

Acta Bot. Gallica, 2000, 147 (3), 257-266.

Régénération de vitroplants par embryogenèse somatique à partir d'embryons zygotiques immatures chez une espèce adaptée à la sécheresse : *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* (Savi.) Brenan

par Djibril Sané⁽¹⁾, Alain/Borgel⁽²⁾ Jean-Luc Verdeil⁽³⁾ et Yaye Kène Gassama/Dia⁽¹⁾

(1) Département de Biologie Végétale, Université Cheikh Anta Diop, Dakar-Fann, B.P. 5005, Sénégal

(2) IRD, Laboratoire GeneTrop, B.P. 5045, F-3032 Montpellier Cedex

(3) CIRAD-CP, Laboratoire GeneTrop, B.P. 5045, F-3032 Montpellier Cedex

arrivé le 20 octobre 1999, accepté le 3 janvier 2000

Résumé.- Des embryons somatiques de stade globulaire ont été obtenus sur des cals issus d'embryons zygotiques immatures d'*Acacia tortilis* subsp. *raddiana* après 90 à 100 jours de culture à l'obscurité sur des milieux VA enrichis de 2,4-D (acide 2,4-dichlorophénoxyacétique) (2, 4 et 8 mg/l) seul ou combiné à la BAP (benzyl amino purine) (1 et 0,5 mg/l). La prolifération de ces embryons a été optimisée en condition de photopériode (16 h jour / 8 h obscurité), 30 jours après le transfert des cals embryogènes sur un milieu MS/2 contenant 0,5 mg/l de BAP et 0,05 mg/l d'AIB (acide indol butyrique). Ces structures développent un axe bipolaire sur un milieu MS enrichi en ABA (acide abscissique) (2,6 et 5,2 mg/l) ou en saccharose (50 g/l). Les embryons somatiques matures se sont développés en vitroplants sur un milieu MS/2 sans hormone mais enrichi en saccharose (50 g/l).

Mots-clés : *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* - embryon zygotique - callogenèse - embryon somatique - vitroplant.

Abstract.- Using calli from immature zygotic embryos of *Acacia tortilis* subsp. *raddiana*, globular somatic embryos are obtained after 90 to 100 days culture in darkness on VA media added with 2,4-D (2,4 and 8 mg/l) alone or in combination with BAP (1 and 0,5 mg/l). Light and transfert on MS/2 medium containing BAP (0,5 mg/l) and AIB (0,05 mg/l) enhance proliferation of somatic embryos. ABA (2,6 and 5,2 mg/l) or high concentration of sucrose (50 g/l) allow development from globular to bipolar embryos. Development of mature somatic embryos into plantlets are obtained on MS/2 medium without hormon, but supplemented with high concentration of sucrose.

Key-words : *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* - zygotic embryo - callogenesis - somatic embryos - plantlet.

Fonds Documentaire IRD
Cote : B * 25508 Ex : 1



I. INTRODUCTION

Acacia tortilis subsp. *raddiana* (Savi.) Brenan est une Légumineuse forestière des régions tropicales sèches, particulièrement bien représentée dans la zone sahélienne (Von Maydell, 1983). Cette espèce joue un rôle important pour la qualité de son fourrage et le bois de feu qu'elle fournit. Sur le plan écologique, *Acacia raddiana* participe, par le système racinaire à la fois traçant et pivotant qu'il développe, à la stabilisation des sols (El Amin, 1991). Par sa capacité à fixer l'azote atmosphérique en association avec des bactéries du genre *Rhizobium*, il contribue à la restauration du niveau de fertilité des sols (Dommergues *et al.*, 1988).

L'évaluation au champ de la diversité génétique et des potentialités agro-forestières de cette espèce allogame et hétérozygote est faite en utilisant des provenances ou des familles de demi-frères (Borgel *et al.*, 1998). Il en est de même pour les tests de symbiose avec les souches de bactéries fixatrices d'azote. Mais le cumul des variabilités génétiques de l'hôte et du symbiote et de la variabilité environnementale rend imprécis les tests d'évaluation. L'utilisation de clones permettrait de maîtriser la variabilité génétique de l'hôte (Mullin & Park, 1992). La production de clones d'acacias constitue une perspective intéressante pour la mise en place des essais multi-clonaux dans le cadre d'une évaluation des génotypes sélectionnés. Ceci permettra de repérer des individus élites qui seront utilisés en vergers grainiers et la diffusion de semences améliorées pour les programmes de reboisement.

