997 (USAID). Les produits biologiques : le marché américain. *Bull. Rech. Agron.*, Gembloux, 97 : pp.57-58.
- 46.- RAHELINIRINA, L., 1997. Approche technologique pour résoudre les problèmes posés par l'exploitation de *Pygeum africanum*. Hook. f. à Madagascar. Mém en vue de l'obtention du diplôme inter-universitaire (DIU)], spécialité Biotechnologies Végétales, Institut National Polytechnique de Toulouse. 34 p.
- 47.- RAJAONARIVONY, B. A., 1998. Valorisation et contribution à la relance de la culture de *Prunus africana*. *Hook ou Pygeum africanum*. Mém de fin d'études, Département Agriculture, ESSA, Antananarivo. 81 p.
- 48 :- RAMAROSON N., 2006. Essai de propagation végétative de quelques espèces ligneuses productrices d'huiles essentielles et de molécules à usage médicale. Mem de fin d'études pour l'obtention du diplôme d'Ingénieur Agronome, option Eaux et forêts. 44 p.
- 49.- RANDRIAMBOLOLONA, D. J., 1994. Analyse de l'exploitation de *Pygeum africanum*. Mém de Fin d'Études en vue de l'obtention du CAPEN, École Normale Supérieure, Antananarivo. 77p.

- 50.- RANDRIANIAINA, 2003. La biotechnologie de la culture *in vitro* : un outil pour la domestication de *Prunus africana* (Hook. f) Kalkman. Approche à la mise au point des techniques. Mém de DEA des Sciences Biologiques Appliquées, Option Physiologie végétale, Faculté des Sciences, Univ d'Antananarivo. 68 p.
- 51.- RAOEL, 08 avril 2003. Zavamaniry fanao fanafody fanondrana. 60% n'ny vola miditra dia avy amin'ny kotofihy. *Madagascar Tribune*, Quotidien d'information. Antananarivo. p. 9.
- 52.- RAVELOMANANTSOA, P., 1996. L'exploitation économique-industrielle du *Pygeum africanum* (kotofihy). *Les Cahiers du CITE*, 4. Antananarivo. pp. 63-66.
- 53.- ROOK, D. A., 1970. Puddling mixtures, theirs evaluations and effects of plants. *For. Res, Notes*, 46. N. Zealand.
- 54.- SKOOG, G. F et MILLER, C., 1957. Chemical regulator of growth and organ formation. *In plant tissues cultured in vitro. n Symp. Soc. Exp. Biol.*, 11. pp. 118-131.
- 55.- STEWARD, F. et MEARS , K., 1958. Growth and organised development of cultured cells. II organization in culture grown from freety suspended cells. *Am. J. Bot.*, 45. p. 705-708.
- 56.- STOI-AGRI. Fiche technique (non numéroté).
- 57.- SVEN, W. et RAKOTONIRINA, J. C. R., 1995. L'exploitation de *Prunus africana* à Madagascar. Rapport élaboré par le PCDI Zahamena et la DEF Antananarivo/Fénériver-Est.
58. - ZEBROWSKI, C., 1967. Moramanga : Notice explicative de la carte pédologique au 1/50000, ORSTOM, fascicule. pp. 1-75.
- 59.- ZRÝD, J.P., 1988. Culture de cellules, tissus et organes végétaux. Fondements théoriques et utilisation pratique. Presse polytechnique, Normande, Suisse. 308p.

ANNEXES

Annexe 1

Nom vernaculaire de *Prunus africana* suivant la région où il se trouve

Nom vernaculaire	Région
Hafatra	Tsaratanàna
Kotofihy	Anjozorobe, Ambatondrazaka, Moramanga
Menalaingo	Vatomandry
Paisoala	Betsileo
Sary, Saripaiso	Bealanana, Mandritsara, Befandriana nord
Sofintsohihy	Brickaville, Amparafaravola, Vohimena
Tsintsefintsohihy	Ambatondrazaka
Tsipesopeso	Betsileo

(Source: Eaux et forêts, 2003)

