

# La génétique d'*Acacia raddiana*

A. BORGEL  
C. CARDOSO  
D. SANÉ  
M.-H. CHEVALLIER



## Résumé

Parmi les 4 sous-espèces d'*Acacia tortilis*, seule *A. tortilis* subsp. *raddiana* est présente au nord et au sud du Sahara où elle est l'une des dernières dicotylédones pérennes ligneuses survivant dans cette région en désertification. La structure génétique de cette espèce a été définie à partir d'une étude locale sénégalaise sur 107 arbres répartis en 15 sites et d'une étude sur l'aire de répartition africaine avec 10 sites de 10 à 25 arbres chacun englobant les 4 sous-espèces. La variabilité génétique observée est importante ( $H_e = 0,42$  à  $0,49$ ), notamment du fait de la polyploidie rencontrée. La différenciation entre les peuplements est faible ( $G_{st} = 0,03$  à  $0,11$ ). L'identification des meilleurs individus comme semenciers d'élite pour les opérations de reboisement est de ce fait rendue très difficile. Aussi, une stratégie clonale est proposée mettant en œuvre des techniques de culture *in vitro* afin de mettre en place des essais multiclonaux d'évaluation génétique. L'aptitude au microbouturage présente un effet famille important, les taux de multiplications obtenus en 3 cycles de subcultures s'étendent de X4 à X10 suivant l'origine génétique du clone. La morphologie du système racinaire qui se met en place sur les microboutures est déterminée par la nature et le mode d'application de l'auxine utilisée pour favoriser l'enracinement. Seul l'ANA ( $53,7 \mu\text{M}$ ) associé à la kinétine ( $0,0465 \mu\text{M}$ ) en traitement inducteur de 10 jours au maximum a permis d'obtenir un enracinement robuste des vitroplants. Un protocole d'embryogenèse somatique est présenté pour obtenir rapidement un plus grand nombre de vitroplants enracinés. 1 406 embryons somatiques ont été créés à partir d'explants

cotylédonnaires et de tissus d'embryons zygotiques cultivés en présence de 2,4-D (9,05  $\mu\text{M}$ ) pendant 100 jours puis alternativement sur des milieux sans 2,4-D mais enrichis en BAP (2,22 à 4,44  $\mu\text{M}$ ) et AIB (0,25 à 2,46  $\mu\text{M}$ ) pendant 30 jours.

Mots-clés :

DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE, ISOZYMES, POLYPLOÏDE, IN VITRO, EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE.

## Abstract

*Of the 4 subspecies of Acacia tortilis, only A. tortilis subsp. raddiana is present in the north and south of the Sahara where it is one of the last dicotyledonous perennial woody plants surviving in this area which is progressively turning into desert. The genetic structure of this species was defined starting from firstly a local study in Senegal of 107 trees distributed in 15 sites, and secondly a study of the distribution area throughout Africa represented by 10 sites of 10 to 25 trees each, including the 4 subspecies. The genetic variability observed is significant ( $H_e = 0.42$  to  $0.49$ ), in particular due to polyploidy phenomena encountered. The differentiation between the populations is weak ( $G_{st} = 0.03$  to  $0.11$ ). The identification of the best individuals as elite seed-bearers for afforestation operations is thus very difficult. A clonal strategy is therefore proposed implementing in vitro culture techniques in order to set up multiclonal tests for genetic evaluation. Aptitude for in vitro micropropagation displays a significant family effect. The multiplication rates obtained after 3 cycles of subculture extend from X4 to X10 according to the genetic origin of the clone. The morphology of the root system established on microcuttings is determined by the nature and the mode of application of the auxin used to support the rooting. Only NAA (53.7  $\mu\text{M}$ ) associated with kinetin (0.0465  $\mu\text{M}$ ) applied for a maximum inductive period of 10 days gives a robust rooting of vitroplants. A protocol of somatic embryogenesis is presented here which makes it possible to quickly obtain a greater number of rooted vitroplants. A total of 1 406 somatic embryos was produced starting from cotyledonary explants and tissues of zygotic embryos cultivated in the presence of 2,4-D (9.05  $\mu\text{M}$ ) for 100 days then alternately on media without 2,4-D but supplemented with BAP (2.22 to 4.44  $\mu\text{M}$ ) and AIB (0.25 to 2.46  $\mu\text{M}$ ) for 30 days.*

Keywords:

GENETIC DIVERSITY, ISOZYMES, POLYPLOIDY, IN VITRO, SOMATIC EMBRYOGENESIS.

## Abréviations

<b>2,4-D</b>	acide 2,4-dichloro phénoxy acétique	<b>MS</b>	solution minérale de Murashige et Skoog. <i>Physiol. Plant.</i> 15 : 473-497 (1962)
<b>ABA</b>	acide abscissique		
<b>ADN</b>	acide désoxyribonucléique	<b>VA</b>	solution minérale de Von Arnold et Eriksson. <i>Can. J. Bot.</i> 59 : 870-874 (1981)
<b>AIB</b>	acide $\beta$ -indole butyrique		
<b>BAP</b>	6-benzyl aminopurine		

## Introduction : diversité génétique et stratégie clonale

Dans le sous-genre *Acacia*, l'espèce *A. tortilis* regroupe quatre sous-espèces : *spirocarpa*, *heteracantha*, *tortilis*, *raddiana*. Seule cette dernière est représentée au nord et au sud du Sahara. Malgré l'importance évidente de ces espèces dans l'économie rurale ou la stabilisation et la fertilité des sols (FAGG et STEWART, 1994), la variabilité génétique des populations naturelles est encore peu connue. Or, l'estimation de ce paramètre est un préalable indispensable à la définition de stratégies de conservation, de gestion, et d'utilisation des ressources forestières (BANRC, 1991). La régénération des forêts, qui se fait principalement par des graines issues des arbres *in situ*, dépend du maintien de cette diversité, en particulier pour faire face à des changements climatiques imprévisibles. Les programmes d'amélioration génétique exploitent la diversité génétique disponible dans les populations naturelles au travers d'essais en champ et d'analyses en laboratoire. Pour les premiers, les clones sont très utilisés en génétique des arbres pour évaluer la valeur génotypique et l'adaptabilité d'individus dits « d'élite ». Cependant, ce n'est pas encore le cas pour *A. tortilis*. Nous verrons pourquoi la structure de la diversité génétique d'*A. tortilis* subsp. *raddiana* conduit à aborder l'étude des génotypes par les clones et quelles technologies doivent être mises en œuvre pour cela. Au Sénégal, les marqueurs isoenzymatiques sont encore à l'heure actuelle les plus utilisés dans les études concernant les acacias. Ils sont réputés neutres, indépendants du milieu et de contrôle génétique simple.

