

**UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR**

\*\*\*\*\*



**MEMOIRE POUR L'OBTENTION DU  
DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES**

**PRESENTE A LA FACULTE DES SCIENCES**

**DEPARTEMENT DE BIOLOGIE VEGETALE**

**PAR**

**Yamba Maritelao KPARE**

*Maître ès-Sciences*

**SUJET ;**

**INFLUENCE DE L'EXPRESSION DE LA  
VARIABILITE GENETIQUE SUR LES  
POTENTIALITES DE CLONAGE  
D'ACACIA RADDIANA (SAVI.)**

soutenu le    juin 1992

devant la Commission d'Examen composée de :

**Président : M. Amadou Tidiane BA, Professeur Titulaire**

**Membres : M. Alain BORGEL, Chargé de recherche ORSTOM  
M. Jean-Marc LEBLANC, Chargé de recherche ORSTOM  
Mme Yaye Kene GASSAMA-DIA, Maître-Assistante  
Melle Mame Ourèye SY, Assistante**

## REMERCIEMENTS.

Le présent rapport de DEA regroupe les résultats de travaux effectués entièrement dans le Laboratoire de Génétique de l'ORSTOM Bel-Air. Le sujet proposé par ce Laboratoire avec la collaboration étroite de la Faculté des Sciences de l'Université CHEIKH ANTA DIOP de Dakar, a été traité sous la responsabilité scientifique de Mr. Alain BORGEL, Chargé de recherche ORSTOM, et de Mme Yaye K. GASSAMA-DIA, Maître-Assistante au Département de Biologie Végétale de l'Université CHEIKH ANTA DIOP de Dakar.

Nous tenons à témoigner toute notre reconnaissance et nos profonds remerciements à ceux qui par leur générosité ont bien voulu contribuer à l'aboutissement de ce travail.

**Mr. André FONTANA**, Directeur de l'ORSTOM Dakar au moment de notre admission, pour nous avoir accepté dans votre Etablissement combien prestigieux.

**Mr. le Professeur A. Tidiane BA**, Chef de Département de Biologie Végétale à la Faculté des Sciences de l'Université CHEIKH ANTA DIOP de Dakar, pour l'honneur et la confiance que vous nous avez fait en nous inscrivant à l'ORSTOM. Soyez assuré de notre profond attachement.

**Mr. Jean-Marc LEBLANC**, Responsable du Laboratoire de Génétique de l'ORSTOM Bel-Air, nous avons été très agréablement surpris par la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de nous accueillir dans votre laboratoire. Votre soutien constant nous a été d'un grand réconfort. Veuillez trouver ici l'expression de notre estime et de nos sincères remerciements.

**Mr. Alain BORGEL**, Responsable de l'URCI (Unité de Recherche Commune en Culture *In-vitro*) vous nous avez fait un grand honneur en acceptant de guider nos premiers pas sur la voie de la recherche. Nous louons votre rigueur dans le travail et vous remercions pour la disponibilité et pour la grande générosité que vous nous avez manifestées malgré vos multiples responsabilités. Soyez assuré de notre très vive reconnaissance et de notre respectueuse sympathie.

**Mme. Yaye K. GASSAMA-DIA**, Maître-Assistante à la Faculté des Sciences de l'Université CHEIKH ANTA DIOP de Dakar, en acceptant de diriger notre travail, vous nous prouvez encore une fois la place prépondérante que vous occupez dans la formation des étudiants de cette Faculté. Nous osons croire que les résultats préliminaires auxquels nous avons aboutis pourront combler en partie vos espérances. Nous admirons votre patience, votre compréhension et louons vos qualités humaines. Vous resterez toujours pour nous un modèle.

Nos remerciements s'adressent également à tous les autres stagiaires, chercheurs et personnel du Laboratoire de Génétique pour la parfaite harmonie qui a caractérisée les moments passés ensemble. Nous remercions plus particulièrement **Mahécor DIOUF**, technicien en culture *in-vitro*; vous avez été un véritable artiste pour toute la phase pratique de ce travail. Par votre dévouement à notre cause, vous avez été pour nous un parent plutôt qu'un meilleur ami. Comment, quand et pourquoi pourrions-nous vous oublier!

**Je Dédie ce Travail..**

**A Dieu, Océan d'Amour et de Miséricorde, qui crée et sustente toutes vies et tous univers.**

**A mes parents, pour leur affection désintéressée et sans limite.**

**Aux compatriotes vivant au Sénégal, pour les bons moments que nous avons eus à partager.**

**A tous les amis qui, par les ondes de leurs pensées positives, m'entourent de leur affection.**

**Au Sénégal, outre ta téranga que nous avons si heureusement expérimentée, nous avons beaucoup appris.**

**Au Togo, pour tous les sacrifices consentis.**

## **A nos Maîtres et Juges**

### **-A notre Maître et Président de Jury**

**Monsieur le Professeur A. Tidiane BA**

Vous avez de plus fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire. Permettez-nous de vous exprimer toute notre admiration.

### **-A notre Maître et Juge**

**Monsieur Jean-Marc LEBLANC**

Nous sommes très réjoui par votre présence dans ce jury pour examiner le travail que vous avez eu l'amabilité d'accueillir dans votre laboratoire. Nous vous remercions infiniment.

### **-A notre Maître et Juge**

**Mme Yaye K. GASSAMA-DIA**

Nous sommes très reconnaissant pour toutes vos directives qui ont si heureusement guidé ce travail. Nous serons encore plus heureux à vous savoir l'accepter.

### **-A notre Maître et Juge**

**Monsieur Alain BORGEL**

Nous avons été très sensible aux soins et à l'attention bien particuliers que vous avez accordés à ce travail. Nous souhaitons tant qu'il puisse apporter la satisfaction et l'intérêt qu'il faut pour justifier votre grand dévouement.

### **-A notre Maître et Juge**

**Mlle Mame O. SY**

Assistante au département de Biologie Végétale (UCAD). Nous vous exprimons notre très sincère remerciement pour avoir accepté spontanément de juger ce travail. Nous allons par cette occasion bénéficier de votre expérience qui nous sera d'un grand intérêt.

## RÉSUMÉ

*Acacia raddiana*, Légumineuse arborescente, est une espèce bien adaptée aux conditions climatiques des zones arides. Elle est souvent utilisée en reboisement pour la régénération des biotopes en déperdition. Le présent travail de micropropagation d'individus juvéniles est une contribution à l'évaluation génétique de cette espèce à partir de clones à multiplication rapide. Les résultats analysés mettent en évidence deux faits essentiels: d'un côté, un effet génotypique important que révèlent des différences d'aptitude à la croissance des différentes familles de vitroplants; de l'autre, un effet milieu montrant que les microboutures de premier ordre se développent mieux sur le milieu simple de Murashige et Skoog dilué de moitié (MS/2) et contenant du charbon actif. Par ailleurs nous avons montré que l'addition de charbon actif est nécessaire aux cultures afin d'éviter la formation des cals en présence d'hormones végétales. Les interactions familles -milieux observées semblent indiquer la nécessité d'adapter les milieux de culture à chaque génotype afin d'obtenir une régénération totale des plantules *in-vitro*. La phase d'acclimatation des vitroplants chez *Acacia raddiana* a été menée avec succès.

**Mots-clés:** Zones arides - *Acacia raddiana* - Propagation *in-vitro* - Individus juvéniles - Effets génotypiques - Balances hormonales.

## SOMMAIRE.

LISTES DES FIGURES ET PLANCHES DU TEXTE.....	8
INDEX DES SIGLES ET ABREVIATIONS DU TEXTE.....	9
INTRODUCTION GENERALE.....	10
A/. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. Choix de l'Acacia raddiana (Savi).....	13
1. Taxonomie et description de l'espèce.....	13
1.1. Identification des Mimosacées.....	13
1.2. Identification des Acacias.....	14
1.3. Répartition géographique de l'espèce.....	14
1.3.1. Les stations.....	15
1.3.2. Multiplication et culture.....	15
1.4. Morphologie et caractères botaniques.....	15
2. Les associations symbiotiques.....	16
2.1. Les rhizobium.....	16
2.2. Les mycorhizes.....	17
3. Les propriétés d'Acacia raddiana.....	17
4. Conclusion.....	18
II. La culture <i>in-vitro</i> .....	18
1. Introduction et historique.....	18
2. La multiplication végétative <i>in-vitro</i> .....	19
2.1. Les bourgeons axillaires et culture de méristèmes..	19
2.2. Les pousses néoformées.....	19
2.3. Les embryons somatiques.....	20
3. Les étapes de la multiplication <i>in-vitro</i> .....	20
3.1. Initiation de la culture.....	20
3.2. Stade multiplication.....	20
3.3. Stade enracinement.....	21
3.4. Stade acclimatation et sortie en champ.....	21
4. Avantages de la micropropagation.....	21
5. Les limites de la méthodes <i>in-vitro</i> .....	22
B/. MATERIELS ET METHODES.	
1. Matériel végétal.....	23
2. La germination des graines.....	23
3. L'organogenèse.....	24
4. Les conditions de culture.....	24
5. Les milieux.....	24
5.1. Les protocoles.....	24
5.2. Composition des solutions de substances utilisées..	26
5.2.1. Composition des solutions de macroéléments.....	27
5.2.2. Composition des solutions de microéléments.....	28
5.2.3. Composition des solutions de vitamines.....	28
5.3. Les tableaux des milieux: les balances hormonales..	28
5.3.1. Tableau des milieux de la première série.....	29
5.3.2. Tableau des milieux de la deuxième série.....	30
5.3.3. Tableaux des milieux de la troisième série.....	31

C/. RESULTATS EXPERIMENTAUX.

1. Résultats de la première série.....	34
1.1. La caulogenèse.....	34
1.1.1. Effets milieux.....	34
1.1.2. Effets familles.....	36
1.2. La rhizogenèse.....	38
1.2.1. Le nombre de racines.....	38
1.2.1.1. Effets milieux.....	38
1.2.1.2. Effets familles.....	39
1.2.2. Les longueurs des racines.....	40
1.2.2.1. Effets milieux.....	40
1.2.2.2. Effets familles.....	41
2. Résultats de la deuxième série.....	43
3. Résultats de la troisième série.....	46
4. Acclimatation et sortie en champ.....	47
5. Tableau récapitulatif.....	48
D/. DISCUSSION-CONCLUSION.....	50
BIBLIOGRAPHIE.....	54

#### LISTE DES FIGURES DU TEXTE

- 1 = Effets milieux sur la croissance des vitroplants après deux mois de culture (*Acacia raddiana*).
- 2 = Effets familles sur la croissance des vitroplants après deux mois de culture (*Acacia raddiana*).
- 3 = Réponse des explants par milieu à la 2ème subculture après deux mois de culture (*Acacia raddiana*).
- 4 = Réponse des explants par famille à la 2ème subculture après deux mois de culture (*Acacia raddiana*).
- 5 = Taux de multiplication par famille après 6 mois de culture (*Acacia raddiana*).

#### LISTE DES PLANCHES DU TEXTE

- 1 = Carte de distribution géographique des *Acacia*.  
A. NONGONIERMA: Bulletin de l'IFAN. Tome 39, série A, n° 2.
- 2 = *Acacia raddiana*. J. BERHAUT: Flore Illustrée du Sénégal.  
Tome IV.
- 3 = Vitroplants d'*Acacia raddiana*: enraciné 1; non enraciné 2.
- 4 = Plantules d'*Acacia raddiana* en serre (sevrage).
- 5 = Plantes d'*Acacia raddiana* en champ.

## INDEX DES SIGLES ET ABREVIATIONS DU TEXTE

A.	:	Acacia
AIB	:	Acide Indole Butyrique
ANA	:	Acide Naphtalène Acétique
BAP	:	6-Benzylaminopurine
CA	:	Charbon actif
CMM	:	Comparaison des moyennes multiples
CRDI	:	Centre de Recherche pour le Développement International
DRPF	:	Direction de Recherche et de la Production Forestière
E.type	:	Ecart type
Enrac.	:	Enracinés
FeEDTA	:	Fer Ethylène Diamine Tétracétique Acide
GA3	:	Acide Gibbérellique
IFAN	:	Institut Fondamental d'Afrique Noire
ISRA	:	Institut Sénégalais de Recherche Agricole
Lg.m.	:	Longueur moyenne
Lg.max.	:	Longueur maximale
MVA	:	Mycorhizes à vésicules et à arbuscules
ORSTOM	:	L'Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération
PF	:	Pousses feuillées
Tx	:	Taux
WPM	:	Woody Plant Medium
Zéa.	:	Zéatine

## INTRODUCTION GENERALE:

Les arbres et les forêts interviennent dans le maintien des grands équilibres physiques et biologiques de notre planète. Or depuis quelques décennies, l'homme assiste à une disparition progressive de ces forêts surtout tropicales; disparition aux conséquences imprévisibles sur l'équilibre général de la biosphère. Le maintien ou la restauration de ces écosystèmes forestiers est une des grandes priorités écologiques actuelles.

En effet les écosystèmes forestiers sont représentés à 50% par les forêts tropicales (F. FOURNIER et A. SASSON, 1983). Ces forêts constituées d'arbres et d'arbustes sont une composante importante de bon nombre de systèmes agraires et peuvent apporter une contribution encore plus grande dans beaucoup de régions du monde. Elles jouent un rôle clé en aidant à stabiliser et à viabiliser la production agricole surtout dans les agrosystèmes fragiles. Des espèces pérennes bien enracinées peuvent aider à stabiliser les terres susceptibles d'être érodées par l'eau. Outre cette fonction de protection et selon les essences en cause, les arbres et les arbustes peuvent aussi aider à préserver la fertilité du sol par la fixation de l'azote et le recyclage des éléments nutritifs. Ils fournissent aussi un vaste éventail de produits comme des aliments pour l'homme et les animaux, des combustibles, des matériaux de construction, du paillis et des produits destinés à une transformation industrielle (C.R.D.I., 1990).

Le développement de ces forêts tropicales se fait encore largement à l'état sauvage et l'homme n'intervient la plupart du temps que pour leur exploitation en vue de satisfaire ses besoins. Ainsi les forêts couvrent des zones géographiques et écophysologiques très vastes et variées: climat froid, climats tempéré et méditerranéen, climats tropical humide et tropical sec (C. DORE, 1989).

Pour les forêts tropicales, nous distinguons les écosystèmes forestiers des zones humides de l'Amazonie, de l'archipel indo-malaisien et de l'Afrique équatoriale; les écosystèmes forestiers des zones sèches qui couvrent le Mexique, les zones méditerranéennes, les zones sahéliennes et soudaniennes d'Afrique (A.M. YUSOF and A.N. RAO, 1989). C'est cette dernière catégorie de forêts tropicales qui fait l'objet de notre attention au cours du présent travail.

L'équilibre de beaucoup de ces écosystèmes est très instable car on estime qu'environ 10 millions d'hectares de forêts disparaissent chaque année, surtout dans les zones sèches. L'avance actuelle du désert en Afrique vers le nord et surtout vers le sud est une réalité: on pense suivant les régions que depuis 10 ans le désert a avancé vers le sud de 50 à 100 kilomètres (A.M. YUSOF and A.N. RAO, 1989). Cette brusque accélération de la désertification en zones sahéliennes au cours des 30 dernières années est due à plusieurs causes.

## LES CAUSES.

Elles sont très multiples et diversifiées. Nous n'en relatons ici que l'essentiel.

### \* La fragilité de certains écosystèmes.

Une des causes premières de la disparition des forêts du pourtour méditerranéen, des forêts des zones sahéliennes et soudaniennes est la fragilité naturelle de ces écosystèmes (A.M. YUSOF and A.N. RAO, 1989) dont la moindre modification peut entraîner un déséquilibre grave et la difficulté de ces écosystèmes de revenir à l'état initial. Cette instabilité des écosystèmes méditerranéens et sahéliens tient à plusieurs facteurs: très longues périodes de sécheresse (9 à 10 mois) ou violence des précipitations et des vents, érosion intense et lessivage, caractéristiques physiques et chimiques des roches (P.L. Giffard, 1971).

### \* Les variations climatiques naturelles.

Les zones sahéliennes étaient au Würmien (période glaciaire du Quaternaire allant de 12000 à 7000 AV.J.C.) caractérisées par un climat tropical humide ayant entraîné la formation de grands lacs tels que le lac Tchad et le lac Niger. A partir de la zone sub-boréale (partie sud de l'hémisphère nord) le climat est devenu de plus en plus sec provoquant ainsi la disparition progressive de la végétation et de la faune. Actuellement les climats sahélien et soudanien sont caractérisés par des cycles de sécheresse pouvant durer plusieurs années. Par conséquent la disparition du couvert végétal dans les régions sahéliennes prend depuis quelques dizaines d'années des allures vertigineuses (A.M. YUSOF and A.N. RAO, 1989).

### \* Les facteurs socio-économiques.

Les progrès de la médecine, l'amélioration des conditions d'hygiène et d'alimentation ont entraîné une augmentation sensible du taux de croissance moyenne de la population humaine qui est passé de 5 à 30 pour mille les 30 dernières années (A.M. YUSOF and A.N. RAO, 1989). Le volume élevé et la croissance rapide des besoins en produits fournis par les arbres et les arbustes, les récentes années de sécheresse et l'utilisation quelques fois assez poussée du sol, ont entraîné un appauvrissement des peuplements végétaux autrefois denses et riches en espèces végétales. Ces ressources naturelles s'épuisent surtout là où les besoins sont les plus grands: alentours des points d'eau, des localités, des routes et des voies de transhumance du bétail. L'épuisement des ressources provoque l'exode de la population et la désertification (H.J. Von Maydell, 1983).

## LES REMEDES.

En fonction des besoins actuels et prévisibles de la population, les forestiers du Sahel ont pour mission de rétablir les fonctions indispensables de la forêt en collaboration étroite avec les services de développement en s'appuyant sur une recherche appliquée proche de la pratique. Pour satisfaire les besoins, les forestiers doivent assurer qu'il y ait toujours assez d'arbres et d'arbustes, que ceux-ci fournissent un rendement aussi élevé que possible en quantité et en qualité et que leurs produits soient disponibles dans les meilleures conditions grâce à un aménagement rationnel (H.J. Von Maydell, 1983). Certaines dispositions peuvent être prises parmi lesquelles (A.M. YUSOF and A.N. RAO, 1989):

- \* L'amélioration des pratiques culturelles qui réduisent systématiquement l'environnement forestier.
- \* La réduction de la demande en bois pour la cuisson des aliments par l'utilisation des foyers améliorés, du gaz et du pétrole.
- \* Augmentation de la ressource en bois par des reboisements intensifs.
- \* Des techniques de production de plants en pépinières artisanales et en pépinières industrielles doivent être vulgarisées.
- \* Privilégier les recherches sur les espèces particulières bien adaptées aux conditions climatiques difficiles telles que les espèces des genres *Leucaena*, *Prosopis*, *Cassia*, *Albizzia*, et *Acacia*.

