

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

S.D. Medza Mve^{1*}, G. Mergeat¹, J.-P. Baudoin¹ & A. Toussaint¹

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

Résumé

Dans le but d'améliorer le taux de multiplication *in vitro* (nombre de tiges/explant/subculture) de *Jatropha curcas* L., des noeuds axillaires prélevés sur de jeunes plantes de deux accessions de cette espèce, originaires du Cameroun et du Sénégal, sont cultivés pendant trois semaines sur un milieu MS supplémenté de 8,87 μM de BAP; 4,92 μM d'AIB, ainsi que de 30 g/l de saccharose à pH 5,7 \pm 0,1; et solidifié avec 0,7% d'agar. Les tiges obtenues à partir de chaque explant initial sont ensuite transférées sur des milieux de prolifération (MP) constitués du milieu MS complétement de 2,21 à 8,9 μM de BA ou de 2,21 à 8,9 μM de kinétine en combinaison avec 2,46 μM d'AIB. Chaque combinaison est complétée avec 33,12 μM de sulfate d'adénine; 82,92 μM de glutamine et 30 g/l de saccharose. Les meilleurs taux de multiplication sont obtenus pour le milieu MP contenant 6,65 μM de BA et 2,46 μM d'AIB: 42,72 \pm 3,22 et 38,15 \pm 4,7 tiges/explants, respectivement pour l'accession camerounaise et sénégalaise après 6 semaines de culture. Les taux de multiplication moyen sont respectivement pour ces deux accessions de 8,27 \pm 1,27 et 7,89 \pm 1,13 tiges par explant au cours des 7 subcultures suivantes (3 semaines/subculture). Ce milieu est également celui qui permet globalement la meilleure croissance en hauteur des tiges. Les tiges feuillées obtenues peuvent être enracinées sur un milieu contenant la moitié des éléments minéraux majeurs de MS additionné de 5,7 μM d'AIB; 1,5% de saccharose et solidifié avec 0,7% d'agar; puis acclimatées avec un taux de survie de 97%. Ces résultats permettent d'envisager la création d'unités de multiplication industrielle de plants à la fois homogènes et performants issus de clones élités de *J. curcas*.

Introduction

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

Summary

Improvement of the Rate of *in vitro* Multiplication of *Jatropha curcas* L.

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

semi-arides (1). Il est considéré comme une source potentielle non-comestible de biocarburants (16). Sa multiplication par semis ainsi que la transplantation au champ de plantes sauvages spontanées présentent l'inconvénient de générer des plantes hétérogènes dont la teneur en huile des graines varie de 4 à 40%. Le bouturage de tiges fournit des clones aux performances homogènes mais dont les plantes

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

* Auteur: Email: medzamve@yahoo.fr Téléphone 0032493761609 / 003281622410
Reçu le 29.09.10 et accepté pour publication le 04.10.10.

présentent un système racinaire superficiel qui les rend sensibles à la verse et à la sécheresse, ce qui limite leur possibilité d'établissement sur les sols pauvres. De plus, leur durée de vie est réduite à 10-15 ans (2, 9). La culture *in vitro* est l'une des voies potentielles pour la production rapide et à grande échelle du matériel végétal de plantation. Cette méthode présente l'avantage de pouvoir produire des plantes homogènes, du point de vue morphologique et agronomique notamment en ce qui concerne les rendements (4). Plusieurs auteurs ont travaillé sur la régénération de *J. curcas* à partir des explants nodaux. Les taux de multiplication obtenus sont restés relativement faibles, donc économiquement non rentables. La présente étude se focalise sur l'amélioration du taux de multiplication *in vitro* de *J. curcas* par régénération à partir des explants nodaux. Elle vise à développer un protocole de production massive d'un matériel de plantation homogène et performant utilisable à l'échelle industrielle.