## Estimation et structure de la diversité génétique des marqueurs isozymiques

Deux études de variabilité génétique d'*A. tortilis* sont actuellement connues. La première a porté sur 10 sites de 10 à 25 arbres chacun représentant les 4 sous-espèces dans des régions très diverses (Israël, Kenya, Zimbabwe, Botswana, Niger et Sénégal) (OLNG'OTIE, 1991). La seconde a été conduite sur 107 arbres récoltés dans 15 sites de l'aire de répartition sénégalaise d'*A. tortilis* subsp. *raddiana*, seule sous-espèce présente au Sénégal (CARDOSO, 1995). Par leurs différences, ces deux approches montrent bien la difficulté de ce type d'étude, l'une ayant recueilli des données éparées et ponctuelles, l'autre ayant approfondi l'étude mais sur une aire restreinte et une seule sous-espèce.

Différents paramètres génétiques ont été utilisés pour quantifier la variabilité des populations : le nombre moyen d'allèles ( $A$ ), l'hétérozygotie observée ( $H_o$ ), l'hétérozygotie théorique ( $H_e$ ), la différenciation entre populations ( $G_{ST}$ ) et les distances génétiques.

## Mesures de la diversité génétique

Différents paramètres génétiques sont fréquemment utilisés pour quantifier la variabilité isoenzymatique aux niveaux intra-espèce, intra-population et inter-populations (HAMRICK *et al.*, 1992).

### Mesures de la diversité génétique au niveau intra-population ou intra-espèce

**A** : est le nombre moyen d'allèles ou de variants alléliques identifiés dans la population.

**P** : le taux de polymorphisme est le nombre de locus polymorphes par rapport au nombre de locus étudiés.

**H<sub>e</sub>** : la diversité génétique de Nei exprime la probabilité pour que deux gènes tirés au hasard dans une population soient différents.

Elle est définie par  $H = 1 - \sum p_i^2$ , où  $p_i$  est la fréquence de l'allèle  $i$  au locus considéré,  $H_e$  est équivalent à l'hétérozygotie théorique sous l'hypothèse de Hardy-Weinberg.

**H<sub>o</sub>** : est la proportion de locus hétérozygotes observés par individu.

### Mesures de la diversité génétique au niveau inter-populations

**F<sub>ST</sub>** : variance des fréquences alléliques entre populations ( $\sigma_p^2/p_i(1-p_i)$ ), où  $\sigma_p^2$  est la variance des fréquences alléliques entre les populations et  $p_i$  est la moyenne de la fréquence du  $i^{\text{e}}$  allèle. **F<sub>ST</sub>** est calculé pour tous les locus.

**G<sub>ST</sub>** : défini au niveau d'un locus par  $G_{ST} = 1 - H_S/H_T$ , où  $H_S$  est la moyenne sur toutes les populations des diversités génétiques intrapopulations ;  $H_T$  est la diversité génétique totale sur l'ensemble des populations considérées comme une population unique. Dans le cas où plusieurs locus sont pris en compte,  $H_S$  et  $H_T$  sont les moyennes sur l'ensemble des locus des diversités intrapopulation et totale. **G<sub>ST</sub>** est équivalent à **F<sub>ST</sub>** multiallélique.

### Distances génétiques

**I** : identité génétique  $\sum x_i y_i / (\sum x_i^2 \sum y_i^2)^{0.5}$  où  $x_i$  et  $y_i$  sont les fréquences du  $i^{\text{e}}$  allèle dans les populations  $x$  et  $y$ . **I** varie de 0 (aucun allèle en commun) à 1 (identité des fréquences alléliques dans les populations  $x$  et  $y$ ).

**D** : distance génétique  $D = -\ln I$

Deux caractéristiques liées à l'espèce ont entraîné des difficultés d'analyse et d'interprétation. D'une part, le génotype maternel ne peut être déterminé, les échantillons de feuilles n'ayant pas donné de résultats fiables ; ainsi pour chaque arbre étudié, seuls sont disponibles les génotypes de ses descendants, individus demi-frères. D'autre part, *A. tortilis* est polyploïde (ROSS, 1979 ; OBALLA et OLING'OTIE, 1993). Le nombre très élevé de bandes observées sur les zymogrammes confirme ces résultats. Par conséquent, l'interprétation des systèmes enzymatiques a reposé sur une hérédité tétrasomique des isozymes. La structure (nombre de locus et d'allèles) des zymogrammes obtenus est résumée pour les deux études dans le tableau I pour tous les systèmes enzymatiques analysés. OLING'OTIE (1991) a mis en évidence 13 locus et 40 allèles, soit 2,5 allèles par locus polymorphe dans toutes les sous-espèces d' *A. tortilis* (tabl. II). CARDOSO (1995) a observé 6 locus et 20 allèles, soit 2,4 allèles par locus polymorphe dans la sous-espèce *raddiana*.

Au niveau des sous-espèces, *heteracantha* apparaît en moyenne la moins polymorphe avec un taux de polymorphisme (P) de 85 % et une diversité génétique ( $H_e$ ) de 0,32 (fig. 1).

Au contraire, *raddiana* présente un taux de polymorphisme de 100 % quelle que soit la population et une diversité génétique de 0,49 (OLING'OTIE, 1991) ou de 0,42

▽ Tableau I – Nombre de locus et d'allèles révélés pour les marqueurs isoenzymatiques étudiés par OLING'OTIE (1991) et CARDOSO (1995).