## LES OBJECTIFS.

Le présent travail portant sur le clonage *in-vitro* d'*Acacia raddiana* (Savi), est une contribution à la recherche des remèdes en vue de la reforestation des zones tropicales sèches. A partir d'individus juvéniles âgés de 21 jours, nous tenterons d'une part d'étudier les conditions physiques et chimiques favorables à l'obtention de vitroplants, d'autre part de déterminer le degré d'influence de la variabilité génétique de cette espèce, et enfin d'obtenir un certain nombre de clones qui seront expérimentés sur le terrain pour une sélection des génotypes dont les descendances seraient jugées intéressantes pour le reboisement.

Après une étude bibliographique sur la systématique et la biologie de l'espèce, et sur les techniques de culture *in-vitro*, nous présenterons les expériences entreprises et les résultats obtenus à la suite des manipulations.

## A./ ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.

### I. Choix de l'*Acacia raddiana* (Savi).

Les Légumineuses arborescentes constituent une ressource extraordinaire d'énergie et de bois et jouent de multiples rôles: protection et stabilisation des sols, meilleure économie de l'eau fixation symbiotique de l'azote atmosphérique, fourniture de bois à usage domestique, ombrage pour le bétail et fourniture de produits divers comme la gomme arabique, le fourrage pour les animaux et enfin certaines protéines ou matières grasses pour l'alimentation humaine (A.M. YUSOF and A.N. RAO, 1989).

L'*Acacia raddiana* (Savi), espèce à croissance rapide et à large répartition, offre l'avantage de couvrir des biotopes à climat tropical sec (Sahel, sud du Sahara), des biotopes à climat saharien (nord du Sahara) ainsi que des milieux sous influence méditerranéenne. *Acacia raddiana* constitue ainsi un modèle intéressant pour l'étude de la variabilité génétique et des mécanismes d'adaptation à l'aridité et aux autres contraintes (facteurs anthropiques) le long d'un gradient climatique. Cette espèce présente un intérêt économique certain: espèce fourragère, source d'énergie et surtout résistante à la sécheresse, donc utilisable dans des opérations de régénération des systèmes dégradés (Groupe d'Etude de l'Arbre, 1990).

#### 1. Taxonomie et description de l'espèce.

*Acacia raddiana* appartient à la famille des Mimosacées et au genre *Acacia* qui se distinguent des autres familles et genres par un certain nombre de caractères.

##### 1.1. Identification des Mimosacées.

La famille des Mimosacées se reconnaît facilement entre autres caractères, par les feuilles composées bipennées qui le plus souvent sont constituées de petites folioles qui donnent au feuillage un aspect gracile. Les Mimosacées sont très abondamment représentées sous les climats à saison sèche depuis les forêts denses plus ou moins caducifoliées jusqu'aux steppes à épineux en passant par toute la gamme des forêts claires et des savanes boisées (A. AUBREVILLE, 1950).

### 1.2. Identification des Acacias.

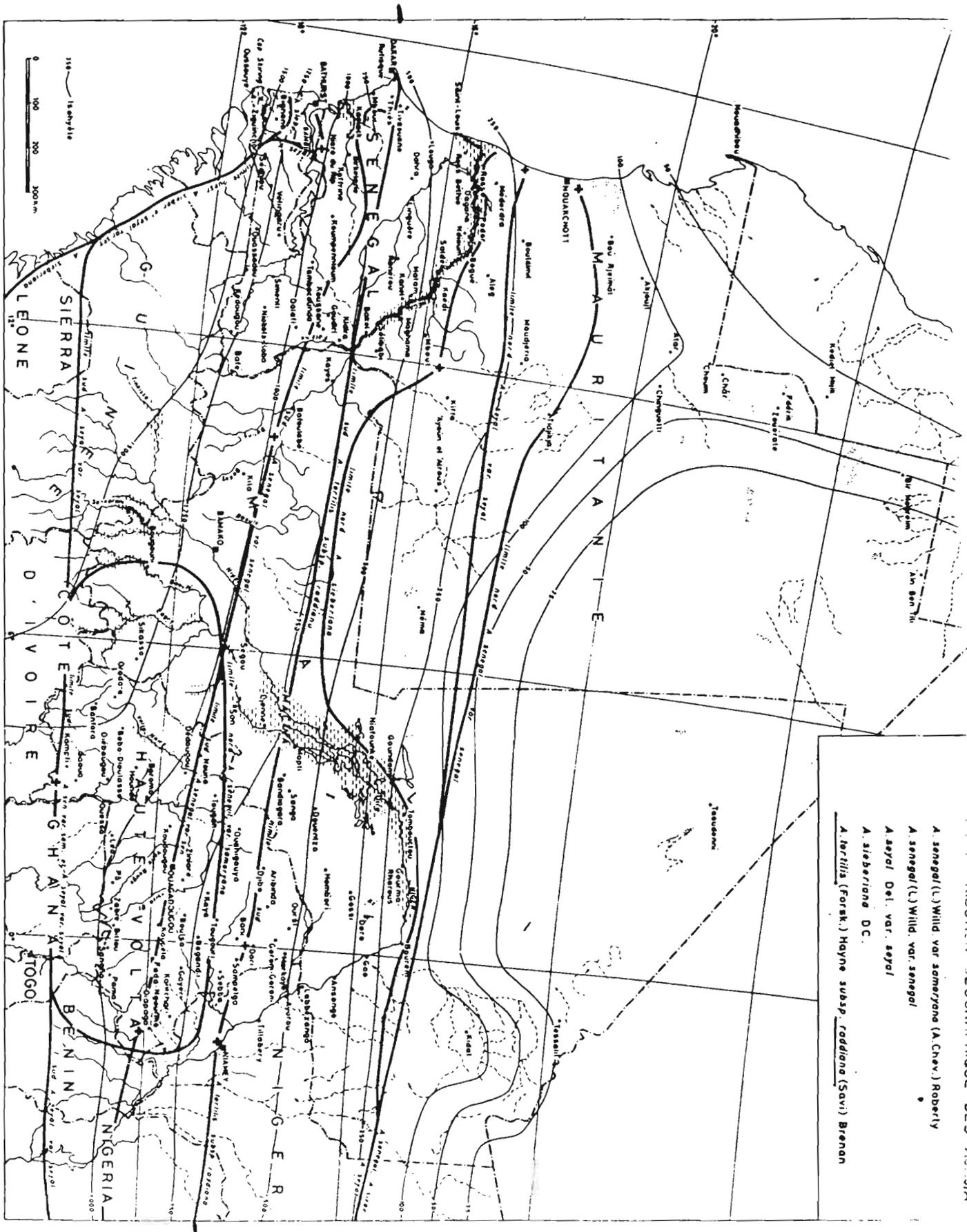
Le genre *Acacia* est un grand genre comprenant 1200 espèces largement dispersées en régions tropicales et subtropicales. Le genre est particulièrement bien représenté en Australie, en Amérique du sud, en Asie et en Afrique. Certains biotopes arides d'Afrique ne comportent souvent que des espèces d'*Acacia* (P.J. GATES and K. BROWN). On dénombre au moins 24 espèces d'*Acacia* du Sénégal à la République Centre-Africaine. Ce sont toutes des espèces d'arbres, arbrisseaux, arbustes, lianes habitant les régions à longue ou très longue saison sèche.

Le genre se distingue par ses fleurs en boules ou en épis (jaunes, blanches ou rosées). Lobes du calice égaux, valvaires; étamines en nombre indéfini. Les fruits permettent une identification plus nette des espèces d'Acacias. Il en existe une grande variété depuis des fruits plats, légers, à couleur et à consistance de paille, jusqu'aux fruits épais, lourds, coriaces, voire sub-ligneux à maturité tels *A. sieberiana* et *A. scorpioides*.

### 1.3. Répartition géographique de l'espèce.

Les Acacias habitent les régions sèches. Ils ont cependant des exigences écologiques assez précises. *Acacia raddiana* (Savi) se rencontre en pays sahéliens pré-désertiques sur les sables et les dunes fixées. Il constitue en grande partie la végétation ligneuse grégaire des étendues subdésertiques, soit concentré le long des lignes de drainage et des Ouaidis, soit diffus sur les hamadas, les ergs morts et les larges vallées. Il traverse le Sahara et on le rencontre au sud marocain et tunisien. L'exemplaire le plus célèbre de l'espèce est "l'Arbre du Ténéré" au Niger, seul arbre marqué autrefois sur les cartes du monde, et qui se trouve actuellement au Musée de l'IFAN à Niamey (H.J. Von MAYDELL, 1983). Il est aussi répandu depuis les contreforts méridionaux de l'Atlas saharien, du sud marocain (Tindouf) au sud tunisien (Bled Talha vers Gafsa) jusqu'au Sahel de l'Afrique occidentale et centrale. Il peuple donc les deux rives latitudinales du Sahara. On le trouve encore en plein Sahara occidental (Bir Moghreïn), central (Hoggar), méridional (Aïr Ennedi). Il est très abondant dans le Sahel sénégalais et soudanais formant des peuplements clairs très étendus sur les sables, sur tous les ergs morts du Cayor sénégalais au Manga nigérien, sur les dunes bordières du Tchad. On le trouve encore entre Arada et Blitine et dans le Kanem entre le 13° et le 14° parallèles (planche 1). On le trouve également plus à l'Est au Soudan Anglo-Egyptien (Halfa, Arabie, Seyal) et dans les pays nilotiques (A. AUBREVILLE, 1950).

**Planche 1:** Carte de distribution géographique des Acacia.  
 A. NONGONIERMA: Bulletin de l'IFAN. Tome 39, série A, n°2.



CARTE 4.

### 1.3.1. Stations.

*Acacia raddiana* (Savi) forme des peuplements purs, clairs sur des glacis, des sols érodés par le vent ou l'eau, la pierraille ou les éboulis latéritiques; souvent sur des sols ferrugineux, sableux, occasionnellement sur les sols alcalins profonds, sur les limons sableux, occasionnellement sur les dunes fossiles. Il ne tolère aucune inondation, évite les dunes récentes, aime les bords des points d'eau temporaires ou permanents et le voisinage des puits. Espèce particulièrement résistante à la sécheresse, poussant avec des pluies annuelles de 50 à 1000 mm, malgré de longues périodes de sécheresse et des températures diurnes très élevées, et nocturnes descendant jusqu'à 0° C. Il forme souvent avec *A. ehrenbergiana* la limite des arbres au bord du désert (H.J. Von MAYDELL, 1983).

### 1.3.2. Multiplication et culture.

Essence pionnière se régénérant très bien par rejets de souche ou graines. On compte en moyenne 14500 graines par Kg, à traiter avant le semis pour améliorer la germination. Elles se conservent normalement longtemps mais doivent être préservées des insectes. Suivant la station la croissance initiale est lente. Sur celles qui sont favorables et suivant l'origine génétique, on obtient une accélération notable. Sur les sols superficiels on choisira des écartements suffisants (au moins 10 m) à cause de la concurrence des racines qui s'exerce même aux dépens des cultures et arbres voisins. Les mauvaises herbes doivent être arrachées. Sans protection, les jeunes plants souffrent beaucoup du bétail. Aussi faut-il les protéger pendant au moins 3 ans (5 ans c'est mieux!) (H.J. Von MAYDELL, 1983).

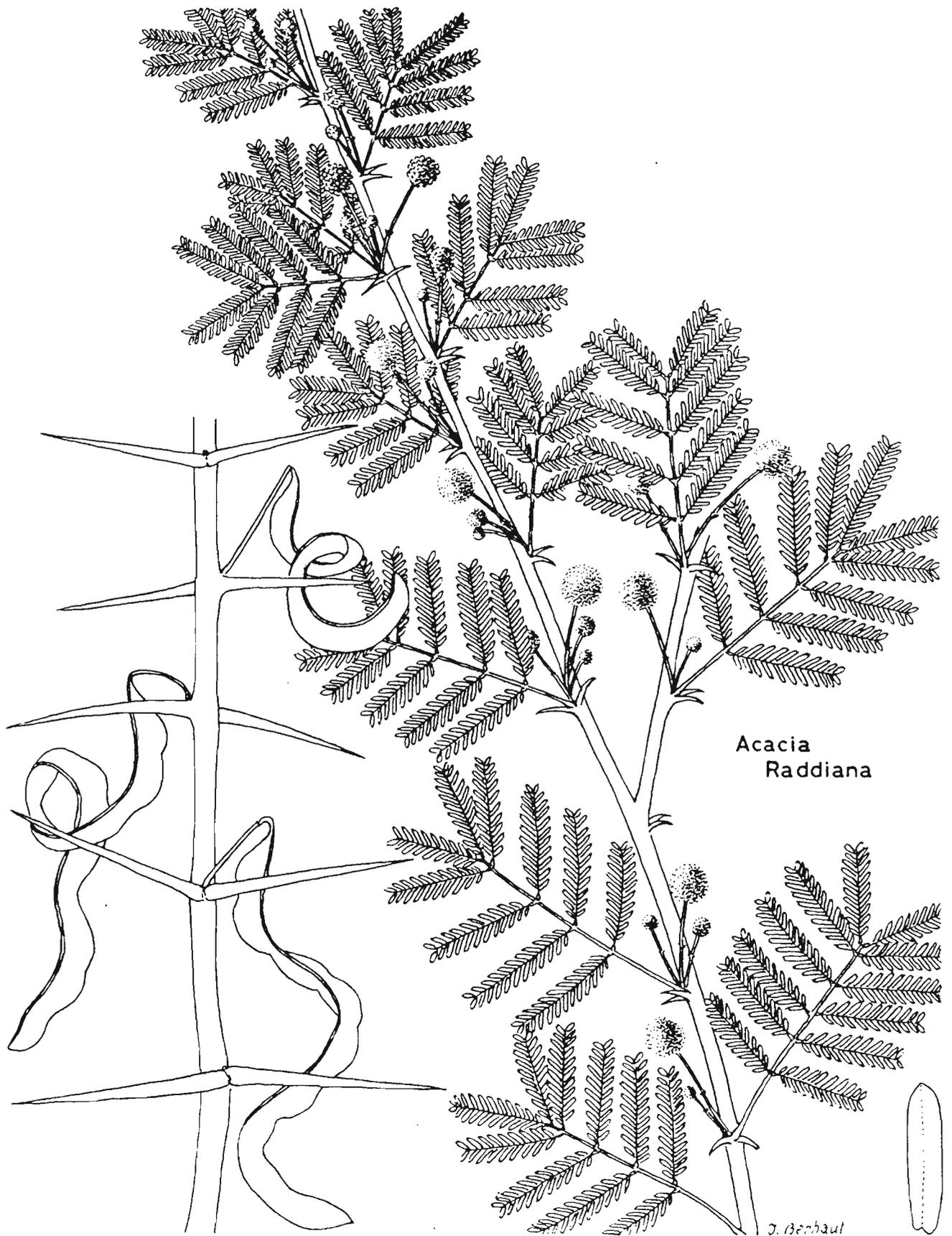
### 1.4. Morphologie et caractères botaniques.

*Acacia raddiana* (Savi) ou *Acacia fasciculata* ou *Acacia tortilis* est appelé *Seing* en Ouolof, *Sayélé* ou *Zadié* en Bambara-Malinké.

Avec une hauteur de 8 à 10 m, *Acacia raddiana* est considéré comme un grand arbre saharo-sahélien par A. AUBREVILLE (1950) alors que J. BERHAUT (1975) le considère comme un petit arbre épineux. Dans tous les cas, il possède une cime arrondie ou irrégulière. L'écorce est d'un jaune rougeâtre ou d'un brun foncé.

*Acacia raddiana* appartient au groupe des espèces à longues épines droites (A. AUBREVILLE). En effet, à la base du pétiole, deux épines jumelées, parfois courtes et légèrement courbes, parfois droites, acérées, blanchâtres, longues de 2 à 5 cm (J. BERHAUT).

**Planche 2:** *Acacia raddiana*. J. BERHAUT: Flore Illustrée du Sénégal. Tome IV.



Les feuilles sont bipennes, alternes, vert foncé (H.J. Von MAYDELL, 1983); elles possèdent un pétiole de 10 à 15 mm de long et portant parfois une glande dessus avant la première paire de pinnules. Le rachis est long de 4 à 6 cm et porte 3 à 4 paires de pinnules longues de 3 à 4 cm, les 2 terminales très rapprochées, les autres distantes de 10 mm environ. Les pinnules portent une dizaine de paires de folioles longues de 3 à 4 mm, celles de la base et du sommet étant plus petites. Ces folioles sont glabres (J. BERHAUT, 1975).

Les fleurs blanc crème sont en capitules sphériques de 7 à 10 mm au sommet d'un pédoncule long de 15 à 30 mm. Une courte bractée se situe vers le milieu ou dans le tiers inférieur du pédoncule. Les pédoncules peuvent être groupés par 2 ou 3 à l'aisselle des feuilles (J. BERHAUT, 1975).

Les fruits sont des gousses plates, typiquement spiralées longues de 8 à 13 cm, larges de 6 à 8 mm, vertes dans la jeunesse et brun clair à maturité (planche 2). Elles contiennent 10 à 12 graines brunes, ovales avec sur les 2 côtés larges une concavité ovale foncée (H.J. Von MAYDELL, 1983 et J. BERHAUT, 1975).

## 2. Les associations symbiotiques.

Les associations symbiotiques réalisées par *Acacia raddiana* avec les micro-organismes sont de deux types: d'une part les rhizobium, et d'autre part les mycorhizes (F. CORNET, 1982).

### 2.1. Les rhizobium.

Les rhizobium sont des bactéries susceptibles de fixer l'azote atmosphérique (N<sub>2</sub>) lorsqu'elles vivent en symbiose avec une Légumineuse. Le siège de cette symbiose se trouve au niveau des excroissances portées par le système racinaire: les nodules.