Annexe 2

Fiches d'enquêtes suivant la méthode semi-directive dans la région de Moramanga

Fiche N°1 : Résultats d'enquêtes sur la connaissance de *Prunus africana* au niveau de la population riveraine

Personnes enquêtées	Thèmes		
	Nom de la plante	Utilisation de la plante	Mode d'utilisation de la plante
Commerçant	Kotofihy	Traitement de la maladie de prostate appelée <i>hejana</i>	Tisane
Cultivateur	Kotofihy	Traitement de la fièvre	Tisane
Cultivateur	Kotofihy	Utilisé par les <i>vazaha</i>	Je n'en sais rien
Hôtelier (ancien exploitant)	Kotofihy	Les écorces sont exportées pour fabriquer des médicaments	Ce sont les chercheurs qui le savent bien
Forestier	Kotofihy	Les écorces sont exportées pour fabriquer des médicaments	Comme tout médicament à la pharmacie
Elève du lycée	Kotofihy	fabrication des médicaments à l'extérieur	Seul le médecin qui le sait
Conducteur de tracteur	Kotofihy	Les écorces sont exportées pour fabriquer des médicaments	Traitement des problèmes prostatiques
Directeur de la SODIP	Pygéum africanum (Kotofihy)	Fabrication du médicament appelé <i>tadenan</i>	On utilise le produit fini suivant la prescription médicale

Fiche N°2 : Résultats d'enquêtes sur la récolte de *Prunus africana*

Thèmes	Récolteurs enquêtés	
	Deux cultivateurs	Deux forestiers
Motivation : pourquoi vous prenez part à la récolte de cette plante ?	Les écorces sont à vendre Je veux gagner de l'argent	Question d'argent - Question de salaire
Lieu de récolte	M-m-m Dans la forêt	-Très loins - Accès difficile
Mode de récolte	On abat le tronc puis on l'écorce et le bois est abandonné dans la forêt	On abat le tronc puis on l'écorce, mais le tronc est inutile
Fréquence de récolte	Très fréquent Suivant l'arrivé des récolteurs, mais autrefois, la SODIP l'a aussi récolté	Fréquent Récolte journalière pendant le passage des conducteurs de camion
Quantité obtenue	Beaucoup Cinq <i>soubiques</i> par pied	Cinq sacs par pied Huit <i>soubiques</i> par pied

Fiche N°3 : Résultats d'enquêtes sur la régénération de *Prunus africana*

Thèmes	Personnes enquêtées			
	Deux forestiers	Deux cultivateurs	SODIP	PRONATEX-LDI-PDM
Mode de régénération	Les jeunes pousses ne peuvent apparaître qu'après l'abattage du pied mère car celui – ci émet de substances toxiques aux plantules	La régénération dans la forêt est naturelle, peut - être les graines tombées au sol qui germent	Pépiniérisation des jeunes pousses	Transplantation <i>in situ</i> des plantules (sauvageons) en passant par la pépiniérisation
Résultats	Les plantules poussent autour du plant abattu	Elles sont beaucoup et rependues dans la forêt	Echoué	5% de réussite

Annexe 3 : Composition du milieu MS

Composition	Concentration en mg/l
Nitrate d'ammonium	1650
Acide borique	0006,2
Chlorure de calcium	0332,2
Chlorure de cobalt+ 6H ₂ O	0000,025
Sulfate cuprique+5H ₂ O	0000,025
Acide Ethylène diamine Tétra Acétique+ 2H ₂ O	0037,26
Sulfate ferreux+ 7 H ₂ O	0027,8
Sulfate de magnésium	0180,7
Sulfate de manganèse + H ₂ O	0016,9
Acide molybdique + 2H ₂ O	0000,25
Iodure de potassium	0000,83
Nitrate de potassium	1900,0
Phosphate de potassium	0170,0
Sulfate de zinc + 7H ₂ O	0008,6
Glycine	0002,0
Myo-inositol	0100,0
Thiamine-HCl	0000,4

La masse de poudre de MS nécessaire pour préparer 1l de solution est de 4,4g

(Source : SIGMA, 1990)

Annexe 4 : Composition et caractéristiques du «taroka »

QU'EST CE QUE TAROKA ?