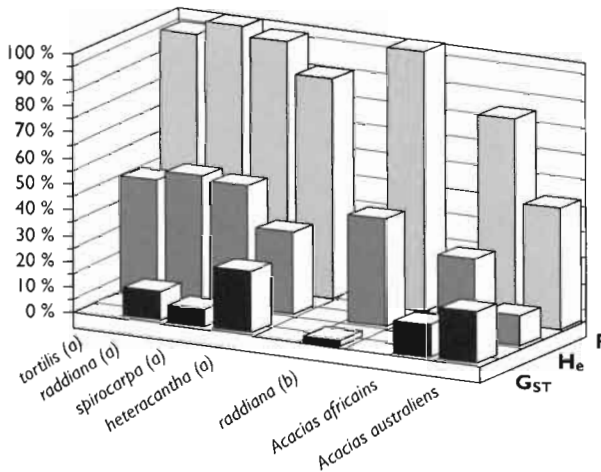
Enzymes	Structure	Étude Oling'Otie (1991)		Étude Cardoso (1995)	
		locus	allèles	locus	allèles
Alcool déshydrogénases	dimérique	1	4		
Endopeptidases	monomérique			1	5
Estérases monomérique		1	4		
Glucose-6-phosphate déshydrogénases	dimérique	2	2		
		2			
Isocitrate déshydrogénases	dimérique	2	2		
			3	1	4
Leucine aminopeptidases	monomérique			1	3
Malate déshydrogénases	dimérique	2	4		
			4		
Enzyme malique	dimérique	2	2		
			2		
6-phosphoglucose déshydrogénases	dimérique	2	4		
			3	1	3
Phosphoglucomutases	monomérique			2	3
					2
Shikimate déshydrogénases	monomérique	1	4		
<b>Total</b>		<b>15</b>	<b>38</b>	<b>6</b>	<b>20</b>

▽ Tableau II – Paramètres génétiques de diversité  
 pour 13 locus de 10 populations d'*Acacia tortilis* (D'après OLN'G'OTIE, 1991).

Population	N	P	A	He
<i>A. tortilis tortilis</i>	165	92	2,50	0,447
<i>A. t. raddiana</i>	130	100	2,50	0,492
<i>A. t. spirocarpa</i>	218	97	2,53	0,464
<i>A. t. heteracantha</i>	202	84	2,45	0,316
Moyennes	179	93	2,49	0,430

N : nombre moyen d'individus par locus ; P : proportion de locus polymorphes (%) ;  
 A : nombre moyen d'allèles par locus ; He : index de diversité génétique.

(CARDOSO, 1995). La diversité se révèle donc supérieure à la diversité moyenne des arbres tropicaux (0,211) et des conifères (0,207) (BEVER et FELBER, 1992). Mais ces études ont trait essentiellement à des espèces diploïdes. Or, plusieurs travaux sur des espèces présentant plusieurs niveaux de ploïdie indiquent clairement que les populations diploïdes ont une diversité significativement inférieure à celle des populations tétraploïdes (SOLTIS et SOLTIS, 1993). Cette diversité élevée est attribuée à l'hérédité tétrasomique. Il faut noter pourtant que *Picea abies*, espèce diploïde, présente une diversité de 0,37 selon GOTTLIEB (1981), valeur proche de celle observée pour *A. tortilis* subsp. *heteracantha*. Par comparaison, les différentes espèces d'*Acacia* sont en moyenne polymorphes à 65 % (P variant de 13 % à 100 %) de leurs locus, avec une diversité génétique de l'ordre de 19 % (He = 2 % à 46 %)



▽ Fig. 1

Paramètres de diversité génétique (P), ( $H_e$ ) et de différenciation ( $G_{ST}$ ) chez *Acacia tortilis* ;  
 comparaison avec l'ensemble des acacias africains et australiens.

(a) étude OLN'G'OTIE (1991)

(b) étude CARDOSO (1995)

(CHEVALLIER et BORGEL, 1998). La variabilité génétique d'*A. tortilis* dépasse celle de l'ensemble des espèces africaines, qui sont en moyenne nettement plus variables que les espèces australiennes, avec un taux de polymorphisme de 79 % contre 47 % et une diversité génétique plus de deux fois supérieure (31 % contre 12 %) (fig. 1). Comme chez la plupart des acacias, la plus grande partie de la variabilité génétique se situe à l'intérieur des populations d'*A. tortilis* avec une différenciation plus forte chez *heteracantha* (fig. 1).

Il est toutefois difficile de comparer les variabilités entre espèces, les estimations des paramètres génétiques pouvant varier selon les auteurs à cause de problèmes méthodologiques liés au nombre et au choix des systèmes enzymatiques, à l'interprétation génétique des zymogrammes et à l'échantillonnage des populations. Ainsi les deux études menées sur *A. tortilis* montrent une grande hétérogénéité dans le nombre et les types d'enzymes pris en compte. Certaines catégories d'enzymes sont connues pour être plus variables que d'autres. Les hydrolases (estérases, aminopeptidases) sont toujours plus polymorphes que les déshydrogénases. Le nombre de systèmes analysés est alors d'autant plus important. HAMRICK *et al.* (1992) ont montré une forte corrélation entre le nombre de locus observés et la diversité génétique intra-population. Il est souvent recommandé d'utiliser au moins 50 locus (NEI, 1978), ce qui a été impossible chez *tortilis* à cause des difficultés techniques. De plus, l'interprétation génétique des zymogrammes peut varier selon les équipes de chercheurs pour une même espèce. La validité du contrôle génétique des isozymes ne peut se faire que par l'intermédiaire de croisements contrôlés, ce qui n'a pas été le cas chez *A. tortilis*. Le nombre et le choix des populations interviennent également dans la quantification et la structuration de la variabilité. Ainsi  $G_{ST}$  varie de 2,5 % (CARDOSO, 1995) à 11 % (OLNG'OTIE, 1991) pour *raddiana*. Dans ce cas, le nombre et l'origine des populations interviennent ainsi que le nombre de locus pris en compte.

La polyploïdie semble apporter une diversité génétique observée significativement supérieure à celle du niveau diploïde. Plusieurs travaux dans ce sens ont été répertoriés par SOLTIS et SOLTIS (1993). L'acquisition d'un niveau de diversité plus élevé par la polyploïdisation pourrait être l'un des moyens utilisés par les espèces pour se maintenir dans des conditions climatiques qui évoluent. L'autopolyploïdie, qui a longtemps été considérée comme un événement défavorable pour l'évolution des espèces (LEVIN, 1983), apparaît de nos jours comme un élément positif majeur, comme en témoigne la découverte en nombre croissant d'espèces autopolyploïdes (GOLDBLATT, 1980 ; LEWIS, 1980). Le doublement chromosomique entraîne, en plus d'une hétérozygotie plus élevée par rapport aux formes diploïdes, un plus grand nombre d'allèles pour une protéine donnée (TAL, 1980) et, par voie de conséquence, un plus grand nombre de formes protéiques lorsque la protéine est polymérique (SOLTIS et SOLTIS, 1993). Traduites en termes de potentiel d'adaptation, ces particularités des polyploïdes pourraient leur apporter des capacités à s'adapter bien supérieures à celles des diploïdes (SOLTIS et RIESEBERG, 1986), qui se manifestent par une distribution géographique plus étendue chez les polyploïdes (REESE, 1958). Ce cas est bien illustré dans le genre *Acacia*, où l'aire de répartition du sous-genre *Acacia*, qui contient principalement des

