

Applications des cultures *in vitro* dans le genre *Acacia*

Emile Duhoux,
Biotechnologue

Antoine Galiana,
Microbiologiste-biotechnologue

Jeanne Ahee,
Biotechnologue

Claudine Franche,
Biotechnologue

■ Introduction

L'accroissement de la population en Afrique entraîne une consommation croissante de bois et de produits dérivés des forêts et des arbres. Actuellement, on considère que les forêts tropicales et méditerranéennes sont en voie de disparition rapide : 1 % par an, ce qui veut dire que dans 100 ans, elles auront complètement disparu du globe si l'on ne dispose pas de méthodes efficaces pour inverser cette tendance. Ce prélèvement continu sur les forêts impose donc d'augmenter de manière significative les surfaces de reboisement et d'optimiser les techniques de propagation et d'amélioration des ligneux.

Des essais conduits sur les eucalyptus ont montré que la multiplication végétative pouvait fournir des plantations clonales d'arbres sélectionnés dont les rendements sont bien supérieurs aux plantations issues de semis (Zobel et Ikemori, 1983). Le développement des techniques de micropropagation a permis des avancées considérables chez de nombreuses plantes herbacées; plusieurs espèces sont actuellement propagées par ces techniques. Son application aux espèces ligneuses des régions tropicales est récente et concen-

trée principalement sur des essences d'intérêt économique (hévée, palmier, caféier, *etc...*)

Cependant, un groupe d'arbres, les acacias, qui compte plus de 1250 espèces connues, dont 134 originaires d'Afrique (Wickens, 1996), présente des essences d'intérêt majeur pour un développement durable dans les régions arides et tropicales. Dans un récent rapport (Anonyme, 1996), le département des forêts de la FAO a proposé une liste d'arbres prioritaires par région géographique ; on y cite quatre acacias (*A. nilotica*, *A. senegal*, *A. tortilis* et *A. tortilis* spp *raddiana*) pour les régions situées au sud de l'Europe. On a constaté, ces dernières années, un regain d'intérêt pour les acacias d'origine africaine ou australienne et une analyse bibliographique du moment fait état de nombreuses investigations biotechnologiques chez ces arbres.

Cette communication a pour objet de faire le point des recherches effectuées dans le genre *Acacia* et de souligner les résultats que les cultures *in vitro* ont permis d'obtenir chez ces espèces. Par culture *in vitro*, nous entendons le sens large, qui comprend aussi bien les techniques ayant trait à la propagation *in vitro* (multiplication végétative, callogenèse et régénération de plantes), que la transformation génétique et les symbioses expérimentales.

■ La propagation *in vitro*

La propagation *in vitro* consiste à régénérer, en conditions axéniques, une nouvelle plante à partir d'un fragment plus ou moins grand de ce végétal. Plusieurs techniques de propagation peuvent être employées et présentent, sur le plan de la conformité au type parental, différents niveaux de stabilité génétique. La technique la plus utilisée consiste à accélérer le développement des bourgeons axillaires par suppression de la dominance apicale grâce à leur isolement et à la modification exogène d'une balance hormonale en faveur des cytokinines. Cette technique conduit à la formation de vitroplants où le risque d'obtention de copies non conformes est très

faible. Au contraire, l'organogénèse, avec induction de bourgeons sur des cals, conduit à la formation de vitroplants où la variation somaclonale est fréquente (aneuploïdisation, polyploïdie); ce n'est donc pas une technique de multiplication végétative conforme. Enfin, le développement d'embryons somatiques peut présenter un taux de variation somaclonale faible et cette voie peut alors être considérée comme une technique de multiplication végétative.

Micropropagation

La micropropagation implique classiquement quatre étapes : l'initiation des cultures, la multiplication des bourgeons, l'enracinement des tiges néoformées, et l'acclimatation des vitroplants. La multiplication des bourgeons peut être obtenue soit par bourgeonnement axillaire, soit par bourgeonnement adventif.

Micropropagation par bourgeonnement axillaire

C'est la voie la plus utilisée chez les acacias (tabl. 1). Les explants les plus réactifs sont constitués par des nœuds cotylédonaire, ou des nœuds de tiges prélevés sur de jeunes plantes. La prolifération des bourgeons axillaires peut être régulée par la présence d'une balance hormonale en faveur des cytokinines (kinétine, 2-iP, BAP). Le taux de multiplication des bourgeons au cours d'une subculture est généralement limité (deux à trois) dans le genre *Acacia*. Il atteint des valeurs plus élevées (entre 20 et 40) de manière exceptionnelle chez *A. mangium* (Galiana *et al.*, 1991a; Darus, 1991). Cependant, il est intéressant de souligner la prééminence du facteur génétique sur le facteur composition du milieu de culture pour les caractères quantitatifs de micropropagation analysés chez *A. raddiana* (Borgel *et al.*, 1993). On peut prévoir qu'il en est de même chez les autres espèces non domestiquées d'*Acacia*.