Peu d'auteurs se sont intéressés, chez *A. raddiana*, au clonage *in vitro* de sujets sélectionnés (Borgel *et al.*, 1993, 1998 ; Detrez, 1994 ; Sané, 1994 ; Nandwani, 1995). Cependant, comme la plupart des ligneux de la famille des Légumineuses, l'espèce apparaît récalcitrante à la régénération *in vitro*.

Dans cette étude, nous décrivons pour la première fois une méthodologie fiable et très performante de production rapide de clones d'*A. raddiana* par embryogenèse somatique pour la réalisation des différents tests d'évaluation et d'amélioration génétique de l'espèce dans les systèmes agroforestiers contrastés de la zone sahélienne.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. Matériel végétal

Le matériel de départ est constitué de gousses immatures récoltées entre les 11 et 21 janvier 1995 sur des arbres adultes âgés d'une vingtaine d'années, plantés dans l'enceinte de l'Université de Dakar. Après dissection des gousses, les graines sont désinfectées en conditions stériles par immersion durant 15 mn dans une solution d'hypochlorite de calcium à 7% puis rincées à l'eau distillée stérile. Les embryons zygotiques sont prélevés aseptiquement, puis cultivés sur différentes variantes de milieux de callogenèse.

B. Milieux de culture

Pour induire la callogenèse et initier l'embryogenèse, les explants sont cultivés pendant 90 à 100 jours dans des bocaux de 800 ml contenant 50 ml de milieu à base des sels minéraux et du mélange vitaminique de Von Arnold et Eriksson (1981). Ces milieux ont été complétés avec du 2,4-D (2, 4, 8 mg/l) combiné ou non à la BAP (1 mg/l), de l'adénine (40 mg/l), du saccharose (20 g/l) et solidifiés par la gélose à 0,7% (Bacto-agar Difco).

Afin de déterminer les conditions optimales de prolifération des embryons somatiques, les cals embryogènes obtenus ont été transférés en tubes (22 x 150 mm) contenant 20 ml

de milieux de culture à base des éléments minéraux (macro et micro-éléments) de Murashige et Skoog (1962) et de Von Arnold et Eriksson (1981) dilués de moitié (milieux MS/2 et VA/2) plus de la BAP (0,1 et 0,5 mg/l), de l'AIB (0, 0,5 et 0,05 mg/l) et du saccharose (30 g/l).

Les conditions de maturation des embryons somatiques produits ont été recherchées sur des milieux composés des éléments minéraux de MS, des vitamines de Nitsch et Nitsch (1965). Ils sont complétés soit avec de l'ABA (2,6 et 5,2 mg/l) plus du saccharose (20 g/l), soit du saccharose seul (50 g/l).

L'étape de la germination des embryons somatiques matures en vitroplants a été conduite en les isolant des cals, puis en les transférant sur un milieu de culture de base MS/2 sans hormone avec 50 g/l de saccharose.

Le pH de l'ensemble des milieux testés a été ajusté à 5,8 puis ils ont été stérilisés par autoclavage à 110 °C pendant 120 min.

C. Conditions de croissance

Toutes les étapes de la culture ont été menées dans des salles dont l'état hygrométrique a été maintenu homogène ($70 \pm 5\%$ d'humidité relative) par des brumisateurs (Bionaire 8T-201). La thermopériode (30 °C jour et 27 °C nuit) est également constante. La phase de callogenèse et d'initiation de l'embryogenèse a été réalisée à l'obscurité. Les étapes de prolifération des embryons et du développement des vitroplants ont été réalisées sous régime photopériodique de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité. L'éclairage est assuré par des tubes fluorescents (OSRAM L58 W77), situés à 50 cm par rapport aux cultures, avec une intensité lumineuse d'environ $80 \mu\text{E.S}^{-1}.\text{m}^{-2}$. Un apport d'éclairage en rouge lointain, assuré par des ampoules à filament de tungstène de 220 volts, sous-volté à 55 volts, permet de compléter le spectre de lumière des tubes fluorescents.

III. RÉSULTATS

A. Induction de la callogenèse et initiation de l'embryogenèse

Les données morphologiques obtenues pendant 14 semaines d'observation révèlent trois étapes successives importantes dans l'évolution des cultures :

- une phase de dilatation des embryons zygotiques qui s'est initiée dès la première semaine et a affecté 67% des explants au cours de la deuxième semaine de culture ;
- une phase de prolifération cellulaire qui s'intensifie après la deuxième semaine de culture ; au cours de celle-ci, les explants dilatés se transforment en cals de couleur blanchâtre, d'abord spongieux puis nodulaires compacts au moment de l'apparition des globules embryonnaires ;
- la dernière étape est une phase d'une intense activité morphogénétique au cours de laquelle on observe sur les cals l'apparition, entre le 90^e et le 100^e jour de l'induction, des nodules embryonnaires bien épidermisés et translucides (Fig. 1, A).