espèces polyploïdes, est nettement plus large que celle du sous-genre *Aculeiferum*, caractérisé par une majorité d'espèces diploïdes (ROSS, 1981). Toutefois, une meilleure tolérance des polyploïdes à des conditions écologiques et climatiques difficiles est contredite par STEBBINS (1985). Cet auteur attribue la forte proportion de polyploïdes dans un groupe de plantes à la fréquence de contacts secondaires entre populations diploïdes isolées. Par ces contacts, des combinaisons géniques bien adaptées ont été créées et maintenues par polypléidie en favorisant l'hérédité tétrasomique et les appariements entre chromosomes homologues. Selon BRADSHAW et MCNEILLY (1991), la distribution d'une espèce dans des conditions climatiques variées traduit une différenciation intra-espèce liée à une évolution à moyen terme du climat (moins de  $10^4$  ans) et non à une adaptation physiologique de l'espèce.

## La stratégie clonale et la culture *in vitro*

Pour les arbres forestiers, la stratégie clonale recouvre deux finalités différentes. Dans un cas, le produit final est distribué sous forme de clones : c'est la foresterie clonale. Dans l'autre cas, le produit final est distribué sous forme de graines, mais le clonage a été utilisé à au moins une étape du programme de sélection ou de production des semences.

La foresterie clonale est une propagation végétative à grande échelle qui permet de diffuser du matériel amélioré rapidement et en conservant les caractères améliorés (exemples : l'eucalyptus et le peuplier). Or, la sélection génétique peut faire gagner 20 à 30 % sur les caractères sélectionnés dès la première génération sur les arbres forestiers sauvages (BURLEY, 1989). Pour être efficace en reforestation, la production clonale annuelle doit atteindre  $10^6$  ou  $10^7$  individus. En revanche, cette méthode risque de réduire la base génétique du matériel diffusé et d'augmenter ainsi le risque face aux attaques parasitaires ou aux changements climatiques (HÜHN, 1992). En pratique, aucun programme n'utilise seulement un clone ou quelques clones. La plupart diffusent 10 à 100 clones différents dans la même région de plantation. Cette stratégie est utile pour les arbres forestiers à croissance rapide destinés à une exploitation industrielle. De plus, si la multiplication végétative *in vitro* est utilisée pour produire les clones, le matériel végétal diffusé peut être assaini de maladies virales.

La deuxième finalité repose sur une stratégie où le clone n'est pas un produit mais un outil créé pour mieux comprendre la génétique des caractères sélectionnés et/ou pour produire des semences améliorées. Les clones permettent d'évaluer les génotypes en cours de sélection. La précision de l'estimation de la valeur génotypique et de l'interaction génotype-environnement est bien meilleure dans des essais multi-clonaux que sur des comparaisons de descendances ou de provenances dans le cas d'espèces à forte variabilité (MULLIN et al., 1992).



Les clones retenus sont ensuite utilisés en vergers grainiers comme parents des semences qui seront distribuées. Ce système permet d'obtenir un gain génétique significatif tout en rétablissant la variabilité génétique. Dans ce cas, le nombre d'individus par clone peut être de  $10^3$  à  $10^5$  sans obligation de production clonale annuelle. Enfin, les clones sont du matériel bien adapté aux études en laboratoire ou en pépinière pour la résistance aux stress et pour les interactions hôte-pathogène ou hôte-symbiote.

Dans le cas d'*A. tortilis* subsp. *raddiana*, les clones seront utiles pour étudier la valeur génétique des individus ainsi que les interactions génotype/milieu et génotype/symbiote. En revanche, il est clair qu'utiliser la propagation clonale de cette espèce en vue de reboisement au Sahel n'est pas réaliste. L'aire de répartition de l'espèce au Sénégal recouvre les 108 000 km<sup>2</sup> ( $10,8 \cdot 10^6$  ha) de la zone sahéenne et sahélo-soudanienne. Dans ce pays, le déboisement perdure depuis des décennies et a atteint  $5,2 \cdot 10^4$  ha par an pendant la période 1981-1990 (SHARMA *et al.*, 1994). Les surfaces à reboiser se comptent donc en millions d'hectares, c'est-à-dire en centaines de millions d'individus. Pour *A. tortilis* subsp. *raddiana*, seule la production de semences est compatible avec cette contrainte. De plus, nous verrons que le système racinaire du semencéon d'*Acacia* est mieux adapté que celui de la microbouture dans les conditions climatiques difficiles des zones sèches.

L'espèce ne présente aucune aptitude naturelle à la multiplication végétative. Aussi, il a été nécessaire de mettre au point une méthodologie de culture *in vitro* pour obtenir les clones. Deux voies ont été étudiées : le microbouturage et l'embryogenèse somatique.

Le microbouturage d'*A. tortilis* subsp. *raddiana* consiste à provoquer le développement de bourgeons axillaires préexistants, puis à enraciner les jeunes tiges ainsi obtenues (BORGEL *et al.*, 1993 a ; NANDWANI, 1995). Ces opérations nécessitent souvent, pour les arbres, des milieux de cultures spécifiques avec des équilibres d'auxines et de cytokinines différents. La capacité d'organogenèse *in vitro* a été évaluée pour 10 familles d'*A. tortilis* subsp. *raddiana*. L'enracinement est une étape difficile du microbouturage des ligneux. Chez *A. tortilis* subsp. *raddiana*, les microboutures perdent rapidement l'aptitude à produire des racines après la deuxième subculture sur un milieu de multiplication. La réactivation de l'enracinement a été déterminée en fonction des traitements hormonaux appliqués.