TAROKA est un levain bactérien puissant fixé sur un support organique végétal riche. Scientifiquement élaboré à partir de souches microbiennes utiles et sélectionnées,

TAROKA subit en cours de fabrication des contrôles réguliers chimiques et biologiques. en fin de fabrication, les substances humifiées se présentent sous la forme d'un produit de couleur brun foncé, qui renferme une population microbienne très active et équilibrée. cette population microbienne riche des substances utiles qu'elle a élaboré, sera capable d'effectuer dans le sol, après incorporation, un travail similaire au profit du végétal.

TAROKA est la solution efficace pour le maintien et la conservation du sol en bon état humique et bactérien.

CARACTERISTIQUES GENERALES

- Physique : PULVERULENT de couleur brun foncé
- Composants : matières organiques humifiables à cent pour cent végétales: plus de 80 % (matières organiques végétales, déchets agricoles).
- PH : 6,8 à 8.
- Taux d'humidité : environ 50%

DEUX TYPES DE TAROKA

- * Le TAROKA simple pour les cultures à production de feuille : tabac, géranium, ...
- * Le TAROKA phosphaté pour les cultures à production de grains : letchis, cocoteraies, ...

CE.MG.C 99.0079.A



ATTESTATION

Par la présente, nous attestons que la société

STOI-AGRI
Village des Jeux
BP 8582 Ankorondrano
101 Antananarivo

est contrôlé par ECOCERT pour la production de fertilisant biologique TAROKA.

Fait à Antananarivo, le 28 mai 1998

LE RESPONSABLE DE L'ANTENNE
ECOCERT OCEAN INDIEN

S. RANDRIANANTO

Tout copie certifiée conforme
à l'original qui nous a été
présenté ce jour le 28 mai 1998
Antananarivo, le 28 mai 1998
LE BELGUE DU MAIRE
Pour le IV^e Arrondissement
par délégation

contrôle de fabrication
ECOCERT S.A. 10000 BRUXELLES BELGIQUE
L'INDRIANANTO ANDRISON DAYE

CONSEQUENCES DE L'UTILISATION DE TAROKA

Physique :

- Augmentation du pouvoir de rétention en eau ;
- Amélioration de la structure des sols ;
- Diminution de l'érosion et du lessivage des sols ;
- Formation d'humus stable.

Chimique :

- Meilleure assimilation des apports minéraux ;
- Elaboration de substances de croissance (vitamines, auxines, etc...)
- Favorise la libération lente et constante de l'azote
- Relève la présence en quantité non négligeable des principaux éléments minéraux :

- * Azote organique 1,78%
- * Phosphore assimilable 0,38%
- * Potasse 4,8 me/100

LES PRINCIPAUX OLIGO-ELEMENTS BIODYNAMIQUES :

- Fer 5688,7 ppm
- Bore
- Manganèse
- Molybdène
- Magnésie 3,25%
- Cobalt
- Cuivre
- Calcium 2,47%

Biologique :

- Régénération de la vie microbienne des sols ;
- Conservation du sol ;
- Nombre de micro-organismes vivants dans le ferment 2,7 milliards par gramme ;
- Germes aérobies
- Cellulolytiques anaérobies
- Cellulolytiques aérobies
- Protéolytiques
- Fixateurs d'azote
- Germes nitreux
- Germes nitriques