En suivant la fréquence d'apparition des cals embryogènes à partir des explants primaires, on constate que l'induction de la callogenèse chez *A. raddiana* ne nécessite pas des niveaux d'auxine élevés (Fig. 2). En effet, l'analyse de variance au seuil de 95% montre que la dose de 2 mg/l de 2,4-D est plus favorable à la callogenèse et que, à un niveau d'auxine constant, l'adjonction au milieu de culture de 1 mg/l de BAP permet d'obtenir la fréquence la plus élevée.

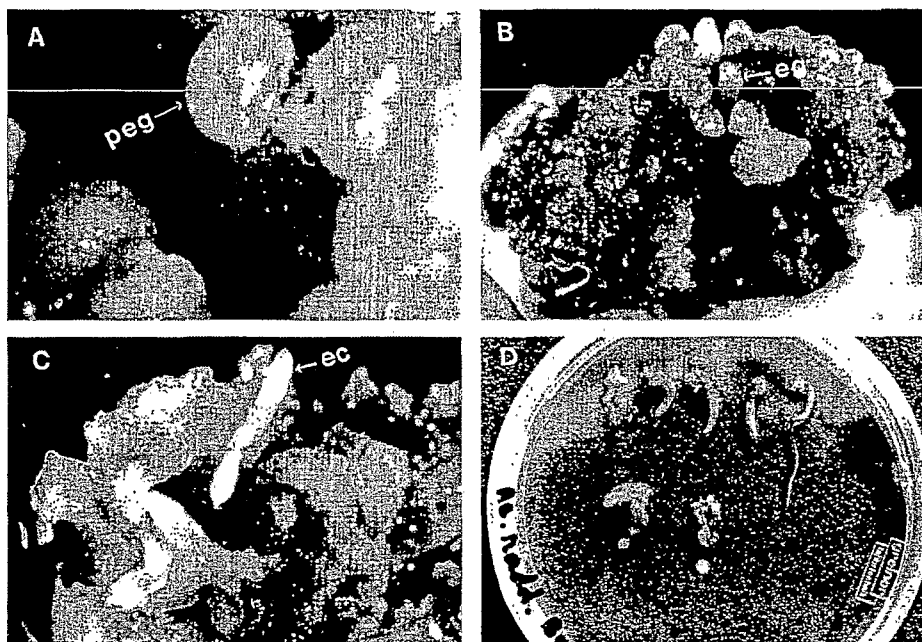


Fig. 1.- Régénération d'embryons somatiques et obtention de vitroplants chez *Acacia tortilis* subsp. *raddiana*.

- A. Induction de la callogenèse et initiation de la proembryogenèse : apparition des proembryons globulaires (peg) à l'obscurité sur un cal compact (c) obtenu à partir d'un embryon zygotique immature d'*Acacia tortilis* subsp. *raddiana* cultivé pendant 90 jours sur un milieu contenant 2 mg/l de 2,4-D + 1 mg/l de BAP (x 6,7).
- B. Expression de l'embryogenèse somatique : prolifération des embryons globulaires (eg) en condition de photopériode (16 h jour / 8 h obscurité) à partir d'un cal cultivé sur un milieu contenant 0,5 mg/l de BAP + 0,05 mg/l d'AIB (x 4,5).
- C. Maturation des embryons somatiques; les embryons globulaires développent un axe bipolaire et deviennent des embryons de stade cotylédonnaire (ec) après 45 jours de culture sur milieu contenant 2,6 mg/l d'ABA (x 4,7).
- D. Germination des embryons somatiques matures et obtention de vitroplants : entrée en croissance des méristèmes caulinaire et racinaire après 28 jours de culture sur un milieu contenant une forte concentration de saccharose (x 1,4).

Fig. 1.- Somatic embryos regeneration and obtention of plantlets from *Acacia tortilis* subsp. *raddiana*.