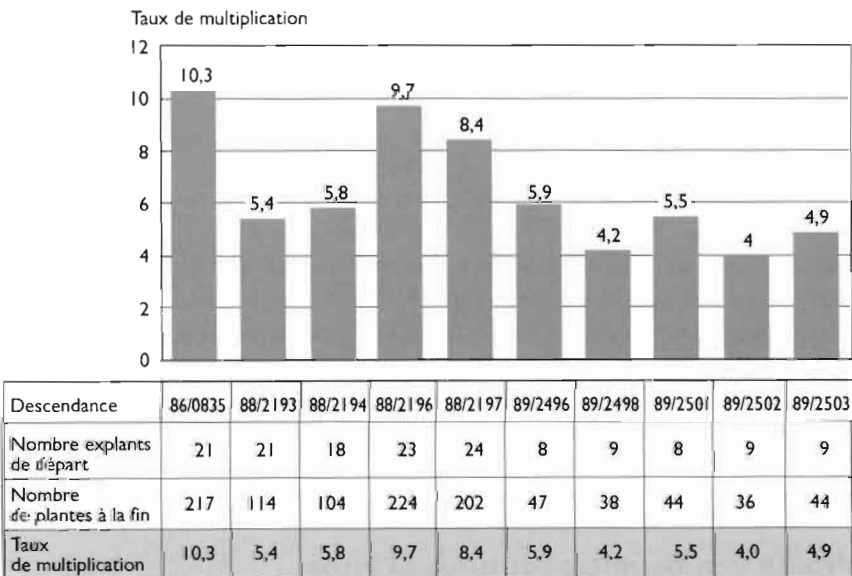
L'embryogenèse somatique permet d'obtenir directement des jeunes plantes enracinées à partir de tissus différenciés. Cette méthode peut décupler le taux de multiplication par rapport au microbouturage, mais elle implique une réorganisation profonde de l'expression du génome sous l'influence de substances de croissance exogènes comme le 2,4-D. Un protocole complet de régénération d'embryons somatiques d'*A. tortilis* subsp. *raddiana* a été mis au point (SANÉ, 1998).

### **Production de microboutures *in vitro* : effets du génotype**

Les clones ont été produits à partir de 10 descendances demi-frères d'arbres récoltés vers les localités de Dahra et Souilène au Sénégal. 24 graines par

descendance sont mises à germer en condition aseptique après scarification et stérilisation. À un mois, un segment uninodal est prélevé sur chaque plante et constitue chaque tête de clone. Les dix descendances sont représentées par 150 clones (soit 8 à 24 clones par famille selon le taux de germination des graines de départ). Trois cycles de subcultures *in vitro* de deux mois sont conduits sur les milieux de multiplication dans des modules à éclairage, température et hygrométrie contrôlés. Le taux de multiplication de chaque famille à la fin de l'expérience est le nombre de plantes produites rapporté au nombre d'explants initiaux. Le nombre de plantes obtenues par descendance et les taux de multiplication sont présentés dans la figure 2. En tout, les 150 clones cultivés ont produit 1 070 plantes en 3 subcultures de deux mois. Le taux de multiplication moyen est de 7,1 pour cette période. Les descendances d'*A. tortilis* subsp. *raddiana* présentent des aptitudes à la multiplication végétative *in vitro* significativement différentes. La descendance 86/0835 de Souilène a un taux de multiplication de 10,3 alors que la descendance 89/2502 de Dahra montre un taux de 4,0 seulement pour la même période. On ne peut cependant pas y voir un effet de l'origine géographique puisque la descendance 88/2196 issue de Dahra a un taux de multiplication de 9,7 proche de 86/0835.

À l'intérieur de chaque descendance aussi, les différences d'aptitude à la multiplication végétative sont grandes. La meilleure descendance (86/0835) comprend 21 clones dont les taux de multiplication en six mois se répartissent de 3 à 32 suivant les clones.



▽ Fig. 2

Taux de multiplication de dix clones issus de familles différentes d'*Acacia tortilis* subsp. *raddiana* après six mois de culture *in vitro* et trois cycles de subcultures.

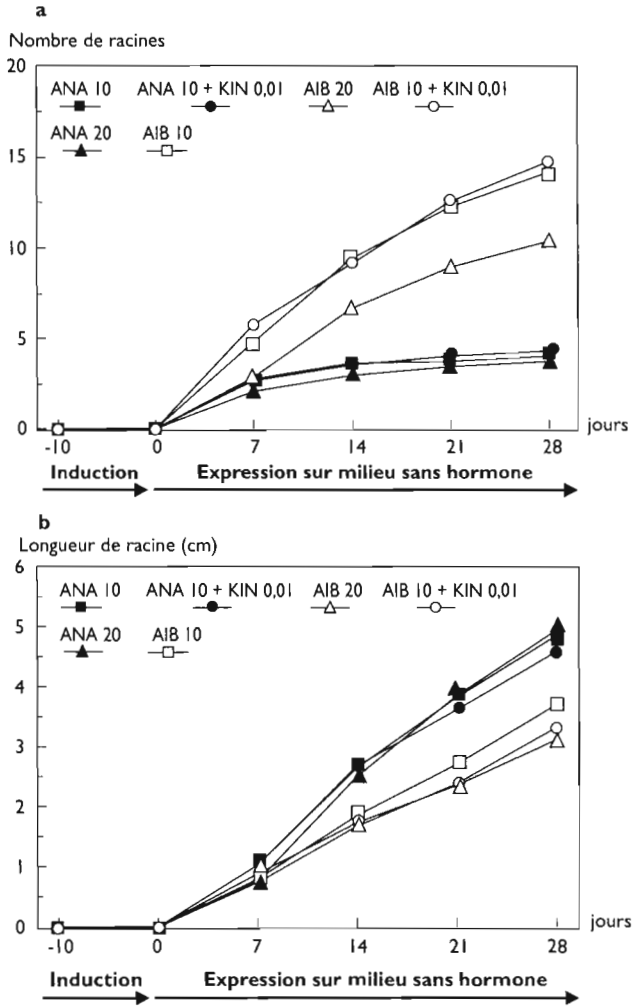
*A. tortilis* subsp. *raddiana* peut donc être multiplié végétativement *in vitro*. La rapidité de production des clones est fortement déterminée par le génotype et par la descendance d'origine du clone. On peut cependant trouver des génotypes ayant un bon taux de multiplication dans la plupart des descendes. En revanche, l'aptitude à l'enracinement diminue rapidement au fur et à mesure des subcultures et devient le facteur limitant pour le transfert des microboutures au champ.

### **Enracinement de microboutures *in vitro* : effet du traitement auxinique**

Les vitroplants ont été produits à partir de jeunes plantes de un mois élevées dans les mêmes conditions que pour le microbouturage. Deux cycles de subcultures *in vitro* de deux mois sur un milieu de multiplication ont été appliqués avant de commencer le prétraitement d'enracinement. Les vitroplants ont été transférés sur les milieux d'induction de la rhizogenèse avec six combinaisons d'auxines pendant 10 jours. Puis ils ont été transférés sur un milieu d'expression de la rhizogenèse sans hormone où le développement des racines a été observé pendant 4 semaines. Les courbes de croissance des racines ont été construites pour chaque condition d'induction.