Très peu de travaux et de documents existent sur les associations symbiotiques d'*Acacia raddiana*. F. CORNET en 1982 au cours de ses recherches préliminaires sur la symbiose d'*Acacia raddiana* et d'*Acacia holosericea*, signale dans son rapport qu'*Acacia raddiana* est nodulé par des souches de bactéries à croissance rapide telles que les souches ORS 911, 920, 922, 926, 927, 928, 929, 930. Ces souches permettent d'obtenir des gains de croissance significative de la plante par rapport aux témoins. Ce gain peut atteindre 147% pour la souche ORS 928. Il signale également que la plupart des souches sont en outre responsables d'une augmentation significative des teneurs totales en quantité d'azote.

## 2.2. Les mycorhizes.

Les mycorhizes sont des organes complexes résultant de l'association intime d'une racine et d'un champignon qui réalisent ensemble une symbiose (Y.D. DOMMERGUE et MANGENOT, 1970 cités par F. CORNET). Leur fonction principale est d'améliorer la nutrition phosphatée des végétaux grâce à une meilleure exploitation du phosphore du sol, mais elles peuvent aussi favoriser l'absorption d'autres éléments minéraux ou augmenter la résistance des plantes aux maladies ou à la transplantation.

F. CORNET (1982) a mis en évidence la symbiose entre les mycorhizes à vésicules et à arbuscules (MVA) et *Acacia raddiana* par inoculation de *Glomus moseae* sur un sol déficient en phosphore tel que le sol Deck (dans la région du fleuve Sénégal). Ces expériences, affirme F. CORNET, ont permis d'obtenir une augmentation de production de 340% de matière sèche dans les parties aériennes de la plante. La teneur totale en phosphore de la plante est notamment augmentée de façon spectaculaire (+1040%) par le traitement *Glomus moseae*. Ainsi la nutrition minérale d'*Acacia raddiana* semble donc dépendante de l'endomycorhization (F. CORNET).

MUNNS, 1977, cité par F. CORNET, reconnaît qu'une déficience en phosphore peut limiter la nodulation et la fixation symbiotique d'azote chez le *raddiana*. En outre, F. CORNET découvre en 1982 que sur un sol déficient en azote et phosphore (sol de la région de Kébémér au Sénégal) l'inoculation d'*Acacia raddiana* avec rhizobium et mycorhize à vésicules et à arbuscules (MVA) stimule la croissance jusqu'à 160%.

## 3. Les propriétés d'*Acacia raddiana*.

Parmi 228 espèces d'arbres testées dans les régions semi arides du Rajasthan en Inde, *Acacia raddiana* s'est avéré au bout de 15 ans être de loin le meilleur fournisseur de combustibles, de bois d'oeuvre et de fourrage. Exploité en révolution décennale, les arbres donnent de 80 à 100 kg de bois de feu par pied. Cette espèce fournit un matériau de construction sous forme de piquets et perches; les branches épineuses sont utilisées dans les clôtures; aux Indes, l'espèce a fait ses preuves à grande échelle pour consolider les dunes (H.J. Von MAYDELL, 1983).

Les feuilles pilées avec le haricot du *Vigna sinensis* sont utilisées en emplâtre dans le traitement des oedèmes et des dermatoses allergiques.

Les jeunes branches surtout quand elles sont chargées de fruits, sont appréciées du bétail: les moutons, les chèvres et surtout les chameaux les broutent. On prétend que les feuilles fortifient particulièrement les chameaux. Les gousses ont une haute valeur nutritive: 1 kg de gousses sèches équivaut à 1.02 U.F.

Les écorces contiennent une grande quantité de tanins. On les utilise comme vermifuge. On les réduit aussi en poudre et on saupoudre le corps dans les maladies de la peau.

Le liber donne des liens.

Le bois dur donne un excellent charbon (4360 kcal par kg).

La racine sert à faire les manches de lance (J. BERHAUT, 1975).

Le système racinaire est à la fois traçant et pivotant et stabilise très bien les sols dunaires (ROY, KAUL, et GYANCHAUD, 1973; cités par F. CORNET, 1982).

#### 4. Conclusion.

L'*Acacia raddiana* s'avère être une espèce végétale de très grande importance à plusieurs points de vue:

Son adaptation aux conditions climatiques arides et sa croissance relativement rapide font de cette espèce un matériel de choix dans la lutte contre la désertification.

Son aptitude à fixer l'azote atmosphérique est un facteur d'enrichissement du sol où cette espèce est installée.

Elle produit un fourrage apprécié par les animaux qui y trouvent une valeur nutritive élevée.

Elle est utilisée par l'homme comme combustible de qualité et dans le traitement de nombreuses maladies.

Ces éléments montrent que *A. raddiana* pouvait avoir une bonne place dans l'installation de systèmes agro sylvo pastoraux destinés à réhabiliter les terres sahéennes déperdues: d'où la nécessité pour l'homme "d'appriivoiser" cette espèce et de favoriser sa propagation par diverses méthodes!

## II. La culture *in-vitro*.

### 1. Introduction et historique.

Depuis plusieurs années déjà on tend à associer aux méthodes classiques de multiplication des végétaux, les techniques de culture *in-vitro* pour la propagation des espèces présentant des caractères agronomiques intéressants (DUHOUX et DAVIES).

En 1902 des cellules de racines végétales ont été maintenues en culture. Grâce à la découverte de l'auxine en 1935, des cellules de tabac et de carotte furent cultivées de façon indéfinie en 1939. La découverte de la kinétine en 1957 fit faire de nouveaux progrès essentiels aux techniques de multiplication *in-vitro*. En 1977 GRUMMER pouvait écrire "les arbres en tubes" sont une réalité mais pas encore une pratique. A l'heure actuelle c'est une pratique (C. DORE 1989). Ainsi chez les arbres tropicaux en général et chez les espèces appartenant au groupe des Légumineuses en particulier seules quelques espèces ont pu faire l'objet de cultures *in-vitro*.

Parmi les exemples assez nombreux nous pouvons citer: la micropropagation de l'*Acacia albida* adulte (GASSAMA et DUHOUX, 1986), les régénérations obtenues à la suite d'organogenèse de cal de tige d'*Acacia koa* (SKOLMEN et MAPES, 1976), d'*Albizzia falcataria* (CRIZALDO, 1980), ou d'embryogenèse somatique d'*Albizzia lebbeck* (GHARYAL et MAHESHWARI, 1981), ou enfin de microbouturages de jeunes tiges d'*Acacia nilotica* (MATHUR et CHANDRA, 1983) de *Prosopis cineraria* (GOYAL et ARYA, 1984). A cette liste de travaux déjà satisfaisante, nous ajoutons notre contribution par l'étude des voies de clonage d'*Acacia raddiana* à partir d'individus juvéniles.

## **2. La multiplication végétative *in-vitro*.**

La multiplication *in-vitro* des plantes, communément appelée "micropropagation", consiste à reproduire un type parental donné, à partir d'un fragment plus ou moins grand de ce végétal. Ce procédé nécessite des conditions de culture spéciales (milieu physico-chimique). Aujourd'hui, le vocable "multiplication *in-vitro*" recouvre le plus souvent, la seule multiplication d'individus intéressants. Celle-ci se réalise essentiellement par une prolifération abondante mais contrôlée, de bourgeons préexistants. Dans la pratique, plus de 90% des plantes produites relèvent de ce type de multiplication. Le restant de la production provient de bourgeons néoformés, issus de tissus, de cal ou de cellules mises en culture (P. BOXUS, 1989).

### **2.1. Les bourgeons axillaires et culture de méristèmes.**

C'est la voie la plus utilisée. Le développement des bourgeons de l'explant mis en culture est réactivé par la suppression de la dominance apicale et autres corrélations liées aux autres organes, et grâce à une modification de la balance hormonale en faveur des cytokinines. Le risque d'obtention des copies non conformes est très faible car les tissus, qui sont à l'origine de la prolifération des bourgeons, sont des méristèmes préexistants (pas de phase de dédifférenciation).

### **2.2. Les pousses néoformées.**

Cette néoformation peut intervenir directement sur l'explant mis en culture (feuille, tige, bouton floral). Dans d'autres cas la morphogenèse est indirecte et les bourgeons sont induits sur cal. Cette voie est moins sûre du point de vue stabilité génétique car les divisions cellulaires au niveau des cals présentent parfois des erreurs de copies. Exemple: aneuploïdisation, polyploïdisation. Elle fait intervenir une dédifférenciation des cellules des fleurs, feuilles, tiges, racines et fournit des méristèmes caulinares.

### **2.3. Les embryons somatiques.**

Les embryons se développent directement sur l'explant ou le plus souvent après passage par une structure cal. Les embryons somatiques se développent alors sur le cal ou bien à partir de suspensions cellulaires dans lesquelles s'organisent ces embryons qui en se développant donneront naissance à de jeunes plantules. Cette technique à haut rendement potentiel sert à la production de graines synthétiques, technologie prometteuse si l'on peut maintenir la variabilité, induite par le cal ou les divisions cellulaires, dans des limites strictes.

### **3. Les étapes de la multiplication *in-vitro*.**

#### **3.1. Initiation de la culture.**

Après repérage d'individus intéressants (travaux agronomiques ou moyennes biochimiques), les pieds-mères ou les explants sont éventuellement traités pour les rendre réactifs en cas de dormance. Ensuite ils sont stérilisés par trempage dans une solution telle que l'hypochlorite. Dans certains cas la désinfection est très difficile. On peut alors fixer le matériel par bouture ou greffe et le maintenir pendant quelques mois en serre en conditions très sèches, sans jamais mouiller feuillage et bourgeons (DEBERGH et MAENE, 1981).

Chez les ligneux, il y a souvent des problèmes de retour d'arbres matures à l'état jeune. Les travaux de FRANCKET (1987) à l'Afocel en France ont développé des techniques de juvénalisation, par tailles, minigreffes en cascades, recépage, traitement cytokiniques. Exemple: par microgreffes en cascades, réalisés *in-vitro*, MISSION (1984) obtient rapidement le retour au stade juvénile de Thuyas âgés de plus de cent ans.

Le choix de l'explant et sa dimension sont importants, notamment dans le but d'obtenir des cultures exemptes de parasites (maladies vasculaires, nématodes ou viroses). Des méristèmes apicaux de 0.1 à 0.3 mm permettent l'élimination de beaucoup de viroses, mais cela dépend de l'espèce et du virus à éliminer (BOXUS, 1989).

#### **3.2. Stade multiplication.**

La prolifération de bourgeons axillaires peut être régulée par la présence de cytokinines telles que la kinétine, le 2-isopentyl adenine (2ip), la benzylaminopurine (BAP), la zéatine. Le taux moyen de développement des axillaires est de 4 à 5 par mois voire plus en fonction des espèces. Après 4 semaines, les bourgeons formés sont divisés et replacés sur un milieu neuf pour poursuivre la multiplication (P. BOXUS, 1989).

Pour augmenter le taux de multiplication des espèces difficiles, certains auteurs préconisent le système de deux phases c'est-à-dire l'apport d'un milieu liquide, après quelques jours de culture, ou en fin de cycle de multiplication. Cette technique, développée notamment par VISEUR (1987), augmente le taux de multiplication et favorise l'allongement.

### **3.3. Stade enracinement.**

Ce stade est parfois réalisé directement hors culture stérile. C'est le cas pour beaucoup de plantes vertes. Par contre ce stade se déroule *in-vitro* pour les espèces à enracinement difficile comme les ligneux par exemple. L'emploi d'une balance hormonale riche en auxine est requise.

Il faut distinguer la phase d'induction de celle d'initiation et de croissance des racines. Chacune d'elles requiert des conditions particulières. Pour la phase d'induction, un traitement à l'obscurité de 5 à 7 jours améliore le taux de plantes enracinées. La qualité de l'enracinement de beaucoup de ligneux dépend de la présence simultanée d'auxines (AIB) 1 ou 2 mg/l par exemple), mais aussi de proline (10 à 100 mg/l) pour augmenter le nombre de racines, et de riboflavine (1 mg/l) pour prévenir ou diminuer la présence de cals (DRUART, 1987).

### **3.4. Stade acclimatation et sortie en champ.**

Au moment du passage en conditions de culture autotrophe, il faut habituer les plantules progressivement aux conditions de sécheresse de l'atmosphère. En effet, la saturation de l'air des tubes de culture *in-vitro* conduit à des morphologies épidermiques différentes, caractérisées par un mauvais fonctionnement des stomates et l'absence de couche cireuse épicuticulaire. Ces conditions entraînent une perte de turgescence très rapide au moment du transfert en conditions horticoles. C'est pourquoi dès le transfert, les plantules sont maintenues en atmosphère confinée sous boîtes plastiques pour éviter leur dessiccation. Cette phase d'acclimatation peut durer de 2 à 4 semaines.

## **4. Avantages de la micropropagation.**

La miniaturisation du matériel *in-vitro* et la rapidité du procédé de multiplication entraînent:

Un besoin en matériel de départ extrêmement restreint. Quelques bourgeons sont le plus souvent suffisants.

Une surface de culture minime. Chaque année chaque mètre carré (m<sup>2</sup>) de tablette peut produire plus de 25 000 arbres ou plus de 50 000 fraisiers enracinés.

Une qualité sanitaire optimale tout au long de la culture.

Un taux de multiplication de 4 par mois dans les meilleurs cas, c'est-à-dire une production annuelle potentielle de plusieurs millions d'individus.

Une production échelonnée sur toute l'année grâce au stockage au zéro végétatif de l'espèce à l'obscurité pendant 4 à 6 mois des plantules à quelque stade de développement qu'elles soient. Pour les espèces tropicales des températures de 8 à 10°C ou plus peuvent être utilisées.

Création d'une banque de collection clonale sous la forme d'une ou plusieurs plantules maintenues le plus souvent à l'obscurité pour une durée de 3 à 5 ans sans soins particuliers dans des tubes de 75 X 16 mm (DRUART, 1985).

Les propriétés de juvénalisation des techniques de micropropagation entraînent:

La possibilité d'enraciner des espèces rebelles au bouturage classique: c'est le cas des cultivars de Pommiers et Poiriers qui ne peuvent être bouturés mais s'enracinent très bien *in-vitro*, permettant d'obtenir des arbres auto-enracinés (P. BOXUS, 1986).

##### 5. Les limites de la méthode *in-vitro*.

La micropropagation demande certaines précautions si on veut en exploiter les possibilités au maximum: la stérilité, une balance hormonale appropriée, le choix de l'explant (méristème ou apex caulinaire). Dans l'état actuel des connaissances la régénération de bourgeons à partir de cellules de cals doit être évitée, car elle conduit trop souvent à des phénomènes d'organisations anormales provenant de divisions mitotiques anormales: aneuploïdisation, polyploïdisation. La physiologie du plant *in-vitro* reste encore très peu connue. Le rôle du tube sur les échanges gazeux, eau, CO<sub>2</sub> et éthylène semble varier d'une espèce à l'autre, d'un stade à l'autre. La nutrition carbonée, glucose ou saccharose est peu connue. Pour beaucoup d'auteurs, les plantes *in-vitro* ne sont pas capables de photosynthèse. L'absence de transpiration, due à l'atmosphère saturée des tubes, modifie le métabolisme de l'eau de fond en comble. Les plantules quoiqu'en grand nombre sont initialement de petite taille et fragiles.

## B./ MATERIELS ET METHODES.

### 1. Matériel végétal.

Selon la littérature, la multiplication *in-vitro* de la plupart des essences forestières se fait à partir de génotypes jeunes ou très jeunes: semis, graines (D. CORNU et M. BOULAY, 1986). Notre matériel de base est constitué de graines d'*Acacia raddiana* (Savi) qui sont gracieusement mises à notre disposition par la Direction de Recherche et de Production Forestière (D.R.P.F.) et l'Institut Sénégalais de Recherche Agricole (I.S.R.A.). Les graines ont été récoltées dans les localités de Dahra et Souilène (au Sénégal) entre 1986 et 1989. Nous avons utilisé au cours de ces expériences 10 familles de graines qui sont les suivantes: 86/0835 récoltée en 1986 dans la localité de Souilène; 88/2193, 88/2194, 88/2196, 88/2197 prélevées en 1988 sur différents pieds à Dahra; et les familles 89/2496, 89/2498, 89/2501, 89/2502, 89/2503 également originaires de Dahra, sont récoltées en 1989. Nous désignons sous le nom de famille l'ensemble des graines issues d'un même pied-mère, ou plus simplement toutes les graines qui sont des demi-frères.

Les graines utilisées et les microboutures provenant de la germination de ces graines sont réparties au hasard sur les milieux. Afin de suivre l'évolution des différents génotypes dans le temps, chaque graine ou microbouture est identifiée sur un milieu donné par une marque appropriée rendant compte de ses origines. Exemple 86/0835-16 = clone n° 16 de la famille 86/0835.

Le milieu de culture contenant une source de carbone (saccharose en général), il est nécessaire de débarrasser l'organe mis en culture de la flore bactérienne et fongique qui lui est associée (D. CORNU et M. BOULAY, 1986). Ainsi la scarification et la stérilisation des graines ont été réalisées par trempage dans un bain d'acide sulfurique pur (95%) pendant 1 heure à la température ambiante. Elles sont ensuite rincées à l'eau distillée et stérile à 5 reprises. Au dernier rinçage, les graines sont laissées en trempage dans l'eau stérile pendant 30 minutes. Elles sont mises à germer dans des tubes sur le milieu gélosé de MURASHIGE et SKOOG dépourvu d'hormones.

### 2. La germination des graines.

Les graines en culture *in-vitro* germent au bout de 4 à 7 jours. Les plantules se développent en tube pendant 3 semaines et atteignent 2 à 8 cm de hauteur. Les plantules sont ensuite reprises et, après ablation des feuilles et des racines, elles sont coupées dans les conditions stériles sous la hotte en fragments comportant 1 à 2 noeuds. Les explants ainsi obtenus sont répartis sur les milieux expérimentaux.

### 3. L'organogenèse.

Environ 15 jours après la mise en culture, la reprise d'activité des microboutures devient plus nette et se manifeste par le débourement axillaire chez les explants. A la fréquence d'une ou deux fois par mois suivant les manipulations nous mesurons la morphogenèse: l'apparition et l'élongation des pousses axillaires (la caulogenèse); l'apparition, le nombre et la longueur des racines (la rhizogenèse); le développement de cal (la callogenèse); la couleur des plantules. Les mesures des facteurs à analyser sont arrêtées deux mois à compter de la date de la mise en culture. Le matériel végétal utilisé étant assez hétérogène (familles différentes), et les manifestations de l'organogenèse étant également complexe, les résultats enregistrés sont systématiquement soumis à des tests statistiques notamment la méthode de comparaison des moyennes multiples "multiple range analysis" qui utilise les intervalles de confiance au seuil de 95%.