- A. Induction of callogenesis and pro-embryogenesis initiation: appearance of globular proembryos (peg) on a compact callus (c) obtained from an immature zygotic embryo of *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* cultivated in the dark room during 90 days in medium containing a combination of 2,4-D (2 mg/l) and BAP (1 mg/l) (x 6,7).
- B. Expression of somatic embryogenesis: globular embryos (eg) proliferation in photoperiodic condition (16 h day / 8 h darkness) from a callus cultivated in medium containing BAP (0,5 mg/l) and AIB (0,05 mg/l) mixture (x 4,5).
- C. Maturation of somatic embryos: globular somatic embryos evolve toward a bipolar axis and develop cotyledonary embryos (ec) after 45 days culture on medium containing ABA (2,6 mg/l) (x 4,7).
- D. Germination of mature somatic embryos and development of plantlets: apical growth of stem and root meristems of mature somatic embryos after 28 days on medium with high concentration of sucrose (50 g/l) (x 1,4).

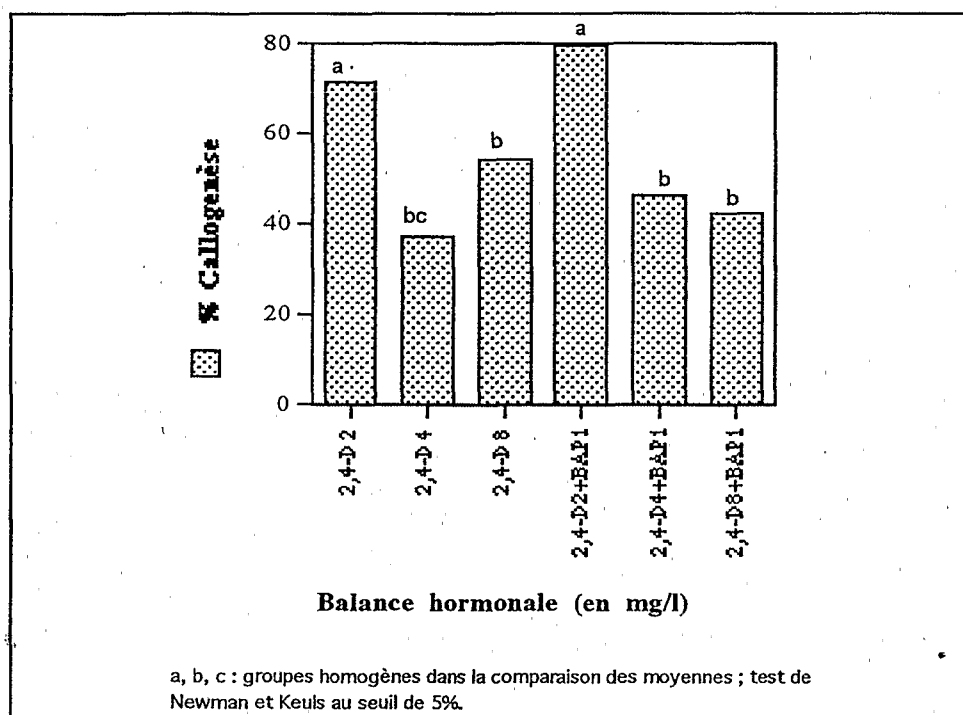


Fig. 2.- Histogramme montrant l'effet de la balance hormonale sur l'apparition des cals embryogènes à partir des embryons zygotiques d'*Acacia tortilis raddiana* après 30 jours de culture sur les milieux d'induction (24 explants/milieu).

Fig. 2.- Effect of hormonal balance on embryogenic calli apparition from *Acacia tortilis raddiana* zygotic embryos after 30 days in induction media (24 explants/medium). a, b, c: homogeneous classes in mean comparison; Newman and Keuls test at 5% level.

B. Expression de l'embryogenèse somatique

Lorsque les cals nodulaires sont transférés en régime photopériodique, on constate après deux à trois semaines de culture une prolifération plus ou moins rapide d'embryons somatiques de stade globulaire. Ceux-ci verdissent et leur contour devient plus réguliers vers la quatrième semaine de culture (Fig. 1, B).

Au bout de la quatrième semaine nous remarquons que la combinaison hormonale BAP (0,5 mg/l) + AIB (0,05 mg/l) permet d'optimiser le nombre moyen des structures embryonnaires apparaissant par cal embryogène (16 embryons / cal) (Tableau 1). Cette balance hormonale offre un meilleur compromis entre la croissance des cals (exprimée par le poids frais moyen) et la prolifération des embryons globulaires.

C. Maturation des embryons somatiques

Les embryons somatiques de stade globulaire obtenus en conditions d'expression de l'embryogenèse développent un axe bipolaire lorsqu'on transfère les cals embryogènes sur des milieux enrichis en ABA ou en saccharose. En effet, dans nos conditions expérimen-

Tableau 1.- Influence des conditions minérales et hormonales sur la prolifération des embryons somatiques de stade globulaire et la croissance des cals chez *Acacia tortilis raddiana* après 30 jours de culture sur les milieux d'expression de l'embryogenèse.