Il a été nécessaire de dissocier la phase de multiplication de celle de l'enracinement en utilisant des milieux très différents. De plus, nous avons montré que l'enracinement nécessite une action en deux temps : une phase d'induction par application d'auxine pendant une durée courte (10 jours au maximum) suivie d'une phase d'expression racinaire dans un milieu sans hormone.

La figure 3 montre la cinétique de croissance des racines (nombre de racines par explant sur la figure 3 a, longueur moyenne des racines par explant sur 3 b) à partir du repiquage sur milieu d'induction. Le système racinaire devient visible à partir de la date de transfert sur le milieu d'expression sans hormone. Le nombre de racines atteint son maximum (3 racines) dès le septième jour quand l'ANA a été utilisé comme hormone d'induction. Dans le même temps, l'induction à l'AIB combinée ou non avec la kinétine a déjà provoqué la croissance de 5,8 et 4,8 racines en moyenne. Ce nombre continue de progresser jusqu'à la fin de l'expérience (14 racines en moyenne à 28 jours). La nature de l'auxine induit aussi des différences de vitesses de croissance des racines pendant l'expérience (fig. 3 b). En fin d'expérience, les microboutures induites avec l'ANA présentent des racines plus longues (5,0 cm) que celles induites avec l'AIB (3,0 cm). En résumé, la morphologie générale du système racinaire est influencée par la nature de l'auxine utilisée comme inducteur. Avec l'ANA, le système racinaire ressemble à celui de l'acacia issu de semis avec 1 à 3 racines au maximum ; ce sont des pivots robustes et à croissance orthotrope rapide. Au contraire, l'AIB provoque la croissance d'un chevelu formé de nombreuses racines fines et plagiotropes. Le traitement inducteur de 10 jours avec l'ANA à 10 mg.l<sup>-1</sup> associé à la kinétine à 0,01 mg.l<sup>-1</sup> a permis de réactiver la rhizogenèse de microboutures d'*A. tortilis* subsp. *raddiana* qui présentent, en 4 semaines, 57 % d'enracinement avec un système pivotant à croissance rapide (SANÉ et al., 2001).



▽ Fig. 3

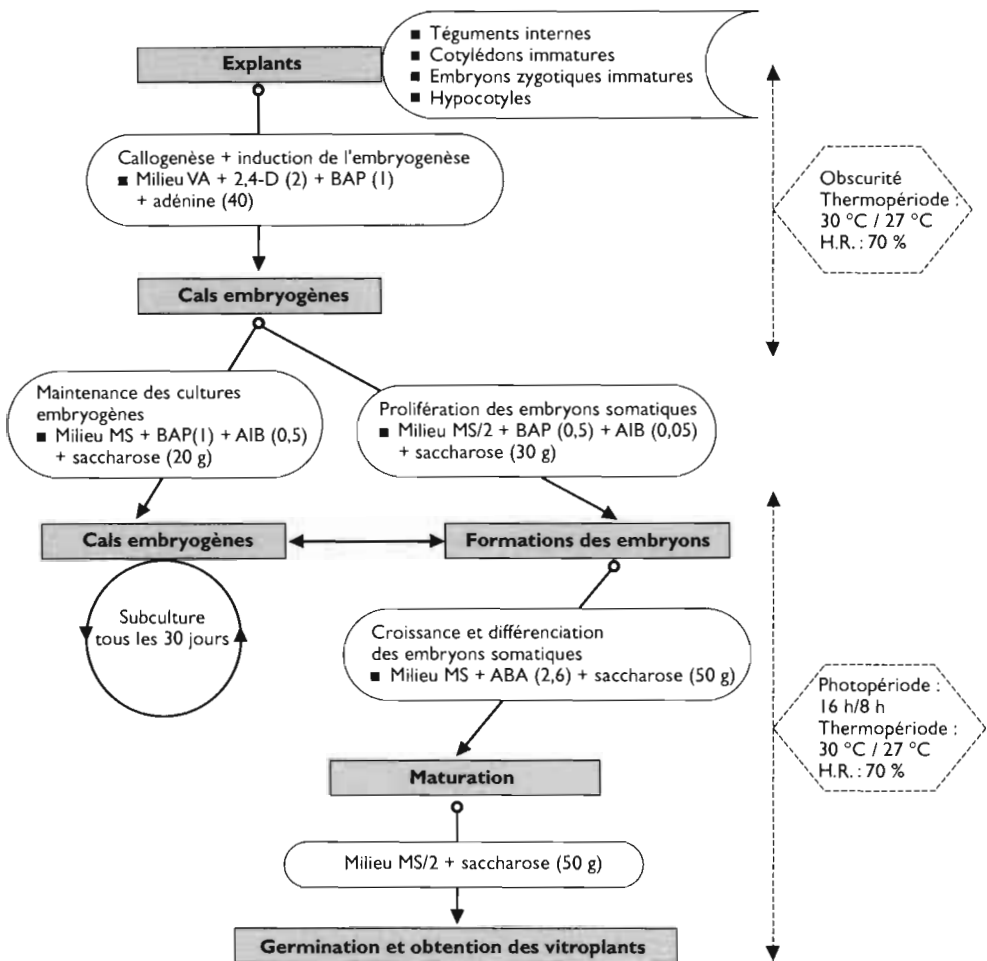
Développement in vitro du système racinaire de microboutures d'*Acacia tortilis* subsp. *raddiana* après dix jours d'induction avec six conditions de régulateurs de croissance.  
(a) nombre de racines développées  
(b) longueur moyenne des racines développées.

## Embryogenèse somatique

La production d'embryons somatiques chez *A. tortilis* subsp. *raddiana*, *A. nilotica* subsp. *tomentosa* et *adstringens* a été obtenue à partir d'explants juvéniles issus de cotylédons immatures et de tissus d'embryons zygotiques grâce à un processus de régénération par embryogenèse indirecte faisant intervenir le passage par un stade cal. Le choix du type d'explant apparaît souvent comme la première étape importante qui conditionne la régénération. Généralement, les explants utilisés

sont des embryons zygotiques immatures, de jeunes feuilles, ou des segments de jeunes inflorescences. Chez les acacias, des cals embryogènes ont pu être obtenus à partir d'embryons zygotiques (BORGEL *et al.*, 1993 b) ou à partir des endospermes de graines immatures d'*A. nilotica* (GARG *et al.*, 1996) ou encore à partir de cotylédons d'*A. albida* (GASSAMA, 1996).