### 4. Les conditions de cultures.

Les manipulations en conditions d'aseptie sont effectuées sous la hotte à flux laminaire d'air stérile classe 100 U.S. Les cultures sont réalisées dans des tubes en verre de 23 X 150 mm placés dans des portoirs. Chaque tube est fermé avec un capuchon de polycarbonate mais non scellé. Les cultures sont entreposées dans une salle climatique destinée à stabiliser l'environnement (O. MONTEUUIS - M.C. BON, 1985).

L'éclairage programmé de 14 heures par jour est assuré par 36 tubes fluorescents (F58T8D lumière du jour) placés à 0.5m et latéralement par rapport aux cultures. La température, théoriquement fixée à 26°C plus ou moins 1°C, variait entre 25° et 32°C pour une hygrométrie de 40 à 70%.

### 5. Les milieux.

#### 5.1. Les protocoles.

Les milieux de base utilisés contiennent les éléments minéraux suivants:

- Les macroéléments de MURASHIGE et SKOOG (MS) 1962,
- Les macroéléments WPM (1980),
- Les microéléments de HELLER (1953-1955),
- Le Fer Ethylène Diamine Tétracétylène Acide (FeEDTA).

Les éléments suivants sont associés selon les milieux.

- Les vitamines de MOREL (1948),
- Les vitamines de MURASHIGE et SKOOG (1962),
- Les vitamines de NITSCH et NITSCH (1965),
- Le saccharose à raison de 20 ou 30 g par litre.

Les milieux sont ensuite différenciés par apport de diverses hormones végétales notamment:

- Les cytokinines: la Benzylaminopurine (BAP), la Kinétine, la Zéatine\*;
- Les auxines: l'Acide B-indole butyrique (AIB), l'Acide Naphtalène Acétique (ANA), l'Acide Gibbérellique (GA3).

Le PH des milieux est ajusté à 5.8 avant d'ajouter l'agar (SIGMA) à 0.8%, et éventuellement du charbon actif à 0.1%.

Chaque milieu est chauffé aux micro-ondes (10 min. par litre de milieu) pour fondre la gélose, puis réparti dans les tubes (23 X 150 mm) à l'aide d'un distributeur automatique à raison de 18 ml par tube. Les tubes sont fermés avec des bouchons plastiques et les milieux sont enfin stérilisés en tubes à l'autoclave à 110°C pendant 20 min.

---

\*Les milieux devant contenir de la zéatine (substance thermolabile) sont d'abord stérilisés en flacon puis la zéatine y est ajoutée par filtration stérilisante sous la hotte. Ces milieux sont alors répartis en tubes dans les conditions strictement stériles (tubes et distributeur stériles).

## 5.2. Compositions des solutions de substances utilisées.

### 5.2.1. Tableau n°1: Composition des solutions de macroéléments.

	M. mg/l	S. mM/l	W. P. mg/l	M. mM/l
KNO3	1900	18.793	0	0
NH4NO3	1650	20.612	400	4.997
CaCl2.2H2O	440	2.992	96	0.653
MgSO4.7H2O	370	1.501	370	1.501
KH2PO4	170	1.249	170	1.249
Ca(NO3)2.4H2O	0	0	556	2.354
K2SO4	0	0	990	5.681

5.2.2. Tableau n°2: composition des solutions de microéléments.

	M. S.		HELLER	
	mg/l	µM/l	mg/l	µM/l
KI	0.83	5	0.01	0.06
MnSO4.4H2O	22.3	99.9	0.1	0.4
ZnSO4.7H2O	8.6	29.9	1	3.4
H3BO3	6.2	100.2	1	16.1
Na2MoO4.2H2O	0.25	1	0	0
CuSO4.5H2O	0.025	0.1	0.03	0.1
CoCl2.6H2O	0.025	0.1	0	0
AlCl3	0	0	0.03	0.2
NiCl2.6H2O	0	0	0.03	0.1

5.2.3. Tableau n°3: composition des solutions de vitamines.

	NITSCH		MOREL		M. S.	
	mg/l	µM/l	mg/l	µM/l	mg/l	µM/l
Inositol	100	555	100	555	100	555
Thiamine-HCl	0.5	1.4	1	3	0.1	0.3
Ac.nicotinique	0.5	4	1	8	0.5	4
Pyridoxine-HCl	0.5	2.4	1	4.9	0.5	2.4
Biotine	0.05	0.2	0.01	0.04	0	0
Ac.folique	0.5	1.2	0	0	0	0
Glycine	2	26.6	0	0	0	0
Ca-pantothénate	0	0	1	2	0	0

### 5.3. Les tableaux des milieux: balances hormonales.

Nous avons réalisé une seule et grande expérience qui nous a permis d'étudier et d'analyser un nombre important de facteurs. Un total de 68 milieux ont été étudiés. Le nombre d'explants, par combinaison hormonale, est un multiple de 24, le maximum étant 96 explants. Les facteurs analysés sont: la caulogénèse, la rhizogénèse et l'apparition de calcs. Pour la commodité du travail nous avons découpé cette expérience dans le temps en trois séries.

Une première série (du 02 Janvier au 21 Avril 1991) au cours de laquelle nous avons testé 7 milieux contenant tous du charbon actif additionné à: AIB, BAP et GA3 à des concentrations de 0.1 à 1mg/l. Sur ces milieux nous avons repiqué des explants provenant de la germination des graines.

Une deuxième série (du 22 Avril au 27 Juin 1991) où nous avons expérimenté 13 milieux sans charbon actif et comparé surtout l'action de deux milieux minéraux de base: M.S. et WPM. Nous avons utilisé comme hormones: l'AIB, l'ANA, la BAP, et la Zéatine à des concentrations de 0.1 à 1mg/l. Ces milieux ont servi de terrains pour la subculture d'explants issus de la première série.

Une troisième série (du 28 Mai au 30 Août 91) avec 48 milieux testés. Ici nous avons cherché à comparer les effets des concentrations plus élevées d'hormones végétales dans des couples de milieux (l'un avec charbon et l'autre sans charbon): l'AIB, l'ANA, la BAP, la Kinétine et la Zéatine à des doses de 0.1 à 2mg/l. Nous observé aussi l'action du vieillissement des cultures sur la réactivité, cette série étant la subculture des explants de la deuxième série.

**5.3.1. Tableau n°4: Les milieux de la première série.**

Le milieu minéral de base est celui de MURASHIGE et SKOOG (MS).

Hormones	BAP.mg/l	GA3.mg/l	AIB.mg/l	CA.1g/l
Milieux				
0201A	0	0.12	0.12	+
0201B	0	1.2	0.12	+
0201C	0	0	1.2	+
0201D	0	1.2	0	+
0102C	0.1	0	0.1	+
0102D	1	0	0.1	+
0401MS	0	0	0	+

5.3.2. Tableau n°5: les milieux de la deuxième série.

Hormones	BAP.mg/l	Zéa.mg/l	AIB.mg/l	ANA.mg/l	CA.1g/l
Milieux					
2204MS1	1	0	0.1	0	-
2204MS2	0	1	0.1	0	-
2204MS3	1	0	0	0.1	-
2204MS4	0	1	0	0.1	-
1005WPM1	1	0	0.1	0	-
1005WPM2	0	1	0.1	0	-
1005WPM3	1	0	0	0.1	-
1005WPM4	0	1	0	0.1	-
1505MS1	0.5	0	0.1	0	-
1505MS2	0	0.5	0.1	0	-
1505MS3	0.5	0	0	0.1	-
1505MS4	0	0.5	0	0.1	-
2203MS	0	0	0	0	-

5.3.3. Tableau n°6(a): les milieux de la troisième série.

Hormones	BAP.mg/l	Kin.mg/l	Zéa.mg/l	AIB.mg/l	CA.1g/l
<u>Milieux</u>					
2805MS1	1	0	0	0.1	-
2805MS2	1	0	0	0.1	+
2805MS3	1	0	0	1	-
2805MS4	1	0	0	1	+
2805MS5	1	0	0	2	-
2805MS6	1	0	0	2	+
3105MS7	0	1	0	0.1	-
3105MS8	0	1	0	0.1	+
3105MS9	0	1	0	1	-
3105MS10	0	1	0	1	+
3105MS11	0	1	0	2	-
3105MS12	0	1	0	2	+
0306MS13	0	0	1	0.1	-
0306MS14	0	0	1	0.1	+
0306MS15	0	0	1	1	-
0306MS16	0	0	1	1	+
0306MS17	0	0	1	2	-
0306MS18	0	0	1	2	+

Tableau n°6(b): Milieux de la troisième série (suite).

Hormones	BAP.mg/l	Kin.mg/l	Zéa.mg/l	ANA.mg/l	CA.1g/l
<b>Milieux</b>					
0506MS19	1	0	0	0.1	-
0506MS20	1	0	0	0.1	+
0506MS21	1	0	0	1	-
0506MS22	1	0	0	1	+
0506MS23	1	0	0	2	-
0506MS24	1	0	0	2	+
0706MS25	0	1	0	0.1	-
0706MS26	0	1	0	0.1	+
0706MS27	0	1	0	1	-
0706MS28	0	1	0	1	+
0706MS29	0	1	0	2	-
0706MS30	0	1	0	2	+
1106MS31	0	0	1	0.1	-
1106MS32	0	0	1	0.1	+
1106MS33	0	0	1	1	-
1106MS34	0	0	1	1	+
1106MS35	0	0	1	2	-
1106MS36	0	0	1	2	+

Tableau n°6(c): Milieux de la troisième série (suite).

Hormones	BAP.mg/l	Ki.mg/l	ANA.mg/l	AIB.mg/l	CA.1g/l
Milieux					
1406MS37	2	0	0.1	0	-
1406MS38	2	0	0.1	0	+
1406MS39	0	2	0.1	0	-
1406MS40	0	2	0.1	0	+
1406MS41	2	0	1	0	-
1406MS42	2	0	1	0	+
1406MS43	0	2	1	0	-
1406MS44	0	2	1	0	+
1806MS45	0	2	2	0	-
1806MS46	0	2	2	0	+
1806MS47	0	2	0	2	-
1806MS48	0	2	0	2	+

## C. RESULTATS EXPERIMENTAUX.

### 1. Résultats de la première série.

#### 1.1. La caulogenèse.

Au cours de nos expériences sur la micropropagation de l'*Acacia raddiana*, nous avons obtenu le développement d'un seul bourgeon axillaire par explant après 2 mois d'incubation.

Les microboutures étant repiquées sur 7 milieux différents (voir le tableau des milieux) d'une part, et appartenant à des familles différentes d'autre part, les résultats obtenus ont été soumis à des tests statistiques pour la recherche d'éventuels effets milieux et effets familles.

#### 1.1.1. Effets milieux.

Tableau n°7: Les moyennes et les écarts-types calculés sur les hauteurs des plantules par milieu après deux mois de culture.

Milieux	Effectifs	Lg. m. (cm).	Ecart Types	CMM
0201A	19	2.35	1.31	A
0201B	19	2.00	1.30	A
0201C	18	2.14	1.24	A
0201D	17	2.26	1.47	A
0102C	95	1.78	0.96	B
0102D	86	1.68	0.96	B
0401MS	32	2.35	1.30	A
Total	286			

Les calculs statistiques donnent des valeurs des longueurs moyennes et des écarts-types assez proches les unes des autres d'un milieu à l'autre. Mais l'analyse de variance donne une valeur de  $F=2.5$ , valeur significative à 5 pour cent. Il y a donc un effet milieu permettant d'en distinguer deux catégories de milieux:

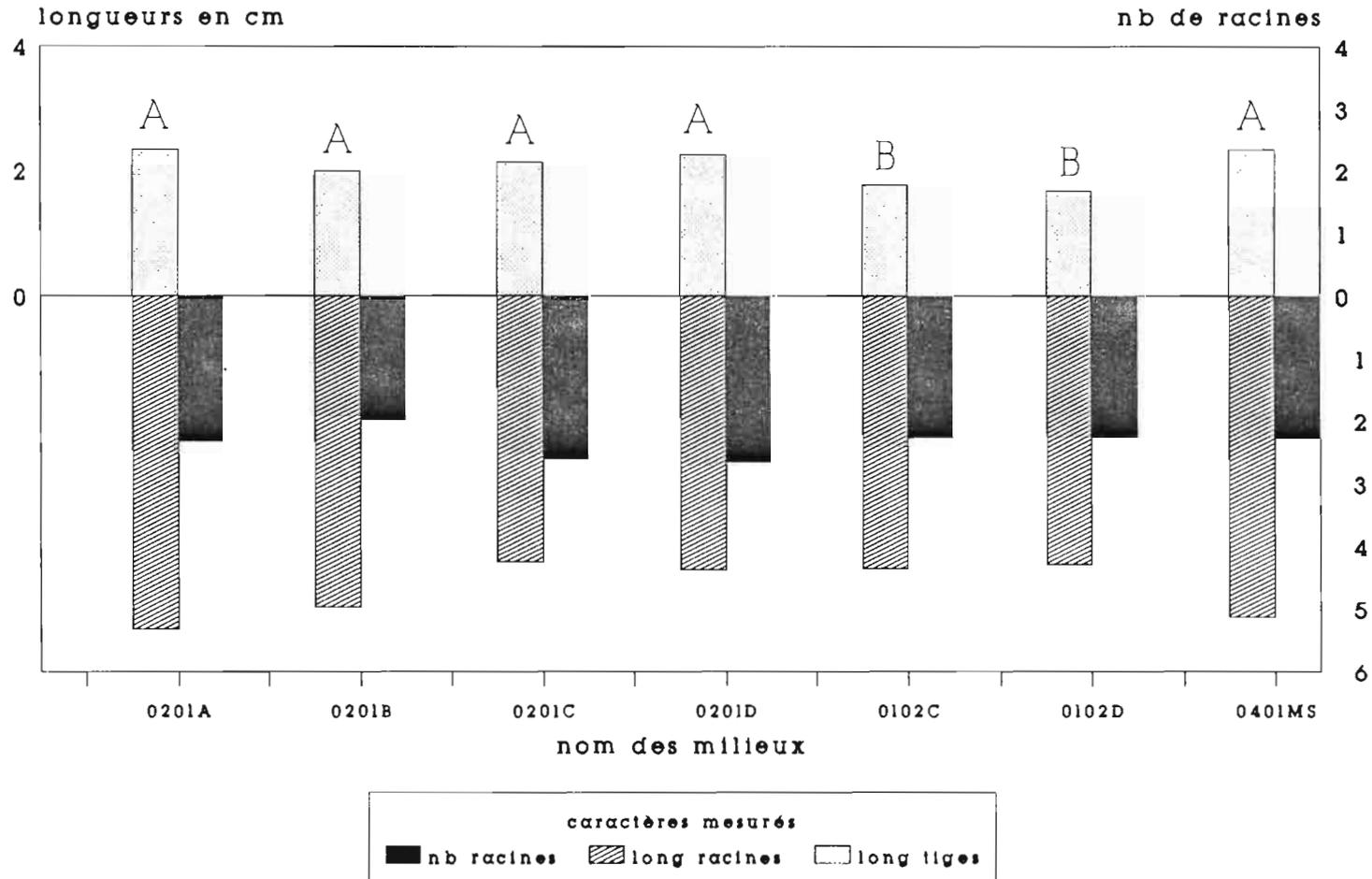
Une première catégorie comportant les milieux 0401MS, 0201A, 0201D, 0201C, 0201B, où les moyennes des longueurs de tige sont au moins égales à 2 cm, et des écarts-types supérieurs à 1.

Les résultats observés sur l'ensemble des milieux de cette première catégorie paraissent favorisés par l'apport d'hormones végétales exogènes, représentées ici par les auxines et les gibbérellines. Le milieu 0401MS est un témoin dépourvu d'hormone. Le milieu 0201A comporte 0.12 mg/l d'AIB + 0.12 mg/l de GA3; le milieu 0201B renferme 0.12 mg/l d'AIB + 1.2 mg/l de GA3 ; les milieux 0201C avec 1.2 mg/l d'AIB, et 0201D avec 1.2 mg/l de GA3 contiennent un seul type d'hormone. Malgré la diversité de ces milieux du point de vue hormonal, les résultats obtenus ne sont pas différents de façon significative entre eux d'une part, ni du témoin d'autre part (figure 1).

Une deuxième catégorie qui comprend les milieux 0102C et 0102D dans lesquels les valeurs des moyennes des longueurs et des écarts-types sont les plus faibles. Ces milieux comportent respectivement 0.1 mg/l de BAP + 0.1 mg/l d'AIB (0102C), et 1 mg/l de BAP + 0.1 mg/l d'AIB (0102D). Cette balance hormonale a été moins active et n'a pas favorisé l'élongation chez l'*Acacia raddiana* comparativement aux milieux de la première catégorie. Nous estimons que la présence de la BAP a eu un effet dépressif sur l'allongement des tiges.

Selon la littérature, les auxines seraient les plus favorables à l'élongation des pousses. Mais le milieu témoin (sans hormones) a donné de bons résultats d'élongation. Le milieu minéral de base étant le même (MS/2), ces résultats nous conduisent à penser que chez les jeunes plants d'*Acacia raddiana* (issus de la germination), le niveau hormonal endogène est suffisant pour assurer leur élongation. L'apport extérieur de certaines balances hormonales perturberait l'équilibre interne et se traduirait plutôt par des inhibitions, ce qui serait le cas avec la BAP combinée à l'AIB; d'autres apports extérieurs pourraient être soit sans effet sur l'équilibre hormonal endogène, soit favorables à celui-ci, ce qui produirait de bons résultats, c'est le cas des milieux contenant de la GA3 et/ou de l'AIB.