Table 1.- Mineral and hormonal conditions effect on globular embryos proliferation and growth of calli from *Acacia tortilis raddiana* after 30 days in somatic embryogenesis expression media.

Milieux de culture		Nombre moyen d'embryons globulaires/cal embryogène	Poids frais moyen des cals (mg)
Solutions minérales	Balances hormonales (mg/l)		
MS/2	BAP (0) + AIB (0)	07 ^b	255 ^{bc}
	BAP (0,5) + AIB (0,05)	16 ^a	380 ^b
	BAP (1) + AIB (0,5)	05 ^c	465 ^a
VA/2	BAP (0) + AIB (0)	03 ^c	217 ^c
	BAP (0,5) + AIB (0,05)	09 ^b	436 ^b
	BAP (1) + AIB (0,5)	03 ^c	601 ^a

Effectifs : 24 cals embryogènes/condition de milieu.

Dans chaque colonne, les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 95%. Comparaison des moyennes : test de Newman et Keuls au seuil de 5%.

Tableau 2.- Influence de l'ABA (2,6 et 5,2 mg/l) et du saccharose (50 g/l) sur la maturation et l'embryogenèse adventive de cals d'*Acacia tortilis raddiana* après 45 jours de culture sur milieu MS.

Table 2.- Effect of ABA (2,6 and 5,2 mg/l) and sucrose (50 g/l) on maturation and adventitious embryogenesis from *Acacia tortilis raddiana* calli after 45 days culture in MS medium.

Régulateurs de croissance (mg/l)	Nombre moyen d'embryons globulaires/cal embryogène	Nombre moyen d'embryons cotylédonaire/cal embryogène	% d'embryons cotylédonaire avec embryons adventifs / cal embryogène	Nombre moyen d'embryons adventifs/embryon cotylédonaire	* % d'embryons globulaires dilatés
ABA	2,6	6,6 ^a	03 ^a	36	8,1 ^a 00
	5,2	8,0 ^a	00 ^b	00	00 ^c 100
Saccharose 5000	7,5 ^a	04 ^a	03	3,3 ^b	00

Les observations ont été faites sur des cals embryogènes ayant présenté plus de 5 structures globulaires visibles à l'œil nu.

* : pourcentage de cals présentant des embryons globulaires ayant subi une dilatation par milieu de culture (24 répétitions par milieu de culture).

Dans chaque colonne, les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 95%. Comparaison des moyennes : test de Newman et Keuls au seuil de 5%.

tales on remarque, après 45 jours de culture, la présence de nombreux embryons de stade cotylédonaire sur les cals (Fig. 1, C).

Les taux de conversion des embryons du stade globulaire au stade cotylédonaire obtenus au bout de 45 jours de maturation demeurent significativement identiques que ce soit en présence de 2,6 mg/l d'ABA ou bien en présence de 50 g/l de saccharose (Tableau 2). En revanche, cette dose d'ABA stimule davantage l'apparition et le développement d'une embryogenèse adventive à partir des structures bipolaires. L'augmentation de la dose d'ABA (à 5,6 mg/l) provoque une réaction phytotoxique se traduisant par une dégénérescence (dilatation) des embryons globulaires.

D. Conversion des embryons somatiques et obtention de vitroplants

En transférant les embryons de stade cotylédonaire sur les milieux de germination enrichis uniquement de saccharose (50 g/l), on constate qu'ils développent une tige et une racine, ce qui témoigne de la présence, au sein de ces formations de type embryon, d'un axe bipolaire fonctionnel (Fig. 1, D).

Les vitroplants d'origine somatique et ceux issus de la germination des embryons zygotiques présentent le même mode de croissance (Tableau 3) ; ils développent un système racinaire de type pivot. Le rapport longueur tige/longueur racine variable entre 0,5 et 0,7 montre que leur racine s'allonge plus rapidement que la tige.

IV. DISCUSSION

A. Facteurs du milieu et callogenèse

Le procédé de régénération que nous avons développé chez *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* permet de produire de façon répétitive des vitroplants grâce à un processus d'embryogenèse indirecte qui implique le passage des explants primaires par un stade cal. Les embryons zygotiques immatures utilisés, dans le cadre de notre étude, comme explants de départ se sont révélés, chez cette espèce, comme un matériel de choix pour la régénération

Tableau 3.- Allongement moyen de la tige et de la racine pivotante (en mm) : croissance comparée entre vitroplants issus de la germination des embryons somatiques et des embryons zygotiques d'*Acacia tortilis raddiana* après 30 jours de culture sur milieu MS/2 avec 50 g/l de saccharose.