Dans nos conditions expérimentales, le protocole d'embryogenèse somatique mis en place comporte cinq étapes (fig. 4) : une étape de callogenèse et d'initiation de la proembryogenèse, une étape d'expression des structures embryogènes suivie d'une étape de multiplication des cals (ou phase d'augmentation de la biomasse



▽ Fig. 4

Procédé de régénération d'*Acacia tortilis* subsp. *raddiana*,  
*A. nilotica* subsp. *tomentosa* et *A. nilotica* subsp. *adstringens*  
par embryogenèse somatique à partir de cals obtenus directement sur explants cultivés in vitro.

des cellules dédifférenciées), une étape de maturation des embryons ou de mise en place de l'axe embryonnaire. La dernière étape est celle de l'élongation des axes caulinaire et racinaire des embryons, conduisant à l'obtention des vitroplants enracinés. Pour chaque étape, il a été nécessaire de déterminer les besoins physiologiques des tissus au cours du processus de régénération. (fig. 4).

C'est pourquoi la nature, la concentration et la séquence des régulateurs de croissance constituent le second facteur qui détermine, après le choix des explants, la compétence des tissus pour les différentes phases de l'embryogenèse.

La présence de 2,4-D est indispensable à la réactivation des cellules périvasculaires ainsi qu'à la formation de massifs méristématiques sur les explants cotylédonaire d'*A. nilotica* et sur les embryons zygotiques d'*A. tortilis*. Nos résultats montrent en outre une très grande sensibilité des tissus des acacias vis-à-vis de cette auxine. La marge de variation de la concentration en 2,4-D est très réduite, la valeur optimale étant 2 mg.l<sup>-1</sup> dans des milieux sans charbon actif. Les tissus d'*A. tortilis* sont les plus rapides à initier une callogenèse (dès la première semaine de culture). La callogenèse démarre à la deuxième ou troisième semaine chez *A. nilotica*. En revanche, la formation de cals embryogènes exploitables prendra 60 jours pour *A. nilotica* et 100 jours pour *A. tortilis*.

Comme pour d'autres espèces, les cals embryogènes perdent leur potentiel embryogénétique s'ils sont maintenus en contact prolongé avec le 2,4-D. Ils sont donc cultivés pendant un mois alternativement sur un milieu de prolifération avec BAP 0,5 mg.l<sup>-1</sup> et AIB 0,05 mg.l<sup>-1</sup> et 30 g.l<sup>-1</sup> de saccharose, puis sur un milieu de maintenance avec BAP 1 mg.l<sup>-1</sup> et AIB 0,5 mg.l<sup>-1</sup> et 20 g.l<sup>-1</sup> seulement de saccharose. À chaque passage sur le milieu de prolifération, des cals nodulaires porteurs de préembryons sont produits et transférés sur un milieu de maturation des embryons somatiques avec ABA 2,6 mg.l<sup>-1</sup> et 50 g.l<sup>-1</sup> de saccharose pendant 30 à 45 jours. Les embryons somatiques peuvent être ensuite isolés et transférés sur un milieu de germination sans régulateurs de croissance où ils se développent en plantes. Au total, 1 406 embryons somatiques ont été produits, dont la moitié se sont développés en plantules.

## Conclusion

Comme chez de nombreuses espèces pérennes à aire de distribution étendue, *A. tortilis* subsp. *raddiana* présente une forte variabilité génétique et une faible différenciation entre les peuplements. Le maintien d'une telle diversité génétique est en partie expliqué par la polyploidie de l'espèce. Toutefois, le rôle évolutif de la polyploidie comme moyen de lutte contre l'extinction de l'espèce face à des modifications climatiques ou écologiques n'est pas clairement établi.

L'analyse de la diversité génétique des populations naturelles d'*A. tortilis* présente deux difficultés majeures. L'espèce est tétraploïde pour une bonne part de ses

sous-espèces ou variétés et peu de modèles génétiques sont adaptés à l'interprétation de marqueurs au niveau tétraploïde. L'autre inconvénient est d'ordre plus technique. Les études présentées n'ont pas pu être conduites sur les arbres repérés *in situ* mais sur les graines de leur descendance par fécondation libre, c'est-à-dire sur des populations de demi-frères.

Par ailleurs, l'échantillonnage des deux études connues est insuffisant. Il serait important de compléter l'étude avec des populations d'*A. tortilis* subsp. *raddiana* du nord du Sahara, en particulier de Tunisie. Nous avons en effet observé par cytométrie en flux, sur quelques échantillons d'*A. tortilis* subsp. *raddiana* de Tunisie, une quantité d'ADN nucléaire deux fois moindre que celle de la même espèce au Sénégal, associée avec des profils isoenzymatiques beaucoup plus simples (résultats non publiés).

La grande diversité génétique intra-population observée sur les marqueurs isoenzymatiques est un indice important pour prédire que les essais en champs de descendance présenteront une forte variance intra. Pour la même raison, toute étude de physiologie sur la plante entière ou d'interaction hôte-symbiote ne pourra présenter de résultat généralisable que moyennant un nombre de répétitions important. C'est pourquoi le clonage réussi de l'espèce ouvre la perspective d'améliorer la fiabilité de telles études.

## Auteurs

### **A. Borgel, C. Cardoso**

IRD, GeneTrop, 911, avenue Agropolis,  
BP 64501, 34394 Montpellier cedex 5,  
France

### **D. Sané**

Université Cheikh Anta Diop,  
Faculté des sciences et techniques,  
Département de biologie végétale,  
BP 5005, Dakar Fann, Sénégal

### **M.-H. Chevallier**

Cirad-Forêt,  
Campus international de Baillarguet,  
Montferrier-sur-Lez, TA 10/C,  
34398 Montpellier cedex 5,  
France

## Références bibliographiques

### **BANRC,**

1991 – *Managing global genetic resources. Forest trees. Committee on managing global resources: Agricultural imperatives.* National Academy Press, 228 p.

### **BEVER D. J., FELBER F.,**

1992 – « The theoretical population genetics of autopolyploid ». *In* Futuyma D., Antonovics J., eds : *Oxford surveys in evolutionary biology*, 8 : 185-217.