Les bourgeons prélevés sur des rameaux d'arbres matures constituent des explants extrêmement difficiles à désinfecter et peu de travaux font état d'expérimentations effectuées avec des explants adultes. Chez les ligneux, il y a souvent des manifestations de retour d'arbres matures à l'état jeune, et ce phénomène est particulièrement visible

Espèce	Explant		Résultat	Références
	Juvenile	Mature		
<i>A. albida</i>	nœud cotylédonnaire		Plante acclimatée	Duhoux et Davies, 1985
<i>A. albida</i>	nœud drageons		Vitroplants	Gassama et Duhoux, 1986; 1987
<i>A. albida</i>	apex de tige		Plante acclimatée	Ruredzo et Hanson, 1993
<i>A. albida</i>	fragments de racines cultivées <i>in vitro</i>		Vitroplants	Ahée et Duhoux, 1994
<i>A. albida</i>	racines excisées		Plante acclimatée	Gassama et Duhoux, 1992
<i>A. albida</i>	microgreffage		Plante acclimatée	Detrez <i>et al.</i> , 1992
<i>A. auriculiformis</i>	bg axillaires		Vitroplants	Mittal <i>et al.</i> , 1989
<i>A. auriculiformis</i>		bg axillaires (1 an)	Plante acclimatée	Watanabe <i>et al.</i> , 1994
<i>A. auriculiformis</i>		bg axillaires (20 ans)	?	Reddy <i>et al.</i> , 1995
<i>A. auriculiformis</i>	hypocotyles	bg axillaires (1 an)	Plante acclimatée	Toda <i>et al.</i> , 1995
<i>A. auriculiformis</i>		bg axillaires (4 ans)	?	Zhang <i>et al.</i> , 1995
<i>A. auriculiformis</i>		bg axillaires (adultes)	Plante acclimatée	Semsuntud <i>et al.</i> , 1991
<i>A. bivenosa</i>	nœuds cotylédonnaires		Vitroplants	Jones <i>et al.</i> , 1990
<i>A. flava</i>	bg cotylédonnaires		Vitroplants	Di Michele et Bray, 1994
<i>A. holosericea</i>	bg cotylédonnaires		Vitroplants	Jones <i>et al.</i> , 1990
<i>A. koa</i>	apex de tige		Plante acclimatée	Skolmen et Mapes, 1978
<i>A. mangium</i>	plantule	7 mois, nœud	Plante acclimatée	Galiana <i>et al.</i> , 1991a
<i>A. mangium</i>	plantule		Plante acclimatée	Crawford et Hartney, 1987
<i>A. mangium</i>	apex de tige	apex de tige et nœud (10 ans)	Vitroplant	Rajadurai <i>et al.</i> , 1989
<i>A. mangium</i>	plantule		Vitroplant	Hamzah <i>et al.</i> , 1987
<i>A. mangium</i>	nœud		Plante acclimatée	Darus, 1991
<i>A. mangium</i>	bg cotylédonnaires		Plante acclimatée	Umboh <i>et al.</i> , 1989
<i>A. mangium</i>	hypocotyles		Plante acclimatée	Toda <i>et al.</i> , 1995

Tableau 1
Micropropagation et microgreffage des acacias. Bg : bourgeons.

Espèce	Explan		Résultat	Références
	Juvenile	Mature		
<i>A. mangium</i>	microgreffage	bg axillaires (1 an)	Plante acclimatée	Monteuuis, 1995
<i>A. mangium</i>	nœud	6 mois/3-5 ans	Vitroplant	Darus et Darus, 1991
<i>A. mangium</i> <i>x auriculiformis</i>	nœud		Plante acclimatée	Darus <i>et al.</i> , 1992
<i>A. mearnsii</i>	apex de tige		Plante acclimatée	Huang <i>et al.</i> , 1994
<i>A. melanoxydon</i>	plantule		Vitroplant	Jones, 1986
<i>A. melanoxydon</i>		nœuds de rejets d'arbres	Plante acclimatée	Meyer et van Staden, 1987
<i>A. melanoxydon</i>		nœud d'arbre mature	Caulogénèse	Jones et Smith, 1988
<i>A. melanoxydon</i>	apex de racine	Racines	Bonner, 1942	
<i>A. « mimosa »</i>	bourgeons axillaires	adultes, bg axillaires	Plante acclimatée	Ruffoni <i>et al.</i> , 1992
<i>A. nilotica indica</i>	nœud cotylédonnaire		Plante acclimatée	Dewan <i>et al.</i> , 1992
<i>A. nilotica</i>		bg axillaires (20 -25 ans)	Tiges	Singh <i>et al.</i> , 1993
<i>A. saligna</i>		mature apex de tige	Plante acclimatée	Barakat et El-Lakany, 1992
<i>A. senegal</i>	microbouture	4 ans microbouture	Plante acclimatée	Badji <i>et al.</i> , 1993
<i>A. senegal</i>	nœud	nœud (4 ans)	Plante acclimatée	Badji <i>et al.</i> , 1991
<i>A. senegal</i>	microboutures et plantules		Enracinement comparé <i>ex-vitro</i>	Palma <i>et al.</i> , 1994
<i>A. senegal</i>	greffe de microboutures	porte-greffe (3 mois)	Plante acclimatée	Palma <i>et al.</i> , 1996
<i>A. senegal</i>	cotylédon		Racines	Kathju et Tewari, 1973
<i>A. stenophylla</i>	plantule		Tiges	Crawford et Hartney, 1987
<i>A. tortilis raddiana</i>	nœud cotylédonnaire		Plante acclimatée	Nandwani, 1995
<i>A. tortilis raddiana</i>	microgreffage		Plante	Détrez, 1994
<i>A. salicina</i>	nœuds cotylédonnaires		Plante acclimatée	Jones <i>et al.</i> , 1990
<i>A. saligna</i>			Vitroplants	