Fig 1: EFFETS MILIEUX SUR LA CROISSANCE  
DES VITROPLANTS APRES DEUX MOIS  
DE CULTURE (*Acacia raddiana*)



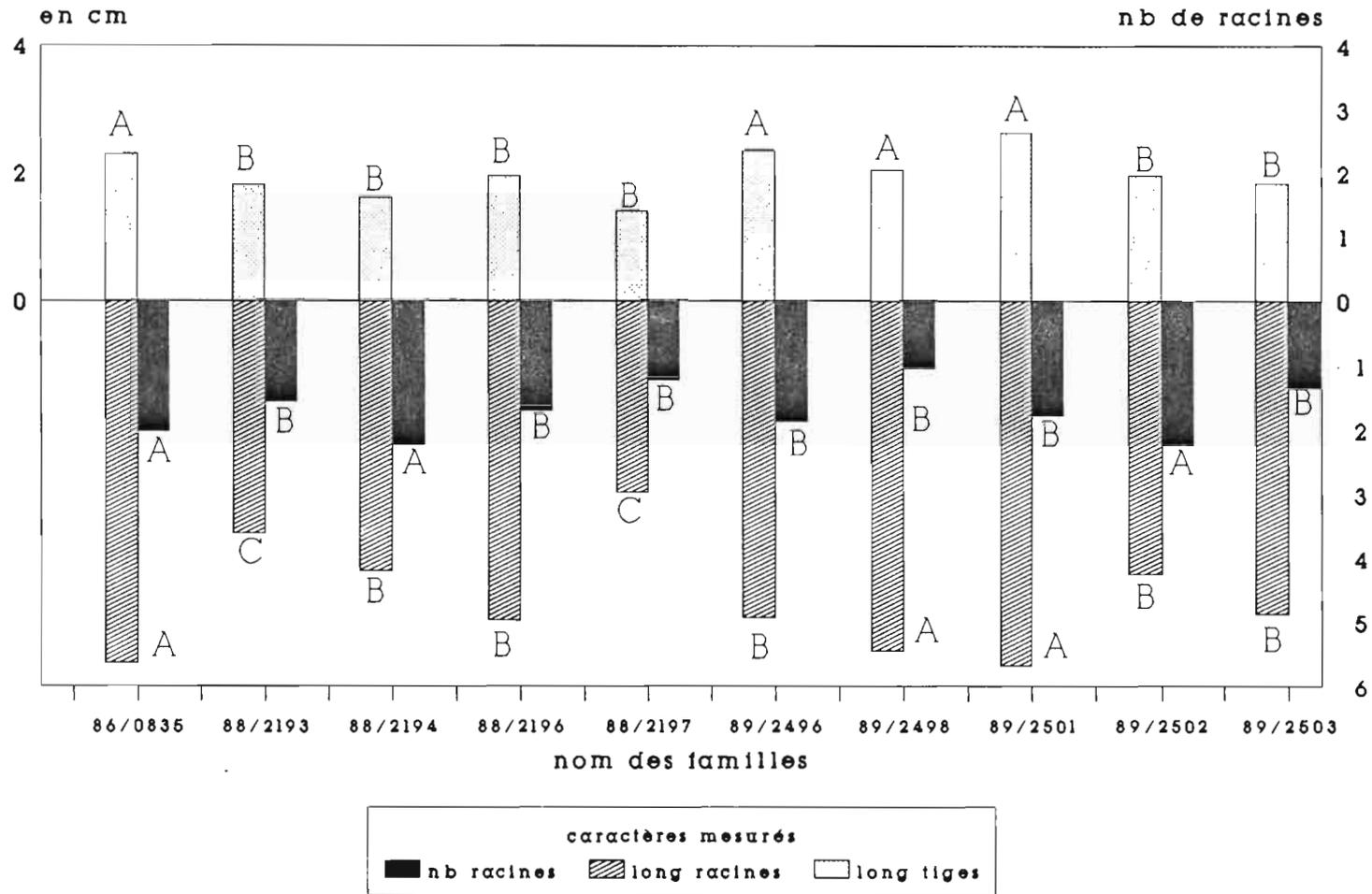
### 1.1.2 Effets familles.

**Tableau n°8: Les moyennes et les écarts-types calculés sur les hauteurs des plantules par famille après deux mois de culture.**

Familles	Effectifs	Lg. m. (cm)	Ecart Types	CMM
86/0835	50	2.3	1.31	A
88/2193	33	1.82	1.04	B
88/2194	34	1.62	1.09	B
88/2196	58	1.96	0.93	B
88/2197	46	1.4	0.69	B
89/2496	14	2.35	1.41	A
89/2498	11	2.05	1.14	A
89/2501	11	2.63	1.48	A
89/2502	14	1.96	1.26	B
89/2503	16	1.84	1.29	B
<b>Total</b>	<b>286</b>			

Les précautions d'annotation des microboutures nous ont permis d'identifier facilement les familles au sein des milieux d'incubation et d'y comparer leur réactivité. En calculant la moyenne des longueurs des explants pour chaque famille nous avons obtenu des valeurs au moins égales à 2 cm après deux mois de culture dans 4 familles seulement sur les 10 familles que nous avons expérimentées. Ce sont les familles 89/2498 (2.05 cm), 86/0835 (2.30 cm), 89/2496 (2.35 cm), 89/2501 (2.64 cm) comme le montre la figure 2. L'analyse de variance donne la valeur de  $F=2.8$  très significative à 5 pour cent et renforce l'hypothèse d'une différence de réactivité des familles.

**Fig 2: EFFETS FAMILLES SUR LA CROISSANCE  
DES VITROPLANTS APRES DEUX MOIS  
DE CULTURE (*Acacia raddiana*)**



Dans nos conditions expérimentales nous avons observé que les familles de génotypes réagissaient différemment selon les milieux d'incubation. C'est ainsi que dans les milieux 0201A (AIB 0.12 mg/l + GA3 0.12 mg/l), 0201B (AIB 0.12 mg/l + GA3 1.2 mg/l), 0201C (AIB 1.2 mg/l), 0201D (GA3 1.2 mg/l), les meilleures élongations étaient obtenues avec les explants de la famille 89/2501. Les milieux 0201D (GA3 1.2 mg/l), 0102D (BAP 1 mg/l + AIB 0.1 mg/l), 0102C (BAP 0.1mg/l + AIB 0.1mg/l) et 0401MS (témoin) ont donné de bons résultats d'élongation avec la famille 86/0835. Sur le milieu 0401MS (témoin), les familles 89/2496 et 89/2498 se sont avérées meilleures.

A la lumière de ces résultats nous pouvons penser que les 7 milieux testés étaient tous susceptibles de produire de bons résultats d'élongation. Les différences de réactivité des microboutures vis-à-vis de l'élongation peuvent être attribuées à la variabilité génotypique des familles de graines. L'hypothèse d'un effet famille peut être envisagée de même que des interactions familles-milieux.

Nous avons remarqué que la couleur des plantules n'était pas homogène. Elle variait du vert intense au vert jaunâtre. La couleur jaune était plus intense chez les explants situés plus près des tubes fluorescents et elle s'accompagnait d'une chute importante des feuilles à partir de la base. Par la suite les plantules perdent toutes leurs feuilles et finissent par dégénérer. Nous n'avons pas attribué ce phénomène à la composition des milieux comme l'ont fait quelques auteurs: QUOIRIN (1976), BEAUCHESNE (1983), S. ZOK (1985). Il est important de préciser que cette observation n'était pas généralisée. Seuls les explants situés plus près des tubes fluorescents présentaient de telles anomalies dans le cas de notre expérience. Cette dégénérescence progressive peut avoir été provoquée soit par le spectre lumineux (lumière du jour) qui ne conviendrait pas aux vitroplants de *raddiana*, soit par la chaleur qui se dégagerait des tubes fluorescents et dont les effets se feraient sentir plus nettement à petite distance, soit enfin par la conjugaison des deux facteurs: spectre lumineux et chaleur.

## 1.2. La rhizogenèse.

Au cours de nos essais de clonage d'*Acacia raddiana*, enracinement et élongation ont été initiés simultanément sur les mêmes milieux de culture. Après 8 semaines d'incubation, des plantules se sont enracinées. Le nombre de racines pour les plantules qui en possèdent varie dans de très larges proportions d'un individu à l'autre (1 à 10 racines); les tailles des racines sont encore plus hétérogènes et oscillent de 0.1 cm à plus de 10 cm. Les mesures faites sont exprimées d'abord par milieu et ensuite regroupées par famille de génotypes; elles vont concerner dans un premier temps le nombre de racines puis en second lieu leurs longueurs.

### 1.2.1. Le nombre de racines.

#### 1.2.1.1. Effets milieux.

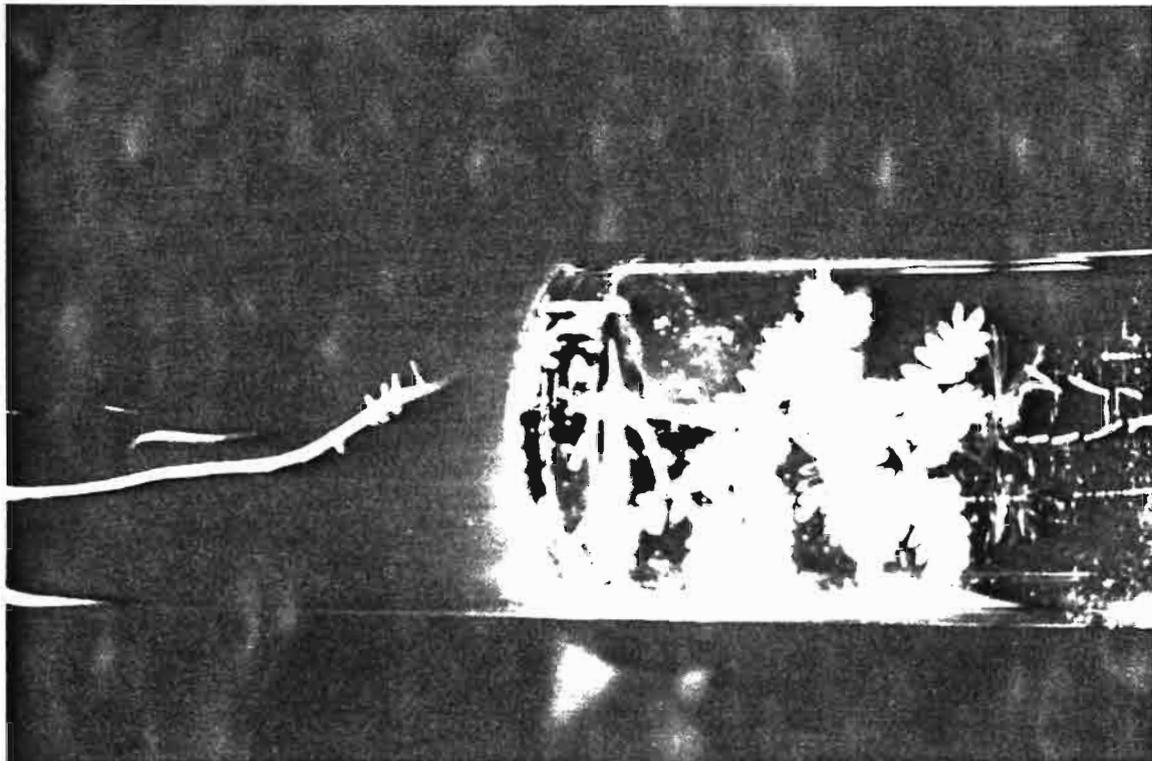
Tableau n°9: Les nombres de racines, les moyennes et les écarts-types, exprimés par milieu après deux mois d'incubation.

Milieux	Effectifs	%Enrac.	N.max.	Moyennes	E.types
0201A	24	79	8	2.32	1.56
0201B	24	79	6	2.00	1.56
0201C	20	90	10	2.61	2.31
0201D	24	71	7	2.65	1.71
0102C	130	73	7	2.26	1.44
0102D	126	68	10	2.25	1.51
0401MS	41	78	7	2.28	1.40
Total	389				

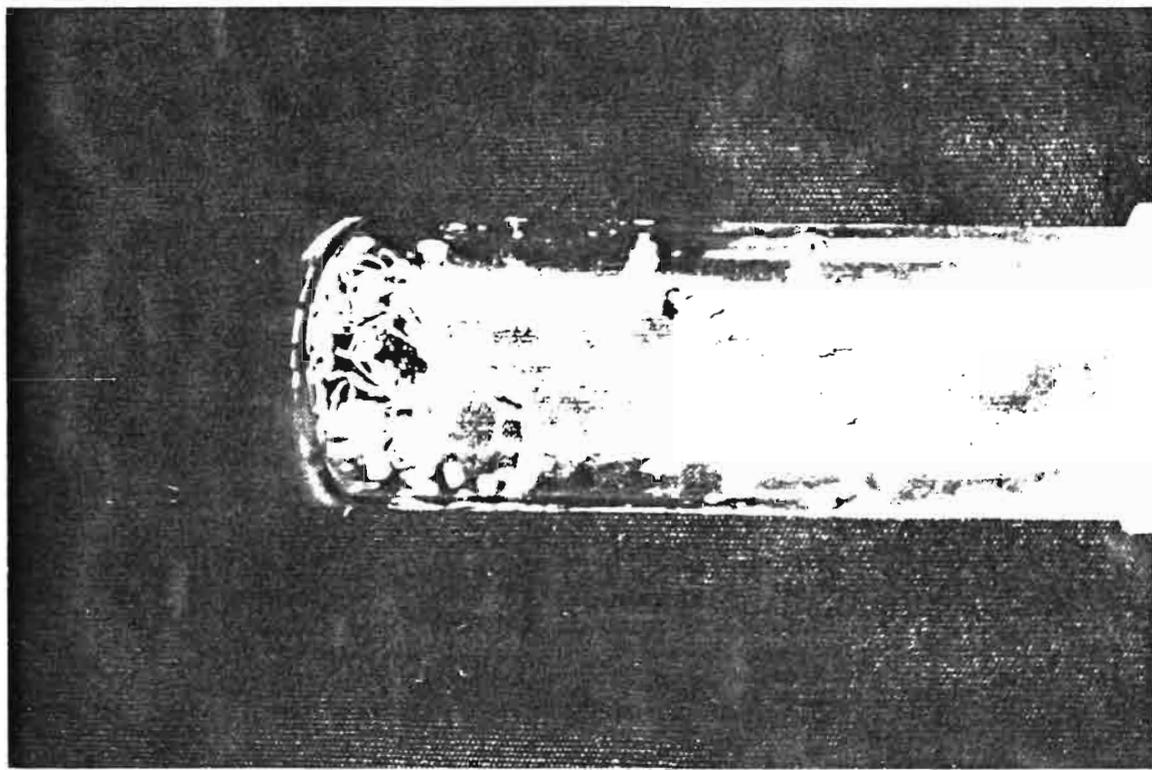
Les moyennes et les écarts-types calculés pour le nombre de racines donnent des valeurs assez rapprochées d'un milieu à l'autre. Ceci pourrait exprimer des aptitudes presque égales de tous les milieux testés à produire des racines. D'autre part, l'analyse de variance donne une valeur de  $F=0.80$  qui est statistiquement non significative à 5 pour cent. Ceci vient conforter l'hypothèse de l'équivalence des milieux entre eux à susciter l'enracinement chez les explants (figure 1).

Planche 3: Vitroplants d'*Acacia raddiana*: enraciné 1; non enraciné 2.

1



2



Par conséquent la notion d'effet milieu pour le facteur "nombre de racines" ne peut être envisagée pour l'ensemble des milieux testés. On pourrait assez facilement penser que les balances hormonales qui différencient ces milieux, sont toutes favorables à l'enracinement; mais le milieu témoin a également produit un excellent résultat. L'hypothèse d'un enracinement spontané peut donc être possible. Mais les pourcentages d'enracinement observés sont suffisamment importants dans chacun des milieux.

Par conséquent cette dernière hypothèse ne peut être retenue. Nous estimons qu'il pourrait s'agir d'un équilibre hormonal endogène adéquat à l'enracinement chez les raddiana juvéniles, équilibre favorisé surtout par la composition du milieu minéral de base: le milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962) dans lequel les macroéléments ont été dilués de moitié (MS/2). En effet, M. DUFOUR et P. DUBLIN (1985) préconisent que la réduction de la concentration des milieux en éléments minéraux a été souvent recommandée dans les processus d'induction de la rhizogenèse. En expérimentant trois solutions de macroéléments: MS/1, MS/2, MS/4, ils ont constaté qu'une dilution de la concentration des macroéléments était favorable à l'enracinement *in-vitro* des boutures de cacaoyers; cependant cette dilution ne doit pas être trop importante.

#### 1.2.1.2. Effets familles.

Tableau n°10: Les nombres de racines, les moyennes et les écarts-types, exprimés par famille après deux mois de subculture.

Familles	N.max.	Moyennes	Ecart Types	CMM
86/0835	8	2.03	1.67	A
88/2193	10	1.56	1.75	B
88/2194	7	2.23	1.58	A
88/2196	7	1.70	1.57	B
88/2197	6	1.22	1.15	B
89/2496	6	1.88	1.33	B
89/2498	3	1.05	0.77	B
89/2501	6	1.78	1.48	B
89/2502	10	2.23	2.49	A
89/2503	4	1.35	0.85	B

L'hétérogénéité du matériel végétal utilisé au cours de ce travail nous conduit toujours, face à la complexité des résultats, à recourir à des tests de statistique; ceci dans le but d'attribuer ou non les différences observées à l'effet du hasard. L'analyse de variance montre que la majorité des familles (7/10) ont en moyenne moins de 2 racines par explant sauf les familles 86/0835, 88/2194 89/2502 qui ont plus de 2 racines, ainsi que le montrent le tableau ci-dessus et la figure 2. Les valeurs de l'écart-type sont parfois très éloignées entre les familles. Les valeurs obtenues de  $F=2.06$  et de  $KHI-2=20.11$  sont très significatives à 5 pour cent. Toutes ces valeurs montrent que les différences observées ne peuvent pas être dues à l'effet du hasard mais à une hétérogénéité des familles à répondre à l'enracinement. Sachant que les familles sont réparties au hasard sur les différents milieux, l'on peut rechercher des interactions entre les familles et les milieux. Les meilleures interactions possibles pourraient concerner les milieux et familles suivants:

Milieux 0201A, 0201B, 0201C et la famille 89/2502.  
 Milieux 0201D, 0201C, 0102D 0401MS et la famille 86/0835.  
 Milieux 0102C, 0102D et la famille 88/2194.

### 1.2.2. Les longueurs des racines.

#### 1.2.2.1. Effets milieux.

Tableau n°11: Les longueurs de racines, les moyennes et les écarts-types, exprimés par milieu après deux mois de subculture.