**BORGEL A., DIOUF M.,  
KPARÉ Y.,**

1993 a – Effet de l'origine génétique sur l'aptitude au clonage *in vitro* d'*Acacia raddiana*.

*Bois et Forêts des Tropiques*, 238 : 23.

**BORGEL A., BRIZARD J. P.,  
ABERLENC F., HUET C., HAMON S.,**

1993 b – « Obtention de cals embryogènes et d'embryons somatiques d'acacias sahéliens : étude histologique comparée avec l'embryogenèse zygotique ».

*In : XII colloque IAPTC-France*, Montpellier (affiche).

**BRADSHAW A. D., MCNEILLY T.,**

1991 – Evolutionary response to global climatic change. *Annals of Botany*, 67 (supplément 1) : 5-14.

**BURLEY J.,**

1989 – « Application of biotechnology in forestry and rural development ».

*In Dhawan V., ed. :*

*Application of biotechnology in forestry and horticulture*, New York and London, Plenum Press : 9-20.

**CARDOSO C.,**

1995 – *Contribution à l'étude de la diversité génétique des acacias sahéliens :*

*l'Acacia tortilis subsp. raddiana au Sénégal*. Thèse doct., univ. Paris XI, 230 p.

**CHEVALLIER M.-H.,**

**BORGEL A.,**

1998 – « Diversité génétique des Acacias ».

*In* Campa C., Grignon C., Gueye M., Hamon S., éd. : *L'Acacia au Sénégal*, Paris, Orstom, coll. Colloques et séminaires : 289-308.

**FAGG C. W., STEWART J. L.,**

1994 – The Value of *Acacia* and *Prosopis* in Arid and Semi- Arid Environments. *Journal of Arid Environments*, 27 (1) : 3-25.

**GARG L., BHANDARI N. N.,**

**RANI V., BOJWANI S. S.,**

1996 – Somatic embryogenesis and regeneration of triploid plants in endosperm culture of *Acacia nilotica*. *Plant Cell Reports*, 15 : 855-858.

**GASSAMA Y. K.,**

1996 – *Étude des voies d'amélioration génétique par la biologie de la reproduction, les potentialités de clonage in vitro et la symbiose fixatrice d'azote atmosphérique chez Acacia albida*. Thèse doct. d'État, univ. Cheikh Anta Diop Dakar, 250 p.

**GOLDBLATT P.,**

1980 – « Polyploidy in angiosperms : monocotyledons ». *In* Lewis W. H., ed. : *Polyploidy: biological relevance*, New York, Plenum Press : 219-240.

**GOTTLIEB L. D.,**

1981 – Electrophoretic evidence and plant populations. *Prog. Phytochem.*, 7 : 1-46.

**HAMRICK J. L., GODT M. J.,**

**SHERMAN-BROYLES S. L.,**

1992 – Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests*, 6 : 95-124.

**HÜHN M.,**

1992 – Multiclinal mixtures and number of clones. *Silvae Genetica*, 41 (4-5) : 205-213.

**LEVIN D. A.,**

1983 – Polyploidy and novelty in flowering plants. *Amer. Nat.*, 122 : 1-25.

**LEWIS W. H.,**

1980 – « Polyploidy in angiosperms : dicotyledons ». *In* Lewis W. H., ed. : 241-267.

**MULLIN T. J., MORGENSTEIN E. K.,**

**PARK Y. S., FOWLER D. P.,**

1992 – Genetic parameters from a clonally replicated test of black spruce (*Picea mariana*) *Can. J. For. Res.*, 22 (1) : 24-36.

**NANDWANI D.,**

1995 – *In vitro* micropropagation of a tree legume adapted to arid lands *Acacia tortilis subsp raddiana*. *Ann. Sci. For.*, 52 : 183-189.

**NEI M.,**

1978 – Estimation of average heterozygosity and genetic distances from a small number of individuals. *Genetic*, 89 : 583-590.



**OBALLA P. O., OLANG'OTIE P. A. S.,**  
1993 – Chromosome numbers in two  
African *Acacia* species. *Kew Bull.*, 49 : 107-  
113.

**OLANG'OTIE P. A. S.,**  
1991. – *Acacia tortilis* (Forssk.) Hayne:  
a study of genetic diversity and breeding  
systems. Unpublished D. Phil. Thesis,  
univ. of Oxford, 116 p.

**REESE G.,**  
1958 – Polyploidie und verbreitung.  
*Z. Bot.*, 46 : 339-354.

**ROSS J. H.,**  
1979 – A conspectus of the African acacias  
species. *Mem. Bot. Surv. S. Afr.*, 44 : 1-155.

**ROSS J. H.,**  
1981 – An analysis of the African *Acacia*  
species: their distribution, possible origins  
and relationships. *Bothalia*, 13 : 389-413.

**SANÉ D.,**  
1998 – *Étude des facteurs physiologiques  
et cytogénétiques de l'embryogenèse somatique  
chez Acacia nilotica subsp. tomentosa,  
A. nilotica subsp. adstringens et A. tortilis  
subsp. raddiana.* Thèse doct., univ. Cheikh  
Anta Diop, Dakar, 126 p.

**SANÉ D., BORGEL A., CHEVALLIER M.-H.,  
GASSAMA-DIA Y. K.,**  
2001 – Transient auxin treatment for *in vitro*  
rooting of microcuttings of *Acacia tortilis*  
subsp *raddiana*. *Ann. Sci. For.*, 58 : 431-437.

**SHARMA P. N., RIETBERGEN S.,  
HEIMO C. R., PATEL J.,**  
1994 – *A strategy for the forest sector  
in Subsaharan Africa.* Banque mondiale  
Technical Paper, 251, 86 p.

**SOLTIS D. E., RIESEBERG L. H.,**  
1986 – Autopolyploidy in *Tolmia menziesii*  
(*Saxifragaceae*): genetic insights from  
enzyme electrophoresis *Amer. J. Bot.*, 73 :  
310-318.

**SOLTIS D. E., SOLTIS P. S.,**  
1993 – Molecular data and the dynamic  
nature of polyploidy. *Critical Reviews in Plant  
Sciences*, 12 : 243-273.

**STEBBINS G. L.,**  
1985 – « Polyploidy in plants: unsolved  
problems and prospects ». In Lewis W. H.,  
ed. : 495-520.

**TAL M.,**  
1980 – « Physiology of polyploids ». In  
Lewis W.H., ed. : 61-76.