Table 3.- Comparative stem and root growth (in mm) of plantlets from somatic vs zygotic embryos of *Acacia tortilis raddiana* after 30 days culture on MS/2 germination medium with 50 g/l of sucrose.

Type de vitroplants	Longueur moyenne des tiges	Longueur moyenne des racines	Rapport Longueur tige / Longueur racine
Somatiques	10,6 ^b	16,5 ^b	0,6
Zygotiques	73,0 ^a	125,1 ^a	0,5

Les longueurs moyennes des tiges et des racines ont été déterminées à partir d'un effectif de 24 explants / type de vitroplant.

Intervalle de confiance P = 95%; comparaison des moyennes : test de Newman et Keuls au seuil de 5%.

d'embryons somatiques comparés à d'autres types d'explants tels que les téguments internes et les segments d'hypocotyles de jeunes plants (résultats non publiés).

Chez *Acacia tortilis* subsp. *raddiana*, l'initiation de la proembryogenèse s'effectue pendant l'induction de la callogenèse. Les proembryons sont visibles sur les cals entre le 90^e et le 100^e jour. L'étape de la callogenèse, qui correspond généralement à la phase la plus longue du processus de régénération (Verdeil, 1993), montre que les tissus utilisés sont très sensibles au 2,4-D et ne nécessitent pas des niveaux d'auxine élevés. La phase de croissance cellulaire, liée à la sensibilité au 2,4-D des tissus d'*A. raddiana*, survient dès la première semaine de culture. La multiplication des cellules débute au cours de la callogenèse, par une hyperpolarisation de certains polypeptides membranaires sous l'action de l'auxine (Barbier-Bryggoo *et al.*, 1989). Cette hyperpolarisation est expliquée par Goldsworthy & Rathore (1991) comme étant la conséquence d'une destabilisation de la polarité des champs électriques cellulaires qui serait à l'origine de la croissance désorganisée observée en présence du 2,4-D au cours de la callogenèse.

Cette étude montre, en outre, que l'apport de cytokinines exogènes, en particulier de la BAP, permet d'optimiser la fréquence d'apparition des cals embryogènes à partir des explants primaires d'*A. raddiana*. En effet, en agissant de façon synergique avec le 2,4-D (Branton & Blake, 1984 ; Sané, 1998), la BAP stimulerait davantage la sensibilité des tissus, en particulier celle des cellules compétentes, pendant la phase de la callogenèse.

B. Conditions d'obtention et évolution des embryons somatiques

La prolifération des structures embryonnaires globulaires à partir des cals embryogènes d'*Acacia tortilis* subsp. *raddiana* nécessite leur transfert en condition de photopériode, sur des séquences de milieux de cultures plus riches en cytokinine qu'en auxine. En effet, nous avons constaté que les cals perdaient leur potentialité embryogénétique lorsqu'ils étaient maintenus plus de 100 jours au contact de milieux de culture riches en 2,4-D. Nos résultats montrent que la fréquence optimale d'expression des embryons de stade globulaire (16 embryons par cal embryogène) s'obtient en cultivant les cals sur un milieu contenant de la BAP (0,5 mg/l) combinée à l'AIB (0,05 mg/l). La nécessité d'effectuer un tel rééquilibrage de la balance hormonale en faveur des cytokinines, pendant la phase d'expression de l'embryogenèse somatique, a été démontrée chez d'autres espèces comme le bananier (Dhed'A *et al.*, 1991) ou le cocotier (Verdeil, 1993). Ainsi, il apparaît que la BAP joue un rôle déterminant au cours du processus d'embryogenèse chez *A. raddiana* grâce, en particulier, à son action sur l'initiation de la proembryogenèse et la prolifération des globules embryogènes à la surface des cals.

La maturation des embryons somatiques, autrement dit leur passage du stade globulaire au stade cotylédonaire, nécessite, chez *A. tortilis* subsp. *raddiana*, l'utilisation de l'ABA ou d'un sucre non réducteur comme le saccharose à une très forte concentration dans le milieu de culture. Cette étape, au cours de laquelle l'axe embryonnaire et les cotylédons se mettent en place chez l'embryon globulaire, correspond à une succession de transformations physiologiques et biochimiques (Delseny *et al.*, 1989) qui rendent possible la germination ultérieure de l'embryon.