Milieux	Lg.max.	Moyennes	Ecart Types
0201A	10	5.32	3.21
0201B	12	4.97	2.83
0201C	10	4.25	2.25
0201D	10	4.38	3.35
0102C	10	4.36	3.19
0102D	10	4.29	3.19
0401MS	10	5.14	2.61

Dans tous les milieux la longueur moyenne des racines des plants enracinés est supérieure à 4 cm ainsi que le montre le tableau; les écarts-types sont assez élevés et très proches les uns des autres. La valeur de  $F=0.63$  est non significative à 5 pour cent. Tous ces paramètres témoignent de la capacité de tous les milieux testés à promouvoir l'élongation des racines initiées en leur sein. Par conséquent, l'homogénéité observée vis-à-vis de ce facteur fait écarter d'emblée l'hypothèse d'un effet milieu (figure 1). Nous pourrions dans un premier temps conclure que les combinaisons hormonales qui caractérisent ces milieux sont toutes équivalentes quant à l'élongation racinaire. Mais le milieu témoin présente un développement important de racines. Ce qui semble signifier que l'apport d'auxines exogènes est peu nécessaire. L'hypothèse de l'équilibre hormonal endogène suffisant pour maintenir un développement complet chez les jeunes plants d'*A. raddiana* pourrait être à nouveau évoquée.

#### 1.2.2.2. Effets familles.

Tableau n°12: Les longueurs des racines, les moyennes et les écarts-types, exprimés par famille après deux mois de subculture.

Familles	Lg.max	Moyennes	Ecartss Types	CMM
86/0835	10	5.63	2.97	A
88/2193	10	3.61	3.31	C
88/2194	10	4.19	2.98	B
88/2196	10	4.97	3.32	B
88/2197	10	2.96	2.22	C
89/2496	10	4.93	2.32	B
89/2498	10	5.45	3.18	A
89/2501	12	5.68	3.41	A
89/2502	8	4.25	1.92	B
89/2503	10	4.88	3.09	B

Les valeurs des moyennes calculées par famille varient quelques fois dans de très larges mesures, les différences entre les moyennes de certaines dépassant 2 cm. Le calcul de F donne une valeur ( $=2.97$ ) très significative à 5 pour cent mettant ainsi en évidence des différences entre les familles. Nous avons distingué en fonction des moyennes 3 groupes de familles:

Les familles 86/0835, 89/2498, 89/2501 ayant produit les plus longues racines (moyenne supérieure à 5 cm).

Les familles 88/2196, 89/2496, 89/2503, 89/2502, 88/2194 avec des racines assez longues (taille moyenne des racines atteignant 4 cm).

Les familles 88/2193 et 88/2197 qui ont donné les racines les moins longues: moyenne inférieure à 4 cm (figure 2).

A l'issue de ce tout premier essai nous n'avons pas observé de développement de cals, même de façon cicatricielle, comme le signalent de nombreux auteurs. Rappelons que tous les milieux de cette série contiennent 1 mg/l de charbon actif. Pour tenter de préciser son rôle, nous avons expérimenté une autre série de milieux totalement dépourvus de charbon actif.

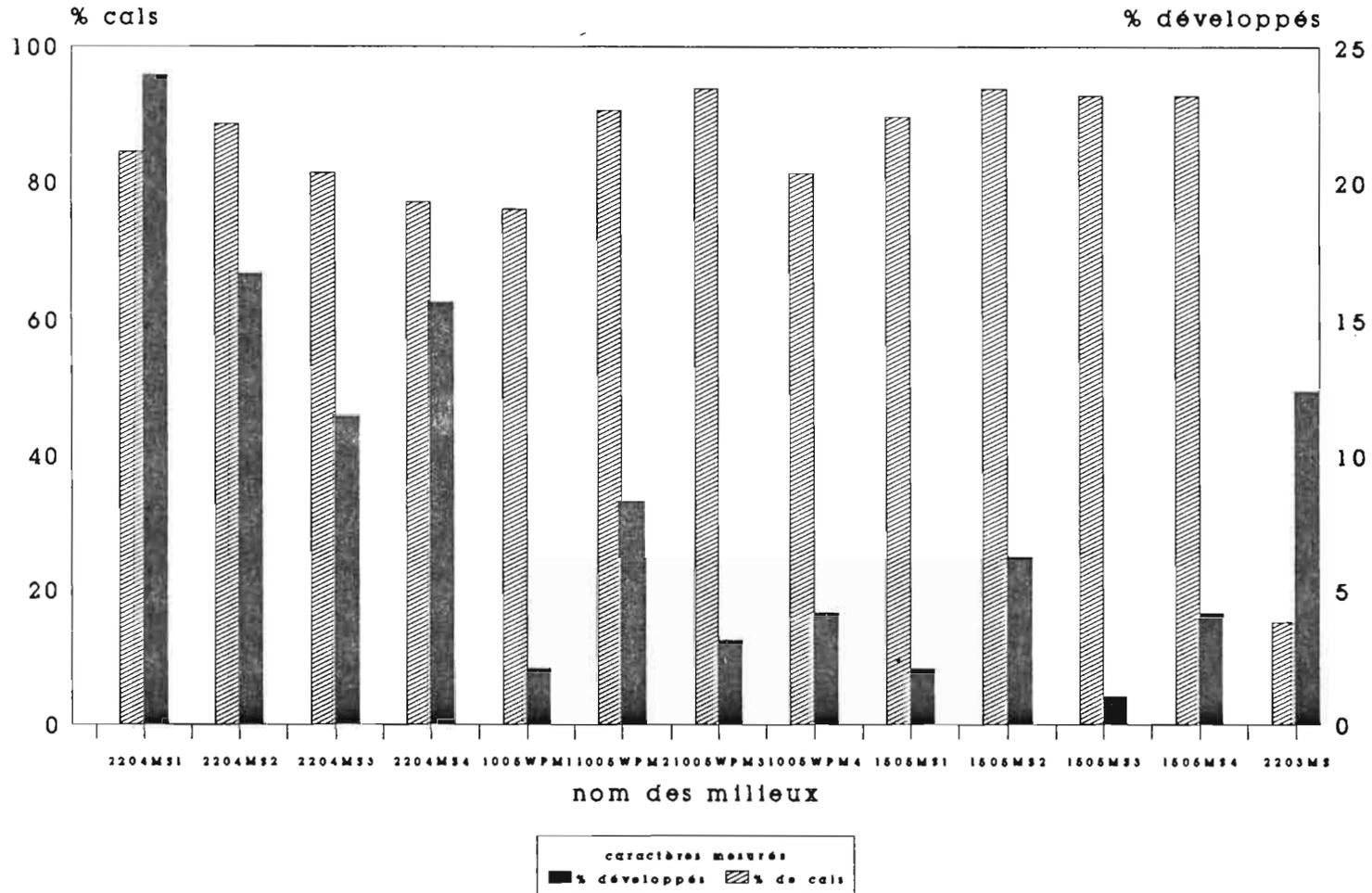
## 2. Résultats de la deuxième série.

Nous avons utilisé comme matériel végétal les explants provenant de la première série. Toutes les plantules enracinées ou non et présentant une bonne morphologie (tige et feuilles bien développées non chlorotiques), sont sélectionnées pour servir de matériel de subculture. Pour chaque plantule on élimine la partie inférieure de la tige (en même temps que les racines quand il y en a) et toutes les feuilles. La plantule est ensuite découpée en entre-nœuds qui vont constituer les microboutures de cette série.

**Tableau n°13: Expression des microboutures sur les différents milieux après deux mois d'incubation.**

Milieux	Effectifs	P.F. en %	Lg. m (cm)	CMM (P.F.)	Cal en %	CMM (cal)
2204MS1	96	23.95	2.31	A	84.37	B
2204MS2	96	16.66	1.52	B	88.54	B
2204MS3	96	11.45	2.67	A	81.24	B
2204MS4	96	15.62	2.41	A	77.08	B
1005WPM1	96	2.08	2.50	A	76.04	B
1005WPM2	96	8.33	1.52	B	90.62	A
1005WPM3	96	3.12	1.53	B	93.75	A
1005WPM4	96	4.16	1.87	B	81.24	B
1505MS1	96	2.08	1.56	B	89.58	B
1505MS2	96	6.25	1.83	B	93.75	A
1505MS3	96	1.04	1.00	B	92.70	A
1505MS4	96	4.16	2.13	A	92.70	A
2203MS	96	12.41	1.42	B	15.25	B
Total	1248					

Fig 3: REPONSE DES EXPLANTS PAR MILIEU  
 A LA 2ème SUBCULTURE APRES 2 MOIS  
 DE CULTURE (*Acacia raddiana*)



**Tableau n°14: montrant les effets familles sur les variables: longueur tiges, et cals au bout de deux mois de culture.**

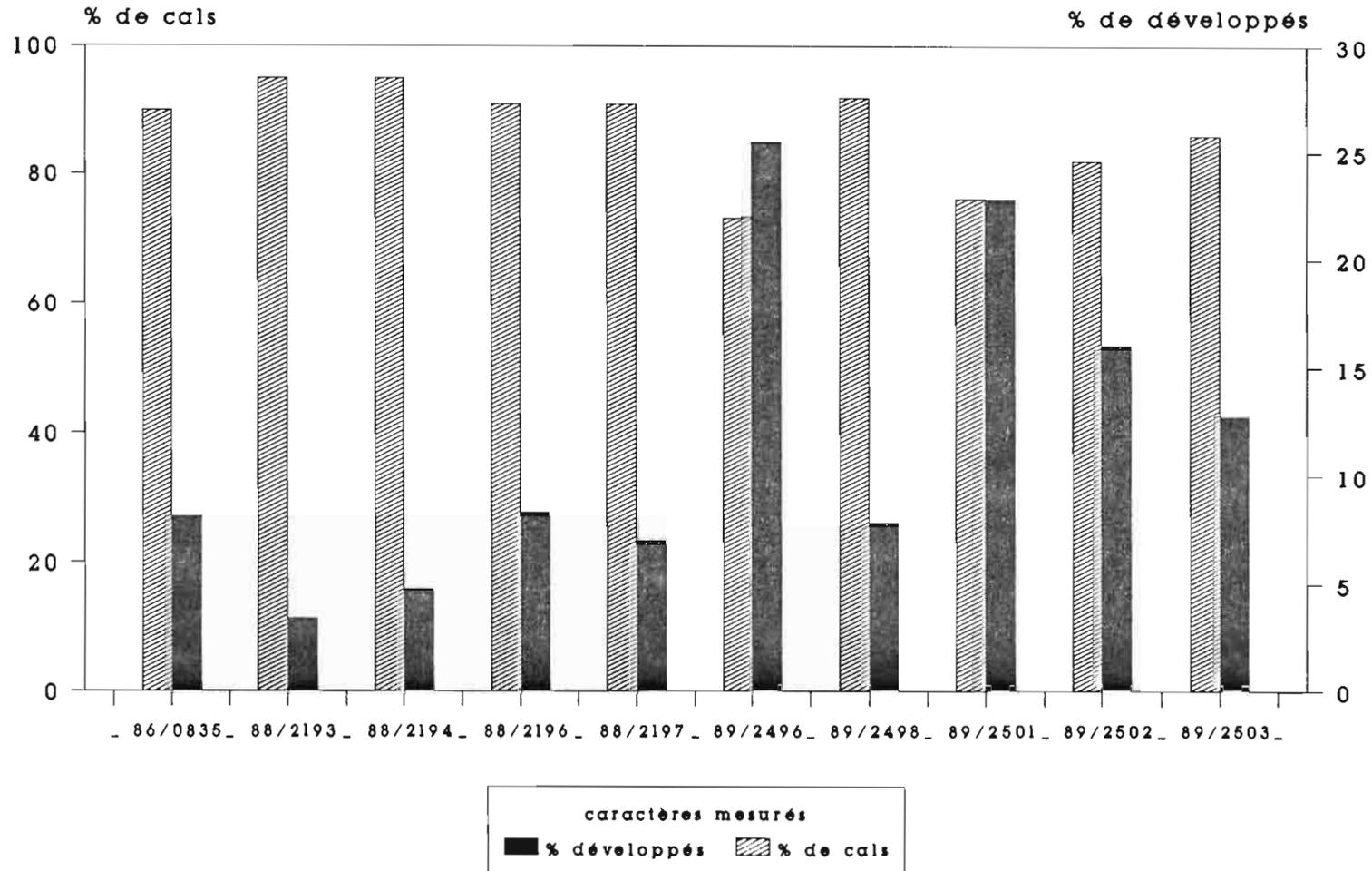
Familles	P. F. en%	Lg. m. (cm)	CMM (P.F.)	Cal en%	CMM (cal)
86/0835	8.11	2.22	A	90	B
88/2193	3.42	1.12	B	95	B
88/2194	4.80	1.74	B	95	A
88/2196	8.37	2.25	A	91	B
88/2197	7.03	1.72	B	91	B
89/2496	25.53	3.00	A	73	B
89/2498	7.89	1.73	B	92	A
89/2501	22.72	3.27	A	76	B
89/2502	16.08	1.66	B	82	B
89/2503	12.72	1.60	B	86	B

Après la mise en culture des microboutures, les réactions de cette série se sont avérées être plus rapides que précédemment et les observations se faisaient régulièrement chaque semaine pendant 8 semaines environ au cours desquelles nous avons noté les manifestations suivantes:

Sur tous les milieux testés nous avons obtenu un développement important de cals (figure 3). Les cals apparaissent d'abord soit de façon cicatricielle à la base de l'explant, soit au sommet de celui-ci pour se développer ensuite indéfiniment jusque dans la plupart des cas, envahir toute la microbouture et inhiber complètement tout éventuel bourgeonnement. Les cals étaient de dimensions très variables et nous avons distingué 4 classes de cal: 1 = petits cals; 2 = moyens cals; 3 = gros cals; 4 = très gros cals.

L'inhibition de bourgeonnement était surtout observée dans les classes 3 et 4. Toute la surface du milieu de culture était recouverte par le cal dont la hauteur pouvait atteindre 15 mm submergeant ainsi l'explant. Chez les cals de petites tailles (classes 1 et 2), l'inhibition du bourgeonnement, dans certains cas, était due au développement du cal tout le long et/ou au sommet de l'explant. Les cals étaient de couleurs très variées: blanchâtres, brunâtres, grisâtres, verdâtres; quant à leurs consistances, on pouvait distinguer des cals: mous, friables ou compacts.

**Fig 4: REPONSE DES EXPLANTS PAR FAMILLE  
A LA 2ème SUBCULTURE APRES 2 MOIS  
DE CULTURE (*Acacia raddiana*)**



Les analyses de variances sur l'importace (taille) des cals à partir de notre classification (signalée ci-dessus) ont révélé l'existence d'effet milieu d'une part ( $F=5.4$ ), et d'un effet famille d'autre part ( $F=12.4$ ). Les cals les plus importants sont produits par les milieux et les familles marqués par la lettre A sur les tableaux n° 13 (effets milieux) et n° 14 (effets familles). Si à la fin les cals ont les mêmes niveaux de croissance à l'intérieur d'une classe donnée (celles que nous avons définies), il faut néanmoins noter qu'ils apparaissent plus tôt dans les milieux contenant de la zéatine par rapport à ceux qui contiennent de la BAP.

L'apparition systématique des cals dans tous les milieux suppose une prolifération anarchique des cellules même dans le milieu témoin (sans auxine ni cytokinine). L'ensemble de tous ces milieux ne contiennent pas de charbon actif (CA). Dans les milieux de la première série contenant du charbon actif nous n'avons pas observé de développement des cals. L'on pourrait penser que les balances hormonales sont différentes dans les deux cas et peuvent avoir des comportements tout à fait parallèles. Mais le milieu témoin de cette série a produit du cal. Il pourrait se dégager de ce constat que le charbon actif empêcherait la formation des cals par la fixation éventuelle des excédents d'hormones végétales ou d'éléments chimiques susceptibles de provoquer une prolifération trop importante de cellules qui forment les cals.

L'expression des bourgeons a été fortement influencée par la présence des cals; mais les quelques développements de bougeons que l'on a observés ici montrent toujours qu'il existe un effet famille assez important que révèlent l'analyse de variance ( $F=7.01$ ) et la figure 4.

Les tailles des bourgeons, lorsqu'ils existent, sont très hétérogènes. Certains sont restés très rabougris (1 à 5 mm) présentant seulement une paire de folioles au-dessus du cal. D'autres par contre ont présenté un développement normal et régulier pour atteindre 8 cm dans les meilleurs cas et comportant jusqu'à 6 noeuds en 8 semaines de culture. Ces résultats ont été soumis aux tests statistiques et se sont signalés être sous l'influence des effets milieux ( $F=8.52$ ). Les milieux suivants ont produit les meilleures élongations (en moyenne 2 cm ou plus): 1005WPM1 avec 1 mg de BAP + 0.1 mg d'AIB par litre; 2204MS1 contient également 1 mg de BAP + 0.1 mg d'AIB par litre; 2204MS2 renferme quant à lui 1 mg de Zéatine + 0.1 mg d'AIB par litre; les milieux 2204MS3 et 2204MS4 se différencient des autres respectivement par 1 mg de BAP + 0.1 mg d'ANA par litre et 1 mg de Zéatine + 0.1 mg d'ANA par litre; enfin le milieu 1505MS4 possède 0.5 mg de Zéatine + 0.1 mg d'ANA par litre.

Les effets familles toujours présents ( $F=8.42$ ) permettent de distinguer des familles ayant réagi plus favorablement. ce sont celles qui ont donné une longueur moyenne dépassant 2 cm et/ou un nombre relativement important de plantules allongées. 86/0835, 88/2196, 88/2197, 89/2496 et 89/2501. Les anomalies chlorotiques sont demeurées très comparables à celles constatées avec les plantules de la première série.

L'apparition des racines a complètement fait défaut sur l'ensemble de tous les milieux de cette série. Afin de mieux appréhender l'action du charbon actif nous avons expérimenté une troisième série comportant des couples de milieux. Les milieux de chaque couple possèdent les mêmes balances hormonales, mais ils sont différenciés par la présence de charbon actif dans l'un.