Matériel et méthodes

Matériel végétal et stérilisation

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

Phase de culture

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

Phase de multiplication et allongement

Après trois semaines, les tiges obtenues sont séparées de l'explant initial et transférées sur les milieux de prolifération (MP) constitués du milieu MS complétement de $2,21$ à $8,9 \mu\text{M}$ de BA ou de $2,21$ à $8,9 \mu\text{M}$ de kinétine en combinaison avec $2,46 \mu\text{M}$ d'AIB. Chaque combinaison est complétée avec $33,12 \mu\text{M}$ de sulfate d'adénine; $82,92 \mu\text{M}$ de glutamine et 30 g/l de saccharose. Les nouvelles tiges régénérées sont repiquées sur le même milieu MP frais, toutes les trois semaines, sauf la première culture sur MP qui se déroule durant six semaines.

Phase d'enracinement et d'acclimatation

Pour l'enracinement, les tiges feuillées issues du milieu de prolifération sont placées sur un milieu dépourvu de régulateur de croissance pendant deux semaines. Elles sont ensuite transférées sur le milieu MS contenant la moitié des éléments majeurs (MS/2), complétement de $5,7 \mu\text{M}$ d'AIB, 15 g/l de saccharose et solidifié avec 0,7% d'agar. Les plantules sont d'abord placées pendant quatre jours dans l'obscurité totale, puis soumises à une photopériode de 16 h durant 4 semaines.

Les tiges enracinées sont lavées à l'eau distillée, pour éliminer les résidus de milieu. Elles sont repiquées dans des pots contenant du terreau commercial et placées dans des cellules conditionnées avec 50-60% d'humidité relative, 16 h de photopériode, $80 \mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ d'intensité lumineuse et 27 ± 2 °C de température. Les pots sont recouverts d'un film plastique transparent pendant deux semaines. Les plantules sont ensuite laissées à l'air libre dans les cellules durant deux semaines supplémentaires avant d'être transférées en serre.

Stérilisation des milieux de culture et conditions de culture

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

Analyse statistique

Les essais sont menés en blocs aléatoires complets. Les données sont ensuite soumises à une analyse de la variance de façon à détecter les différences significatives entre les moyennes (logiciel Minitab 15 Statistical) et soumises au Test de Newmann et Keuls.

Résultats

Les deux accessions de *J. curcas*, présentent 100% de débourement des explants nodaux mis en culture sur MC au bout d'une semaine. Durant cette période, les nœuds prélevés sur des parties bien lignifiées des



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

(1a) Isolement et mise en culture de 3 semaines d'un bourgeon axillaire en croissance sur milieu MS avec 8,87 µM BA et 4,92 µM AIB [MC]; (1b) développement des bourgeons axillaires sur un explant âgé de 3 semaines cultivé sur le milieu de multiplication MP3;

(1c) tige feuillée âgée de 3 semaines prête à l'enracinement sur milieu de multiplication MP6;

(1d) tige enracinée sur MS/2 contenant 1,5 g/l de saccharose, 5,7 µM d'AIB;

(1e) plantules enracinées acclimatées après 6 semaines.

plantes-mères, exsudent abondamment des phénols au niveau de leur surface de coupe. L'oxydation des phénols entraîne le noircissement du milieu de culture et le brunissement des explants.

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

Le nombre de tiges produites par explant sur MP varie fortement en fonction de la balance hormonale (Tableau 1). Les combinaisons BA-AIB sont les plus performantes sur l'induction du bourgeonnement axillaire et la multiplication des tiges. Le milieu MP3 (6,65 µM de BA et 2,46 µM d'AIB) est optimal pour *J. curcas*. Il permet la régénération de $42,7 \pm 3,2$ et $38,2 \pm 4,7$ tiges/explants, respectivement pour l'accèsion camerounaise et sénégalaise après 6 semaines.

Quant à l'association kinétine-AIB, le maximum de tiges formées par explant durant cette même période est seulement de $8,4 \pm 0,9$ (accèsion camerounaise) et $7,7 \pm 1,1$ (accèsion sénégalaise), sur MP7 (6,65 µM de kinétine et 2,46 µM d'AIB).