Annexe 5

REPRESENTATION DE QUELQUES PROTOCOLES EXPERIMENTAUX
PAR DES FIGURES

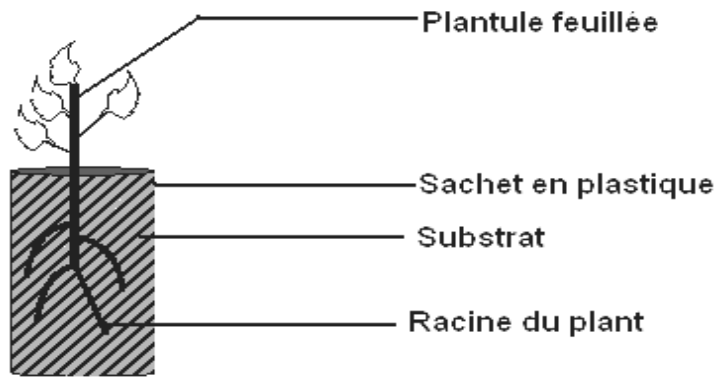


Figure 1 : Empotage d'une plantule

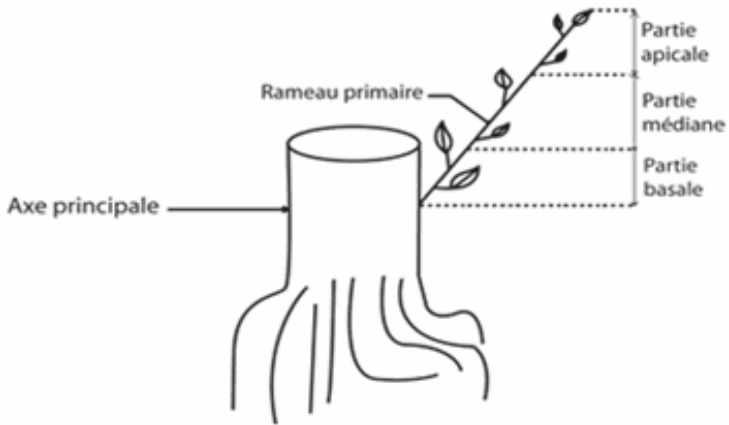


Figure 2a: Trois parties du rameau primaire

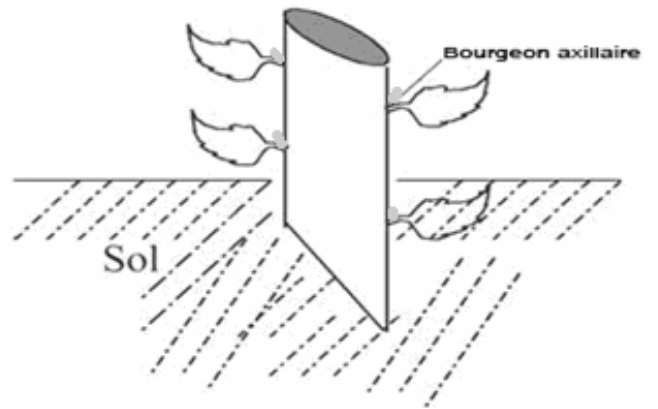


Figure 2b: Bouture simple

Annexe 5 (suite)

**REPRESENTATION DE QUELQUES PROTOCOLES EXPERIMENTAUX
PAR DES FIGURES**

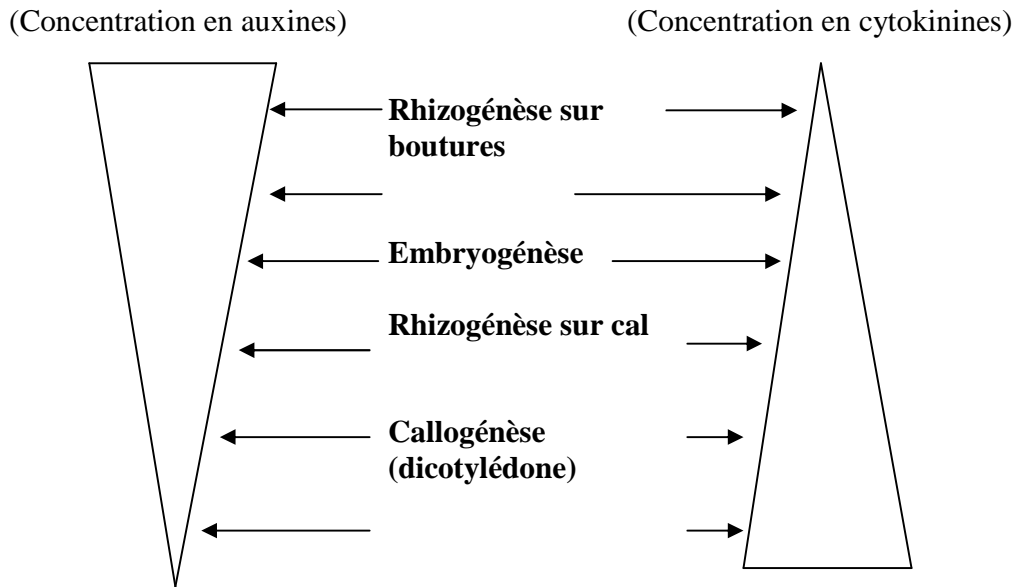


Figure 3 : Types d'organogénèses contrôlés par les concentrations relatives d'auxine et de Cytokinine