### 3. Résultats de la troisième série.

Les milieux de cette série contiennent de fortes doses de cytokinines dans le but de provoquer la prolifération de pousses. Les explants de cette sont plus âgés car ils proviennent de la série 2 et sont à leur troisième subculture. Nous avons ainsi voulu noter l'effet du vieillissement sur la réactivité. Les manifestations suivantes sont enregistrées après 8 semaines de mise en culture:

Dans les milieux dépourvus de charbon actif (CA -), les résultats sont restés très identiques à ceux de la deuxième série d'expérience : prolifération importante des cals, forte influence des cals sur l'apparition et le développement des bourgeons, et absence totale de racine. Deux séries de mesures (4ème et 8ème semaines) ont permis de constater l'évolution quantitative assez remarquable des cals dans le temps ( $F=25.8$ ), mais l'effet famille s'est fait également ressentir ( $F=11.8$ ).

Dans les milieux renfermant du charbon actif (CA +), la callogenèse a été très faible et même nulle. Les cals observés dans quelques tubes sont restés très cicatriciels à la base des explants. Il y a eu des enracinements dans ces milieux, mais le pourcentage de plantules enracinées est resté trop faible (inférieur à 1%). Les 48 milieux testés ici constituent en réalité 24 couples de milieux. Ceci nous a permis d'apprécier plus facilement le rôle du charbon actif. Celui-ci ne se limiterait pas seulement à l'obscurcissement du milieu de culture. Les premières hypothèses selon lesquelles le charbon de bois agirait par simple obscurcissement du milieu (PROSKAUER et DERMAN, 1970) se sont révélées non fondées (WANG et HUANG, 1976). Les travaux plus récents attribuent les effets du charbon à ses propriétés adsorbantes (GASPAR & al., 1983). Le charbon de bois adsorberait aussi bien des substances produites par les tissus que les régulateurs de croissance fournis de manière exogène dans les milieux (MARTINEAU et al., 1981; ELIASSON, 1981). Les molécules adsorbées seraient essentiellement de nature organique.

Un seul bourgeon axillaire se développe par bouture. La croissance des pousses a été relativement plus faible par rapport aux expériences précédentes (1ère et 2ème séries); néanmoins il y a eu des différences significatives entre la 4ème et la 8ème semaines ( $F=20.3$ ) révélées par les analyses de variance.

#### 4. Acclimatation et sortie en champ.

Cette phase a été exécutée au cours de la période de septembre à octobre 1991 pendant laquelle les conditions climatiques paraissaient relativement plus favorables: la température à 30°C, et surtout l'hygrométrie dépassant 80%.

Les plantules qui atteignaient 5 cm ou plus et enracinées sont sélectionnées pour l'expérience d'acclimatation. A l'aide de longues pinces, la gélose du milieu de culture est désorganisée et les plantules sont retirées des tubes avec beaucoup de précautions pour éviter la rupture de la tige et surtout des racines encore plus fragiles. Les plantules sont ensuite nettoyées de la gélose au niveau de leurs racines puis enroulées vers la base dans des Mottes Melfert préalablement bien trempées. Les plantules ainsi enroulées sont immobilisées verticalement dans des mini-serres à ouverture réglable. Chaque mini-serre est saturée en humidité par pulvérisation d'eau, puis fermée complètement avant de la placer dans la grande serre. Les plantules sont arrosées deux fois par jour avec une solution d'engrais KNOP et l'on sature à nouveau la mini-serre en humidité. Cette opération s'est poursuivie pendant une semaine avant d'amorcer une ouverture progressive de la mini-serre. L'arrosage se poursuit et au bout de trois semaines, la mini-serre est complètement ouverte mettant directement les plantules en contact avec l'atmosphère de la grande serre où les températures atteignent quelques fois 35°C au cours de la journée. Ces opérations ont permis d'obtenir 100 pour cent de reprise d'activité des plantules qui se manifeste par l'apparition de nouvelles feuilles plus vertes que les précédentes et la reprise de croissance.

A la fin de la 4ème semaine les plantules sont transportées en champ et mis en terre où elles affrontent actuellement les conditions réelles de leur vie d'arbres du Sahel (climat, sol). Là aussi toutes les plantules ont survécu aux conditions climatiques, mais elles sont souvent attaquées par quelques Arthropodes (araignées, scarabées, chenilles...) qui apprécient les feuilles encore très tendres. La plupart des plantules sont ainsi entièrement coupées dès leur base par ces insectes fouisseurs attirés par l'humidité d'arrosage. Sur un total de 50 plantules mis en terre seulement 8 ont échappé aux prédateurs et poursuivent leur croissance à ce jour. De nouvelles méthodes de sortie en terrain seraient souhaitables pour éviter la destruction des plantules.

Planche 4: Plantules d'*Acacia raddiana* en serre (sevrage).

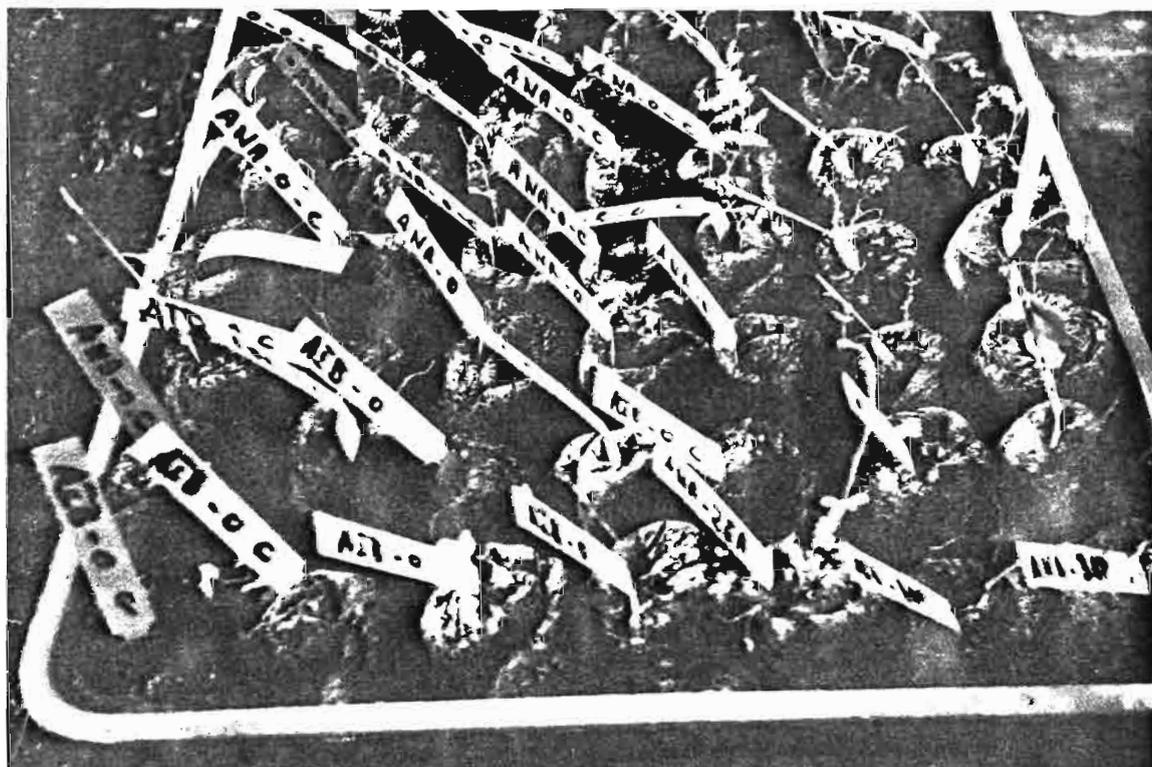


Planche 5: plantes d'*Acacia raddiana* en champ.



Tableau n°15: Exprimant le nombre d'individus par clone et le taux de multiplication par famille en 6 mois de culture.

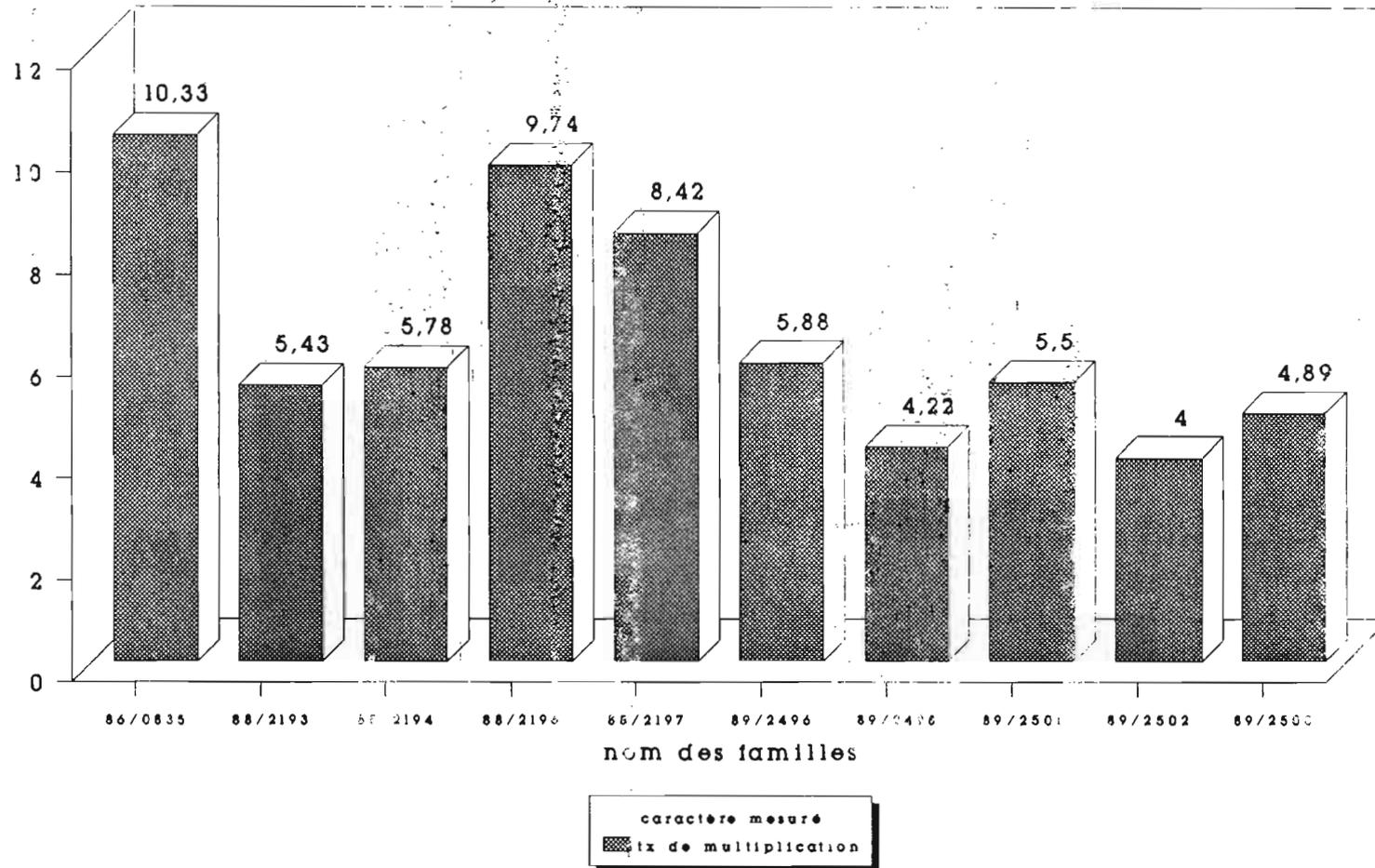
Familles	86/0835	88/2193	88/2194	88/2196	88/2197
Clones					
1	22	8	12	5	10
2	32	2	8	20	11
3	12	4	10	3	10
4	16		6	23	7
5	30	3	2	3	11
6	10		15	11	11
7	14	5	2	13	12
8	7	2		17	7
9	10	7	5	15	4
10	3	13	4	11	8
11	3	3	1	15	2
12	4	2	4	3	2
13	3	9	7	2	6
14	4	2	1	4	9
15	5	5	4	6	20
16	5	1	9	12	5
17	4	5	5	1	8
18	12	3	3	17	6
19	9	13	6	4	11
20	4	1		10	19
21	5	10		11	3
22		7		9	5
23		6		10	9
24					2
TAUX:	10.33	5.43	5.78	9.74	8.42

Tableau n°15 (suite)

Familles	89/2496	89/2498	89/2501	89/2502	89/2503
Clones					
1	3	7	7	4	2
2	6	5	4	7	9
3	6	3	11	1	5
4	6	7	5	6	2
5	12	2	6	2	2
6	6	4	3	2	7
7	6	2	7	2	11
8	2	1	1	9	2
9				2	4
10					
TAUX:	5.88	4.22	5.5	4	4.89

A la fin des derniers résultats de ce travail nous avons recensé tous les individus de chaque famille et de chaque clone; ce qui nous a permis de calculer les taux de multiplication par famille de génotypes. Les taux de multiplication sont obtenus à partir des noeuds formés par les plantules au cours de leur élongation. Ces taux varient dans de très larges proportions alors que toutes les familles de génotypes expérimentées ont suivi le même cheminement. Ces différences très prononcées pourraient conforter une fois de plus l'hypothèse d'un effet famille important pour ce facteur d'élongation (figure 5).

Fig 5: TAUX DE MULTIPLICATION  
PAR FAMILLE APRES 6 MOIS DE CULTURE  
(*Acacia raddiana*)



## D/ DISCUSSION - CONCLUSION

Le travail esquissé ici s'est déroulé sur une période de 6 mois. Cette période relativement courte nous a néanmoins permis de faire de nombreuses combinaisons de milieux et d'étudier de nombreux paramètres à court terme. Nous avons expérimenté deux milieux minéraux de base: WPM et MS; le milieu MS s'est avéré meilleur pour l'élongation et l'enracinement. Notre étude a été étendue surtout dans l'expérimentation d'une gamme importante de balances hormonales: un total de 68 milieux ou combinaisons hormonales ont été testés et plus de 2500 explants utilisés. Les informations exposées ici au cours de cette première tentative de culture *in-vitro* d'*Acacia raddiana* (Savi), nous permettent de nous rendre compte des difficultés que cette espèce pourrait présenter face aux techniques de micropropagation *in-vitro*.

Il est souvent nécessaire de définir un milieu permettant une élongation de la pousse feuillée avant d'entamer le processus d'enracinement. Cependant, pour quelques espèces telles que Peuplier, Saule, et Tremble, l'élongation et l'enracinement prennent place sur le même milieu (D. CORNU - M. BOULAY, 1986). En 1988 A. MITTAL, R. AGARWAL et S.C. GUPTAL ont obtenu l'enracinement des explants d'*Acacia auriculiformis* sur un milieu de multiplication. Nous avons dans le cas présent utilisé les mêmes milieux pour analyser les caractéristiques de croissance et d'enracinement *in-vitro* des microboutures juvéniles d'*Acacia raddiana*.

"Toutes les méthodes de culture *in-vitro* ont pour but d'obtenir à partir d'un explant des pousses feuillées" (D. CORNU - M. BOULAY, 1986); S. ZOK (1985) rappelait que "le taux de multiplication représente le nombre de pousses secondaires formées par explants initial"; O. MONTEUUIS - M.C. BON (1985) estiment avoir obtenu un taux de multiplication faible au cours de leurs travaux sur le microbouturage du Sequoia Géant. Des examens sous loupe binoculaire leur ont révélé l'absence de néoformation de bourgeons, et ils ont attribué les dénombrements effectués à l'expression morphogène de bourgeons préexistants.

Au cours de nos essais, nous avons obtenu le développement d'un seul bourgeon axillaire par explant. Nous estimons que les balances hormonales testées ont maintenu la dominance apicale du bourgeon supposé préexistant, dominance qui aurait empêché la prolifération par des néoformations d'autres bourgeons. S. ZOK (1985) a utilisé des doses de 15 mg/l de Kinétine ou 10 mg/l de BAP pour briser la dominance apicale réputée forte chez le Caféier. Des doses de 0.5 mg/l de BAP combinées à 0.1 mg/l d'AIB ou d'ANA, incorporées au milieu MS, sont restées sans effet sur l'*Acacia raddiana*, alors que chez l'*Acacia albida* que nous avons utilisé en témoin, nous avons dénombré jusqu'à 8 pousses par explant mesurant de 1 à 20 mm de long, après 45 jours de mise en culture. Ceci laisse penser que les balances hormonales peuvent être très variables d'une espèce à l'autre, et que celles testées au cours de nos essais ont été peu adéquates pour lever la dominance apicale chez le raddiana et provoquer la prolifération de pousses.

Néanmoins le tableau récapitulatif nous montre qu'un taux de multiplication est obtenu à partir des noeuds formés par chaque explant. Ce taux qui est en moyenne de 6.42 au bout de 6 mois n'est pas du tout des moindres, en considérant que le taux minimal acceptable est de 1 c'est-à-dire que la microbouture se développe et donne une pousse feuillée.

Chacun des facteurs analysés (caulogénèse, enracinement, callogénèse), a présenté une grande hétérogénéité dans son expression même observée sur le même milieu de culture. En effet le matériel végétal qui a servi d'élément de base pour cet essai de recherche est constitué de semis provenant de pieds-mères différents et de localités aussi différentes. Nous rappelons que les graines d'un même pied-mère constituent une famille. Nous avons utilisé ainsi 10 familles de 10 ou 24 graines. La variabilité génétique inter et aussi intra familles pourrait expliquer l'hétérogénéité des résultats. Nous n'avons pas recherché des effets clones, les clones étant très nombreux et les effectifs par clone étant faibles surtout en début d'expérience.

Les analyses ont porté sur les effets familles. Les résultats obtenus montrent que les familles ont des comportements différents quant à leur aptitude à la croissance de la partie aérienne et à l'enracinement des plantules *in-vitro*. Pour ces deux caractères, la famille 86/0835 présente une meilleure aptitude globale surtout dans la première série de cette expérience. Elle a relativement généré des plantes plus développées, des racines plus nombreuses et plus longues et cela quel que soit le milieu utilisé. Les familles 88/2196 et 88/2197 ont présenté une élongation de tiges relativement satisfaisante dans l'ensemble de l'expérience, et pourraient être retenues en culture *in-vitro* pour ce caractère. Les familles 88/2193 et 88/2194 sont les moins bonnes. Les autres familles sont représentées par des effectifs faibles (11 à 16 individus), ce qui pourrait expliquer leur position intermédiaire.