Le taux de multiplication, qui représente le nombre de tiges par explant et par subculture après trois semaines, est significativement différent entre les

combinaisons de régulateurs de croissance (P-valeur= 0,000). Le tableau 2 reprend l'ensemble des résultats obtenus sur les trois meilleurs milieux après 7 subcultures. Les taux de multiplication moyens les plus élevés sont obtenus sur le milieu MP3 contenant 6,65 µM de BA. Ces taux sont respectivement de $8,27 \pm 0,36$ tiges/explant/subculture pour l'accèsion camerounaise et $7,92 \pm 0,39$ tiges/explant/subculture pour l'accèsion sénégalaise. Ce taux n'est que de $2,71 \pm 0,18$ tiges/explant/subculture (accèsion camerounaise) et $2,73 \pm 0,21$ tiges/explant/subculture (accèsion sénégalaise) sur le milieu MP7 qui contient la même concentration de kinétine.

L'interaction est hautement significative (P-valeur= 0,000) entre les milieux de prolifération et les accèsions de *Jatropha curcas* mises en culture pour la longueur des tiges. Les milieux contenant la BA permettent le meilleur allongement des tiges. L'accèsion sénégalaise croît plus vigoureusement, avec une taille moyenne de $1,56 \pm 0,11$ cm contre $1,11 \pm 0,09$ cm par subculture pour l'accèsion camerounaise, sur MS supplémenté avec 8,9 µM de BA. Avec la même concentration de kinétine on obtient des tiges longues de $1,22 \pm 0,08$ cm pour l'accèsion sénégalaise et $1,16 \pm 0,07$ cm pour la camerounaise. On observe également pour tous les milieux comparés la formation d'un cal de couleur verdâtre à la base

Tableau 1

Nombre de tiges obtenues à partir d'un nœud non lignifié de *J. curcas*, après six semaines de culture sur le milieu de prolifération (MP) en fonction des différentes combinaisons de cytokines avec 2,46 µM d'AIB sur MS complété avec 33,12 µM de sulfate d'adénine; 82,92 µM de glutamine et 30 g/l de saccharose

	BA (µM)	AIB (µM)	KIN (µM)	Nombre de tiges/explant et par accèsion		Longueur de tige par accèsion (en cm)	
				camerounaise	sénégalaise	camerounaise	sénégalaise
MP1	2,21	2,46		2,05 ± 0,26a	1,89 ± 0,28a	0,91 ± 0,10a	1,50 ± 0,15e
MP2	4,43	2,46		4,56 ± 0,68a	3,94 ± 0,46a	1,28 ± 0,12c	1,26 ± 0,12code
MP3	6,65	2,46		42,72 ± 3,22c	38,15 ± 4,7d	1,33 ± 0,12ce	1,26 ± 0,12cd
MP4	8,90	2,46		18,51 ± 2,45b	15,95 ± 1,25b	1,11 ± 0,09b	1,56 ± 0,11e
MP5	2,46	2,46	2,21	1,69 ± 0,44a	1,28 ± 0,26a	0,53 ± 0,02a	0,57 ± 0,03a
MP6	2,46	2,46	4,43	5,84 ± 0,52a	5,33 ± 0,46a	0,66 ± 0,06 a	0,74 ± 0,06a
MP7	2,46	2,46	6,65	7,74 ± 1,08 a	8,35 ± 0,89 a	0,56 ± 0,05 a	1,27 ± 0,07cde
MP8	2,46	2,46	8,90	4,00 ± 0,65a	3,36 ± 0,54a	1,22 ± 0,08c	1,16 ± 0,07bd

Données représentées par la moyenne ± SE sur trois répétitions avec 15 explants par répétition. Les moyennes des colonnes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes, Test de Duncan ($\alpha=0,05$).