(Source : Zrýd, J., P., 1988)

Annexe 6

Cartes de distribution géographique de *Prunus africana*

Dans le monde :



A Madagascar :



(Source : Eaux et Forêts, 2003)

Nom : RASOANANDRASANA
Prénom : Razanabahoaka
Titre du mémoire: TECHNIQUES POUR LA CULTURE ASEPTIQUE INITIALE DE *Prunus africana* Hook.f (Kalkman, 1965)

RESUME

L'écorce de *Prunus africana* renferme un principe actif utilisé pour le traitement de l'hypertrophie bénigne de la prostate ; elle constitue une source de revenu pour Madagascar. Mais suite à une surexploitation par écorçage et abattage, cette espèce est menacée de disparition.

La présente recherche a pour objectif de sauvegarder cette espèce et de prévoir son exploitation durable.

Nous avons basé nos travaux sur sa multiplication par transplantation, bouturage et établissement de la culture aseptique initiale ; ce dernier constitue le premier stade de la vitropropagation. Dans la pratique, nous avons eu recours à la transplantation pour assurer l'approvisionnement en explants pour la vitropropagation. Cela nous évite de déplacement fréquent à Moramanga pour nous ravitailler.

De nos expérimentations, il en résulte la formation d'ébauches racinaires pour le bouturage, et dans le cas de la transplantation, le taux de réussite est de 75 à 100 %. Quant à la culture aseptique initiale, nous citons ici toutes les conditions favorables :

- désinfection avec le CaOCl_2 6% pendant 15 mn pour la tige et 10 mn pour la feuille, combinée avec la pénicilline (1mg/l) pendant 1h.

- organes appropriés : feuille et tige (nœud).

- milieux adaptés : présence de phytohormone ANA, pour la callogenèse et de 2,4-D, pour le débourrement de bourgeons axillaires.

La différenciation des cals, la multiplication des microplants, l'enracinement et le sevrage feront l'objet de la suite de ce travail.

MOTS CLEFS : *Prunus africana* - transplantation - bouturage - vitropropagation

Encadreur pédagogique : Docteur Eliane RALAMBOFETRA, Maître de conférences à la Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo.

Encadreur technique : Madame Léontine RAHELINIRINA, Chercheur au CNARP d'Androhibe Antananarivo, Département d'Ethnobotanique et de Botanique.

ABSTRACT

The bark of *Prunus africana* contains an active constituent used for the treatment of the benign hypertrophy of prostate; it represents one source of revenue for Madagascar. But due to over exploitation and unsustainable barking and feeling, it is now an endangered species.

The aim of this research is to conserve this species and to provide sustainable exploitation.

We have based our work on its multiplication by transplantation, cutting, and establishment of initial aseptic culture; this last form the first stage of the vitropropagation. In practice, we used transplantation to ensure the supply of explants for the vitropropagation. It saves us the travelling to Moramanga for the supply.

From our experimentation, we got variable results for the propagation by cutting but the success is from 75 to 100% as far as transplantation is concerned. For the in vitro culture, we noted all of the favorable conditions as follow:

- disinfection with CaOCl_2 6% during 15mn for the stem, and 10mn for the leaf, combined with penicillin (1mg/l) during 1h.

- appropriate organs : leaf and stem.

- suitable medium culture : presence of phytohormone ANA for callus production and 2,4-D for the direct budding

The callus differentiation, the explants multiplication, the rooting and the acclimatization will be the done during the continuation of this work

KEY WORDS: *Prunus africana* - transplantation - cutting - vitropropagation

Advisor: Doctor Eliane RALAMBOFETRA.

Technical advisor: Mrs Léontine RAHELINIRINA.