L'ABA, tout comme le saccharose (Skriver & Mundy, 1990 ; Afele *et al.*, 1992) joueraient un rôle essentiel dans l'acquisition de la tolérance à la dessiccation et l'accumulation des réserves. Chez *A. tortilis* subsp. *raddiana*, il est intéressant de constater après 45 jours de culture que l'ABA à 2,6 mg/l et le saccharose à 50 g/l présentent la même influence sur la maturation des embryons de stade globulaire. Ces doses permettent d'optimiser la fréquence d'apparition des embryons de stade cotylédonaire chez cette espèce.

Cependant, en augmentant la concentration d'ABA à 5,2 mg/l, il apparaît une réaction phytotoxique qui se traduit par une dégénérescence (dilatation) des embryons globulaires. Ceci laisse supposer qu'il existerait une dose seuil d'ABA au-delà de laquelle surviendrait un blocage du développement des structures embryogènes comme cela a été démontré chez *Picea abies* (Bercetche *et al.*, 1989). Par ailleurs, nous avons également constaté qu'une application de plus de 45 jours de 2,6 mg/l d'ABA provoque une inhibition de la germination ultérieure des embryons de stade cotylédonaire (résultats non publiés). Ceci renforce l'hypothèse (Ammirato, 1977 ; Bercetche *et al.*, 1989) d'un effet probable de l'ABA sur la dormance embryonnaire au cours de l'embryogenèse somatique.

Il apparaît donc que le saccharose offre un meilleur compromis entre la maturation et l'évolution des embryons somatiques d'*A. raddiana* en vitroplants.

C. Caractères de croissance des vitroplants

L'obtention de vitroplants à partir des embryons somatiques de stade cotylédonaire nécessite chez *A. tortilis* subsp. *raddiana* l'utilisation d'un milieu de culture riche en saccharose. Cette ultime étape du processus de régénération correspond, chez cette espèce, à l'entrée en croissance simultanée et sur un même milieu de culture des méristèmes caulinaire et racinaire traduisant ainsi l'existence d'un axe bipolaire fonctionnel au sein de ces formations de type embryon. En outre, nous avons montré que chez *A. tortilis* subsp. *raddiana* les vitroplants d'origine somatique tout comme les vitroplants d'origine zygotique développent un système racinaire de type pivot. Leur racine croît plus rapidement que la tige (rapport longueur tige / longueur racine compris entre 0,5 et 0,7) ce qui semble traduire l'adaptation de cette espèce aux conditions des zones arides.

V. CONCLUSION

Notre approche expérimentale apporte des données supplémentaires pour une meilleure connaissance de la physiologie de l'embryogenèse somatique chez les acacias sahéliens. Le protocole défini chez *A. tortilis* subsp. *raddiana* est reproductible et permet d'envisager la multiplication d'individus issus de graines obtenues par croisement contrôlé. Toutefois, il pourrait servir de base pour la recherche des conditions de production d'embryons somatiques à partir d'explants prélevés sur des arbres sélectionnés pour leurs qualités sylvicoles. Même si le taux de conversion des embryons somatiques matures en vitroplants que nous avons obtenu chez cette espèce (23%) paraît important comparé à celui de 2% présenté chez *A. nilotica* (Garg *et al.*, 1996), il convient néanmoins de chercher à l'améliorer et de l'amener à un niveau comparable aux taux obtenus chez d'autres espèces tels que *A. nilotica* subsp. *tomentosa* ou *A. nilotica* subsp. *adstringens* (Sané, 1998).

BIBLIOGRAPHIE

- Afele J.C., T. Senaratna, B.D. McKersie & P.K. Saxena, 1992.- Somatic embryogenesis and plant regeneration from embryos culture in blue spruce (*Picea pungens* Engelman.). *Plant Cell Reports*, 11, 299-303.
- Ammirato P.V., 1977.- Hormonal control of somatic embryo development from cultured cells of caraway. *Plant. Physiol.*, 59, 579-586.
- Barbier-Bryggo H., G. Ephritikine, D. Klambt, M. Ghislan & J. Guern, 1989.- Functional evidence for an auxin receptor at the plasmalemma of tobacco mesophyll protoplasts. *Proc. natl. Acad. Sci. USA*, 86, 891-895.
- Bercetche J., M.A. Lelu & M. Galerne, 1989.- Embryogenèse somatique chez *Picea abies* et cryo-