Tableau 2
Évolution du taux de multiplication sur les trois meilleurs milieux de prolifération, des accessions de *J. curcas* d'origine camerounaise et sénégalaise, au cours des 7 premières subcultures réalisées toutes les trois semaines

Milieu	Accession	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	Moy
MP3	Accession camerounaise	7,7	8,2	8,9	9	8,1	8,6	8,3	8
	Accession sénégalaise	7,6	7,6	8,6	8,1	8,1	7,9	7,4	7,7
MP4	Accession camerounaise	4,3	4	4	5	6,2	5,2	4,9	5,1
	Accession sénégalaise	3,9	4,1	4,8	4,4	4,6	4,3	4,9	5
MP7	Accession camerounaise	2,4	2,7	3	2,7	3	2,7	2,6	2,7

Données représentées par la moyenne du taux de multiplication (nombre tige/explant/subculture/3semaines) sur trois répétitions avec 15 explants par répétition.

S: Subculture

Moy: taux de multiplication moyen des sept premières subcultures.

des tiges feuillées. Cette production de cal est plus abondante sur les milieux contenant la BA que sur ceux contenant la kinétine.

L'ensemble des tiges feuillées transférées sur le milieu d'enracinement produit des racines après 3 à 4 semaines (Figure 1d). Les plantules enracinées ont pu être acclimatées avec un pourcentage de survie de 97% (Figure 1e).

Discussion

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

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

Le nombre de tiges régénérées au bout de 6 semaines est nettement supérieur comparativement à celui obtenu par d'autres auteurs. Datta *et al.* (1) ont régénéré $30,8 \pm 5,5$ tiges/explants après 6 semaines sur leur milieu optimal, MS additionné à $2,3 \mu\text{M}$ de

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

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

Bien que le taux de multiplication ne soit pas significativement différent entre les deux accessions mises en culture dans chaque milieu pris individuellement, la capacité des explants à régénérer des plantes entières serait liée à leur teneur *in vivo* en cytokines et auxines endogènes. La variabilité de réponses aux différentes cytokines serait due aux différences chimiques et structurales qui existent chez les génotypes testés (5, 15). L'augmentation du taux de multiplication moyen à plus de 8 tiges/explant/subculture de trois semaines résulterait de l'action combinée des phytohormones et des suppléments présents dans le milieu à savoir le sulfate d'adénine et la glutamine. Le sulfate d'adénine joue un rôle important dans l'organogénèse. En synergie avec la BA, il stimule la croissance des cellules et favorise la formation des tiges (12). La glutamine, quant à elle, contribue à l'augmentation du nombre de tiges tout en

contrôlant la formation et la chute des feuilles (12, 14). La taille des tiges semble augmenter proportionnellement avec la croissance de la concentration de cytokinine dans le milieu contenant la BA. Singh et al. (14) ont souligné le rôle important joué par la BA en combinaison avec les auxines dans l'élongation de *J. curcas*. La production abondante de cals dans les milieux contenant la BA corrobore les résultats obtenus par Sujatha et al. (15) qui ont montré que la présence de BA dans un milieu de culture entraîne la formation de cals chez *J. curcas*. Datta et al. (1) ont aussi rapporté la formation de cals à la base des tiges feuillées obtenues à partir des explants d'hypocotyle, de pétioles et de feuilles de *J. curcas* sur MS supplémenté avec la BA et l'AIB. Cette production de cals, qui doit être évitée dans le cadre

d'une multiplication de type conforme, n'a toutefois pas donné lieu à la régénération de tiges.