Nous avons aussi tenté de rechercher d'éventuels effets milieux sur tous les facteurs analysés. Dans la première série où nous n'avons pas observé le développement des calcs, cette étude a porté sur l'élongation et l'enracinement (nombre et longueur des racines). Nous avons constaté que les milieux de cette série, bien que très différents par leur composition hormonale ne provoquaient pas d'effets discernables. Les résultats obtenus pour l'élongation et surtout pour l'enracinement n'étaient pas différents, de façon significative du témoin sans hormone. Une interprétation possible est que la présence d'hormones exogènes n'est pas indispensable à la croissance de la partie aérienne et à l'enracinement des premières microboutures *in-vitro* d'*A. raddiana* issues de la germination des semis. L'apport de certaines balances hormonales s'avèreraient quelquefois défavorables. C'est le cas observé avec les milieux 0102C et 0102D où l'apport de la BAP a eu un effet plutôt dépressif pour l'élongation des tiges. Les jeunes raddianas possèderaient donc un niveau hormonal endogène suffisant pour entretenir un développement complet des microboutures *in-vitro*, pourvu que le milieu minéral de base soit adéquat. Pour l'instant le milieu de MURASHIGE et SKOOG dilué de moitié (MS/2) et contenant du charbon actif pourrait être retenu, eu égard aux résultats obtenus avec le milieu 0401MS.

La recherche d'effets milieux dans la production des calcs a fait ressortir deux observations essentielles: d'une part toutes les balances hormonales testées en l'absence de charbon actif (CA -) (2ème et 3ème séries d'expériences) ont produit d'importants calcs; ce qui n'était pas le but recherché dans ce travail. Cette callogenèse était systématique quel que soit la nature et les doses d'hormones. Ceci nous incite à penser que la callogenèse dépendrait soit de la composition du milieu minéral (WPM, et MS). M. DUFOUR, P. DUBLIN (1985), écrivaient en substance: "le milieu normal de MURASHIGE et SKOOG, utilisé pour l'étude des facteurs physiques, peut être considéré comme un milieu riche à tendance callogène"; soit de la présence d'hormones exogènes qui élèveraient le niveau hormonal déjà suffisant chez les boutures issues jeunes semis. Ceci aurait pour effet de provoquer la formation des calcs par une prolifération trop importante de cellules. D'autre part le charbon actif aurait joué deux rôles importants: il a non seulement empêché la callogenèse dans les milieux qui en contenaient, mais aussi il aurait tendance à favoriser l'enracinement, car toutes les formations racinaires obtenues l'ont été surtout dans des milieux contenant du charbon actif. C'est le cas de tous les milieux de la première série et de certains milieux de la troisième série (CA +).

Le charbon actif agirait par adsorption de certaines substances quand leur présence dépasse un certain seuil dans le milieu de culture (GASPAR et al., 1983). Il ressort de ces observations que les plantules juvéniles d'*A. raddiana* peuvent être propagées de manière illimitée par culture *in-vitro*; l'incorporation du charbon actif au milieu choisi (avec ou sans hormone) est nécessaire si l'on veut éviter les proliférations de calcs.

Nous avons également remarqué que la réactivité des explants (élongation, enracinement) diminuait de façon très sensible au cours des repiquages. La plupart des explants étaient certes étouffés par la prolifération des cals (séries 2 et 3). Ceux qui ne l'étaient pas présentaient un développement notamment de la partie aérienne relativement très lent par rapport à la série 1. En 1990, A. GALIANA, A. TIBOK et E. DUHOUX ont remarqué que le meilleur taux de multiplication (40) d'*Acacia mangium*, en propagation *in-vitro*, était obtenu à la première subculture. Ce taux avait chuté entre 10 et 20 à la seconde subculture. Cette chute de réactivité pourrait s'expliquer par un vieillissement des tissus de plante au cours des subcultures.

La phase d'acclimatation, décrite comme étant assez délicate pour les vitroplants, nous a paru assez aisée avec l'utilisation des mottes Melfert. Les racines formées *in-vitro* dégénèrent au cours de cette phase et sont remplacées par de nouvelles. Ces racines ne semblent pas adaptées aux conditions naturelles (M. BOULAY, 1984, cité par O. MONTEUUIS et M.C. BON, 1985). Elles sont néanmoins à l'origine des régénérations ultérieures (O. MONTEUUIS et M.C. BON, 1985).

L'étude des voies de clonage d'*Acacia raddiana* (Savi), qui vient d'être esquissée ici, montre que cette Légumineuse bien adaptée à des conditions de climats chauds et secs et à des sols arides, peut être propagée par culture *in-vitro*. Les résultats obtenus montrent clairement une certaine variabilité au niveau génotypique que l'on rencontre souvent chez d'autres espèces. L'effet familial ou même génotypique qui a été mis en évidence ici constitue un élément essentiel dans l'estimation de l'aptitude à la micropropagation. Le choix et l'adoption de milieux de culture appropriés sont recommandés quand on veut mettre au point une technique de clonage *in-vitro* pour un grand nombre de génotypes différents. L'effet milieu et les interactions génotypes-milieux sont aussi des facteurs susceptibles d'interférer sur la réactivité des explants. Outre ces paramètres essentiels, les conditions de culture *in-vitro* (température et lumière) sont également très utiles pour l'analyse rigoureuse et la compréhension des aspects physiologiques inhérents à la micropropagation. Des orientations ultérieures en matière de recherche pourraient porter sur les problèmes liés au vieillissement clonal c'est-à-dire la baisse de réactivité des explants au cours des subcultures. Une autre voie de recherche axée sur l'amélioration du taux de multiplication qui constitue l'objectif principal en micropropagation, mériterait d'être explorée chez *Acacia raddiana*.

## BIBLIOGRAPHIE.

- ABDULAH A.A., GRACE J. and YEOMAN M.M., 1986.** Rapid micropropagation of *Calabrian pine* from primary and secondary buds on shoot explants. *CAN. J. FOR. RES.* Vol. 16, 1986. pp.637-641.
- AGARWAL R., MITTAL A. & GUPTA C.S., 1989.** In vitro development of plantlets from axillary buds of *Acacia auriculiformis* - a leguminous tree. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 19. C 1989 Kluwer Academic Publishers. pp.65-70.
- Anonyme, 1986.** Amélioration génétique des arbres forestiers. *R.F.F. XXXVIII - n° spécial.* 288 p.
- Anonyme. 1990.** Programme des systèmes de Production animale et végétale (science de l'agriculture, de l'alimentation et de la nutrition). *C.R.D.I.*
- Anonyme, 1990.** Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi-arides. Session organisée du 20 Mars au 6 Avril 1990 à Paris et à Nancy par le Groupe d'Etude de l'Arbre. pp.36-39.
- Anonyme, 1989.** Trees for development in sub-saharan Africa. Kenya, February 1989. *International Foundation for Science (I.F.S.).* pp.195-239, 281-286.
- Anonyme, 1989.** Séminaire sur les Biotechnologies Appliquées à l'Afrique; organisé par la faculté des Sciences agronomiques de Gembloux sous le patronage de la Région de Wallone à Dakar (Sénégal). pp.163-181.
- AUBREVILLE A., 1950.** Flore forestière soudano-guinéenne. *A.O.F. Cameroun-A.E.F.* pp.247-250
- AUBREVILLE A., 1970.** "Climats-Forêts et Désertification de l'Afrique tropicale". Société d'Editions géographiques maritimes et coloniales. Paris 1949. Catinot (R). Boiset Forêts des Tropiques. 268 p.
- BAPAT V.A., MHATRE M. and RAO P.S., 1985.** Regeneration of plants from the culture of leaves and axillary buds in mulberry (*Morus indica* L.). *Plant Cell Reports* (1985) 4 pp.78-80.
- BERHAUT J., 1975.** Flore Illustrée du Sénégal; Dicotylédones; T.IV. Ficoïdées à Légumineuses. Librairie CLAIRAFRIQUE Dakar. 625 p.
- BLACKMON J.W. and AULT R.J., 1987.** *in-vitro* propagation of *Ferocactus acanthodes* (Cactaceae). *HORTSCIENCE,* vol. 22(1).pp.126-127.
- BON M.C.- MONTEUUIS O., 1985.** Microbouture du *Sequoia Géant*. Extrait des *Annales Afocel.* pp.50-87.

BOULAY M.- CORNU D., 1986. La Multiplication Végétative; Techniques Horticoles et culture in vitro. R.F.F. XXXVIII - n° Sp. pp.60-68.

BOXUS PH., COUMANS M., GASPAR TH., GIOT-WIRGOT P. & MISSION J.P., 1983. Rôle du charbon de Bois dans les milieux de cultures de tissus végétaux. Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Cent 48/4, 1983. pp.1151-1157.

BROWN K. and GATES P.J., 1988. *Acacia tortilis* and *Prosopis cineraria*: Leguminous Trees for Arid Areas. Outlook on Agriculture, Volume 17 N° 2, 1988. pp.61-64.

BURGER D. W. , 1987. In-vitro Micropropagation of *Eucalyptus sideroxylon*. HORTSCIENCE 22(3) pp.496-497.

DORE C., 1989. Cinquantenaire de la culture in vitro chez les végétaux. Versailles (France). Les colloques del'INRA, n° 51. 347 P.

CORNET FRANCOIS, 1982. Recherches préliminaires sur la symbiose de deux *Acacias* tropicaux (*A. raddiana* SAVI et *A. holosericea* A.Sunn.) avec *rhizobium* sp et un champignon endomycorhizien (*Glomus mosseae* Nicol. et Gerd.).Mémoire 120 p.

DAGNELIE P., 1975. Théorie et Méthodes statistiques. Applications agronomiques. Vol. II Les méthodes de l'interférence statistique. C. 1975, Les Presses agronomiques de Gembloux, A.S.B.L. Belgique. 457 p.

DHAWAN V. and BHOJWANI S. S., 1985. In vitro vegetative propagation of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. Plant Cell Reports (1985) 4. pp.315-318.

DAVIES D.W., 1984. Multiplication végétative in-vitro de *Faidherbia albida* (Del) A. Chev. (*Acacia albida* Del), D.E.A. Université Dakar. 70 p.

DAVIES D. and DUHOUX E., 1985. Caulogenèse à partir des Bourgeons cotylédonaires d'*Acacia albida* et Influence du Saccharose sur la Rhizogenèse. J. Plant physiol. Vol. 121. pp.175-180.

DEMARLY Y. & SIBI M. , 1989. Amélioration des plantes et Biotechnologies.- John Libbey (JL) Eurotext. London-Paris. 152 P.

DIALLO NICOLAS et DUHOUX EMILE, 1983. Organogenèse et Multiplication in vitro chez l'*Eucalyptus camaldulensis*. J. Plant Physiol. Vol. 115. pp.177-182.

DUFOUR M., DUBLIN P., 1985. Quelques données sur la multiplication végétative in-vitro des *Cacaoyers* cultivés (*Theobroma cacao*). Café Cacao Thé, vol. XXIX, n° 4, Oct.-Dec. 1985. pp.235-244.

**ECONOMOU A.S. and READ P.E.**, 1986. Microcutting production from Sequential Reculturing of Hardy Deciduous Azalea Shoot Tips. *HORTSCIENCE*, vol. 21(1), February 1986. pp.137-139.

**FIORINO P. and LORETI F.**, 1987. Propagation of Fruit Trees by Tissue Culture in Italy. *HORTSCIENCE*, VOL. 22(3), JUNE 1987. pp.353-358.

**FOURNIER F. et SASSON A.**, 1983. Ecosystèmes forestiers tropicaux d'Afrique. Recherche sur les ressources naturelles XIX. ORSTOM-Unesco. pp.440-473.

**GALIANA A., TIBK A. and DUHOUX E.**, 1991. In-vitro propagation of the Nitrogen-fixing tree-legume *Acacia mangium* Willd. Plant and Soil 135. C 1991 Kluwer Academic Publishers PLSO 8957. pp.151-159.

**GASSAMA Y.K. et DUHOUX E.**, 1986-1987. Micropropagation de l'*Acacia albida* DEL (Leguminosae) adulte. Bulletin de l'I.F.A.N. T. 46, Sér. A, n° 3-4. pp.314-320.

**GEORGE F.E. PhD and SHERRINGTON D.P. MSc**, 1984. Plant Propagation by Tissue Culture.- Handbook and Directory of Commercial Laboratories. Printed in Great Britain by Antiny Rowe Ltd., Chippenham, Wilts. 690 p.

**GEORGE E.F., GEORGE H.J. & PUTTOCK D.J.M.**, 1987. Plant Culture Media. Volume 1: Formulations and Uses. Printed in Great Britain by The Eastern Press Ltd., Reading, Berks. 480 p.

**GEORGE E.F., GEORGE H.J. & PUTTOCK D.J.M.**, 1988. Plant Culture Media. Volume 2: Commentary and Analysis. Printed in Great Britain by The Eastern Press Ltd., Reading, Berks. 408 p.

**GIFFARD P.L.**, 1971. L'arbre dans le paysage sénégalais. Sylviculture en zone tropicale sèche. Tome 1. Centre technique forestier tropical. Dakar. 425 p.

**GOREUX A., JORDAN M. and PEDRAZA J.**, 1985. In-vitro Propagation Studies of Three *Prosopis* Species (*P.alba*, *P.chilensis* and *P.tamarugo*) Through Shoot-tip Culture. *Gartenbauwissenschaft*, 50 (6). S. ISSN 0016-478X. pp.265-267.

**ARLAN J.R.**, 1975. Les plantes cultivées et l'homme. ACCT-Conseil international de la langue française. P.U.F. 414 P.

**HAUDRICOURT A.G. & HEDRIN L.**, 1987. L'homme et les plantes cultivées.- A.-M. Métailié; 5, rue de Savoie-75006 Paris. pp.8-34.

**FEIJO A.J. and PAIS M.S.S.**, 1990. Rejuvenation of adult specimens of *Castanea sativa* MILL: trough in vitro propagation. Plenum Press, New York, 1990. pp.383-387.

- LEGESSE K. & EDDY Van der M.**, 1990. Population ecology of *Acacia tortilis* in the semi-arid region of the Sudan.- Journal of vegetation Science 1. pp.419-424.
- MAPES M.O. and SKOLMEN R.G.**, 1976. *Acacia koa* Gray plantlets from somatic callus tissue. The journal of Heredity 67. pp.114-115.
- MAPES O.M. and ZAERR J.B.**, 1982. Action of Growth Regulators in tissue Culture in forestry, Forestry Science Eds Martinus Nyho and Dr Junk. pp.231-249.
- MARTIN B.**, 1977. Le bouturage des arbres forestiers. Progrès récents - Perspectives de Développement. Class. Oxford 232.328. R.F.F. XXIX-4-1977. pp.245-262.
- MERHA-PALTA A., SMELTZER R.H. and MOTT R.L.**, 1978. Hormonal control of induced organogenesis. Experiments with excised plant parts of *loblolly pine*. The Journal of the Technical Association of the Pulp and Paper Industry. Vol. 61, N° 1, January 1978. pp.37-40.
- NONGONIERMA A.**, 1978. Contribution à l'Etude Biosystématique du Genre *Acacia* Miller en Afrique Occidentale. VI. Distribution bioclimatique des différents taxa. - Extrait du Bulletin de l'Institut Fondamental d'Afrique Noire. Tome 39, série A, n° 2, Avril 1977. I.F.A.N. Dakar pp.318-339.
- PENCE C.V. and SOUKUP G.V.**, 1986. Plant Regeneration from *Trillium Spp.* HORTSCIENCE, VOL. 21(5), October 1986. pp.1211-1213.
- PUITE K.J., DONS J.J.M., HUIZING H.J., KOOLA.J., KOORNNEEF M. & KRENS F.A.**, 1988. Progress in Plant Protoplast Research. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture. Kluwer Academic Publishers. 316 p.
- RAO A.N. and YUSOFF A.M.**, 1989. Proceeding of the seminar on Tissue culture of Forest Species. FRIM & IDRC. 215 p.
- SASSON A. and COSTARINI V.**, 1989. Plant Biotechnologies for Developing Countries. Proceedings of an International Symposium organised by CTA and FAO, 26-30 June 1989, Luxembourg. 368 p.
- SKOLMEN R.G.**, 1986. *Acacia (Acacia koa Gray)*. Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol. 1: Trees 1. C Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp.375-384.
- SY A.**, 1990. Microbouture *in-vitro* de l'*Anacardier (Anacardium occidentale L.)*. Mémoire de 3ème année.- Station des cultures fruitières et maraichères de Gembloux - Belgique. 96 p.
- TA-WEI H. and TSE-AN S.**, 1984. Vegetative propagation of *Acacia auriculiformis* by leafy cuttings under mist spray. Taiwan R.O.C. pp.44-45.

VON MAYDELL H.J., 1983. Arbres et arbustes du Sahel. Leurs caractéristiques et leur utilisation. GTZ. Verlag Josef Margraf. Scientifics Books. 532 p.

ZOK S., 1985. La multiplication végétative in-vitro des *Caféiers* cultivés par culture de méristèmes et d'apex. ASIC, 11<sup>e</sup> Colloque, Lomé, 1985. pp.461-472.

## RÉSUMÉ

*Acacia raddiana*, Légumineuse arborescente, est une espèce bien adaptée aux conditions climatiques des zones arides. Elle est souvent utilisée en reboisement pour la régénération des biotopes en déperdition. Le présent travail de micropropagation d'individus juvéniles est une contribution à l'évaluation génétique de cette espèce à partir de clones à multiplication rapide. Les résultats analysés mettent en évidence deux faits essentiels: d'un côté, un effet génotypique important que révèlent des différences d'aptitude à la croissance des différentes familles de vitroplants; de l'autre, un effet milieu montrant que les microboutures de premier ordre se développent mieux sur le milieu simple de Murashige et Skoog dilué de moitié (MS/2) et contenant du charbon actif. Par ailleurs nous avons montré que l'addition de charbon actif est nécessaire aux cultures afin d'éviter la formation des cals en présence d'hormones végétales. Les interactions familles-milieus observées semblent indiquer la nécessité d'adapter les milieux de culture à chaque génotype afin d'obtenir une régénération totale des plantules *in-vitro*. La phase d'acclimatation des vitroplants chez *Acacia raddiana* a été menée avec succès.

**Mots-clés:** Zones arides - *Acacia raddiana* - Propagation *in-vitro* - Individus juvéniles - Effets génotypiques - Balances hormonales.