- conservation des souches embryogènes. *Class Oxford*, 174 (7), 163.
- Borgel A., J.P. Brizard, F. Aberlenc, C. Huet & S. Hamon, 1993.- Obtention de cals embryogènes et d'embryons somatiques d'acacias sahéliens : études histologiques comparées avec l'embryogenèse zygotique. XIIème colloque de la section française de l'IAPTC Montpellier, "L'embryogenèse somatique : approches cellulaires et moléculaires", 48.
- Borgel A., D. Sané, Y. Kparé, M. Diouf & M.H. Chevalier, 1998.- Culture *in vitro* d'acacias sahéliens : aspects du microbouturage et de l'embryogenèse somatique. In : L'Acacia au Sénégal. Eds Colloques et Séminaires de l'ORSTOM, Actes de la réunion thématique sur l'acacia au Sénégal, 3-5 décembre 1996 Dakar Sénégal, 157-272.
- Branton R.L. & J. Blake, 1984.- Clonal propagation of coconut palm. *Poc. Int. Conf Cocoa coconut*, paper 46, 1-9.
- Delseny M., D. Depigny, L. Aspart & N. Reynal, 1989.- Expression différentielle du génome nucléaire au cours de la formation et de la germination des semences. *C. R. Acad. Agric. Fr.*, 75, 17-26.
- Detrez C., 1994.- Shoot production through cutting culture and micrografting from mature tree explants in *Acacia tortilis* (Forsk.) Hayne subsp. *raddiana* (Savi) Brenan. *Agroforest. Syst.*, 25, 171-179.
- Dhed'A D., F. Dumortier, B. Panis, D. Vuylsteke & E. Delanghe, 1991.- Plant regeneration in cell suspension culture of the cooking banana cv <Bluggoe> (*Musa* spp. ABB group). *Fruits*, 46 (2), 125-135.
- Dommergues Y., E. Duhoux & H.G. Diem, 1988.- Les arbres fixateurs d'azote en foresterie et agroforesterie tropicales. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 135, Actual. Bot., 3, 49-64.
- El Amin H. M., 1991.- Soudan *Acacia*. *Bulletin Forest Research Institut*, Khartoum, 1, 64.
- Garg L., N.N. Bhandari, V. Rani & S.S. Bhojwani, 1996.- Somatic embryogenesis and regeneration of triploid plants in endosperm culture of *Acacia nilotica*. *Plant Cell Reports*, 15, 855-858.
- Goldsworthy A. & K.S. Rathore, 1991.- The electrical control of growth in plant tissue culture: the polar transport of auxin. *J. Exp. Bot.*, 36 (168), 1134-1141.
- Mullin T.J. & Y.S. Park, 1992.- Estimating genetic gains from alternative breeding strategies for clonal forestry. *Can. J. Forest Res.*, 22 (1), 14-23.
- Murashige T. & F. Skoog, 1962.- A revised medium of rapid growth and essays within tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
- Nandwani D., 1995.- *In vitro* micropropagation of a tree legume adapted to arid lands: *Acacia tortilis* subsp. *raddiana*. *Ann. Sci. For.*, 52, 183-189.
- Nitsch J.P. & C. Nitsch, 1965.- Néof ormation de fleurs *in vitro* chez une espèce de jours courts : *Plumbago indica*. *Ann. Physiol. Vég.*, 7, 251-256.
- Sané D., 1994.- Clonage d'*Acacia tortilis* ssp. *raddiana* (Savi) Brenan : régénération à partir de jeunes racines excisées et étude des facteurs de l'enracinement *in vitro*. Mémoire de DEA, Université Cheikh Anta Diop, Dakar, 100p.
- Sané D., 1998.- Étude des facteurs physiologiques et cytogénétiques de l'embryogenèse somatique chez *Acacia nilotica* (L.) ssp. *tomentosa* Brenan, *Acacia nilotica* (L.) ssp. *adstringens* Brenan et *Acacia tortilis* ssp. *raddiana* (Savi.) Brenan. Thèse de doctorat de 3ème cycle, Université Cheikh Anta Diop, Dakar, 150p.
- Skriver K. & C.O. Mundy, 1990.- Gene expression in response to abscissic acid and somatic stress. *The Plant Cell*, 2, 503-512.
- Verdeil J.L., 1993.- Etude de la régénération du cocotier (*Cocos nucifera* L.) par embryogenèse somatique à partir d'explants inflorescentiels. Thèse de Doctorat, Université Pierre et Marie Curie (Paris VI), 150p.
- Von Arnold S. & T. Eriksson, 1981.- A revised medium for growth of pea mesophyll protoplasts. *Physiol. Plant*, 39, 257-260.
- Von Maydell H.J., 1983.- Arbres et Arbustes du Sahel, leurs caractéristiques et leurs utilisations. GTZ - Josef Margraf Scientific Book Verlag. D. Weikersheim, 531p.