Conclusion

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

Références bibliographiques

- Datta M.M., Priyanka M., Biswajit G. & Timir Baran J., 2007, *In vitro* clonal propagation of biodiesel plant (*Jatropha curcas* L.). Current Science, **93**, 10, 1438-1442.
- Heller J., 1996, Phystic Nut. *Jatropha curcas* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. IPGRI, Rome, 66 p.
- Jayasingh M., 2004, The use of biodiesel by the Indian railways pp. 31-33. In: N.G. Hegde, J.N. Daniel & S. Dhar (editors), *Jatropha and other perennial oilseed crops*. BAF Development Research Foundation, Pune.
- Jha T.B., Mukherjee P. & Datta M.M., 2007, Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn., an important biofuel plant. Plant Biotechnology Reports, **1**, 3, 135-140.
- Kim J.Y., Seo S.Y., Kim S.K., Sung S.K., Song K.J., An G. & Kim W.T., 2001, Two polyphenol oxidase are differentially expressed during vegetative and reproductive development and in response to wounding in the Fuji apple. Plant Sci. **161**, 1145-1152.
- Khurana-Kaul V., Kachhawa S. & Othari S.L., 2010, Direct shoot regeneration from leaf explants of *Jatropha curcas* in response to Thidiazuron and high copper contents in the medium. Biologia Plantarum, **54**, 2, 369-372.
- Lobreaux S., Thoiron S. & Briat J.F., 1995, Induction of ferritin synthesis in maize leaves by an iron-mediated oxidative stress. Plant J. **8**, 443-448.
- Murashige T. & Skoog F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiolo. Plant, **15**, 173-497.
- Nyamai D.O., Omurodo L.O., Esilaba A.O., Auchia J.A., Obonyo C., Otieno G., Katuku A.N., Olang H. & Adhiambo C., 2007, *Jatropha curcas* - the untapped potential in Eastern and Central Africa: production and utilization manual. World Agroforestry Centre: Nairobi, 58 p.
- Ozyigit I.I., Kahraman M.V. & Ercan O., 2007, Relation between explants age, total phenols and regeneration response of tissue cultured cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Afr. J. Biotechnol. **6**, 1, 3-8.
- Purkayastha J., Pugla T., Paul A., Sallati S.K., Mazumdar P., Basu A., Mohammad A., Ahmed Z. & Sahoo L., 2010, Efficient *in vitro* plant regeneration from shoot apices and gene transfer by particle bombardment in *Jatropha curcas*. Biologia Plantarum, **54**, 1, 13-20.
- Raha S. & Roy S.C., 2001, *In vitro* plant regeneration in *Holarrhena antidysenterica* Wall., through high frequency axillary shoot proliferation. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. **37**, 232-236.
- Ripley K.P. & Preece J.E., 1996, Micropropagation of *Euphorbia lafhyris* L. Plant Cell Tissue Organ Cult. **5**, 213-218.
- Singh R.A., Reddy M.P., Chikara J. & Singh S., 2010, A simple regeneration protocol from stem explants of *Jatropha curcas* - A biodiesel plant. Industrial Crops and Products, **31**, 209-213.
- Sujatha M., Makkar H.P.S. & Becker K., 2005, Shoot bud proliferation from axillary nodes and leaf sections of non-toxic *Jatropha curcas* L. Plant Growth Regulation, **47**, 83-90.
- Sujatha M. & Mukta N., 1996, Morphogenesis and plant regeneration from tissue culture of *Jatropha curcas*. Plant cell, Tissue Organ Cult. **44**, 135-141.

S.D. Medza Mve, Gabonais, Doctorant, Université de Liège, Gembloux Agro-Bio Tech, Unité de Phytotechnie Tropicale et Horticulture, 2, Passage des Déportés, BE-5030 Gembloux, Belgique. Email: medzamve@yahoo.fr Téléphone 0032493761809 / 003281622410
 G. Mergaï, Belge, Professeur, ULg, GxABT, Unité de Phytotechnie Tropicale et Horticulture, 2, Passage des Déportés, BE-5030 Gembloux, Belgique.
 J.-P. Baudoin, Belge, Professeur, ULg, GxABT, Unité de Phytotechnie Tropicale et Horticulture, 2, Passage des Déportés, BE-5030 Gembloux, Belgique.
 A. Toussaint, Belge, Professeur, ULg, GxABT, Unité de Phytotechnie Tropicale et Horticulture, 2, Passage des Déportés, BE-5030 Gembloux, Belgique.