Tableau 1 (suite et fin)
Micropropagation et microgreffage des acacias. Bg : bourgeons.

avec les acacias d'origine australienne qui possèdent des phyllodes à l'état adulte et des feuilles composées à l'état juvénile. Deux techniques de rejuvenilisation ont été utilisées chez les acacias ; le prélèvement d'explants de drageons et de rejets chez *Acacia albida* (Gassama et Duhoux, 1987) et le microgreffage chez *A. albida*, *A. mangium* et *A. tortilis*. C'est ainsi que les nœuds d'*A. albida* prélevés sur des drageons d'arbres âgés ont manifesté des propriétés organogènes nettement supérieures à celles des explants de matériel âgé.

Micropropagation par bourgeonnement adventif

Quelques résultats, limités à *A. albida* (Gassama-Dia et Duhoux, 1992 ; Ahée et Duhoux, 1994) font état de bourgeonnements adventifs, sans cals, sur des fragments de racines excisées ou cultivées *in vitro*. Cette voie de multiplication végétative est moins sûre du point de vue de la stabilité génétique et nécessite l'analyse génétique des vitroplants obtenus.

La phase d'enracinement des vitroplants est généralement induite par l'emploi d'une balance hormonale riche en auxines (ANA, AIB, etc.) et ne constitue pas, lorsque les explants utilisés sont juvéniles, une phase limitante dans le processus de micropropagation. Quelques auteurs (Palma *et al.*, 1996) insistent même sur la qualité du système racinaire *in vitro* lorsqu'il est comparé à l'*ex vitro*. C'est ainsi qu'après un « habillage » (élagage des extrémités racinaires), le système racinaire des plantes issues de culture *in vitro* a une reprise de croissance égale ou supérieure à celles des plantes issues de culture *ex vitro* (Palma *et al.*, 1996). Cependant, chez *A. mangium* (Galiana *et al.*, 1991a ; Darus, 1991) l'enracinement est de plus en plus difficile au fur et à mesure que l'on utilise des explants d'arbres âgés.

Organogenèse *in vitro*

Contrairement à la micropropagation par bourgeonnement, l'organogenèse fait appel à un phénomène de dédifférenciation des tissus cultivés (hypocotyles, cotylédons, etc.) phénomène qui est suivi, la plupart du temps, par une phase de callogénèse et de différenciation

de novo de méristèmes primaires. La propagation *in vitro* via l'organogenèse se poursuit avec les mêmes phases (multiplication des bourgeons, enracinement des tiges néoformées, et acclimatation) que la technique de micropropagation.

Pour la plupart des espèces citées (tabl. 2), le milieu minéral de base est celui de Murashige et Skoog (1962) additionné d'auxines et de cytokinines. La phase de callogenèse est obtenue sans difficulté ; par contre, peu d'espèces présentent une organogenèse orientée vers le développement de bourgeons. Les seuls exemples cités sont obtenus à partir d'explants très jeunes (apex de tige, cotylédons, hypocotyles) et, de manière exceptionnelle, à partir de phyllodes (Meyer et van Staden, 1987). Parmi les difficultés rencontrées au cours de l'établissement de la culture, on note la présence de polyphénols bruns qui peuvent être, selon les espèces, rejetés dans le milieu de culture. Pourtant, l'utilisation de PVP (polyvinyl pyrrolidone) n'améliore pas la culture des cals d'*A. nilotica* (Mathur et Chandra, 1983).

L'absence ou le faible taux d'organogenèse à partir de cals, chez les espèces d'*Acacia* d'intérêt économique, constitue un facteur limitant que les chercheurs doivent parvenir à surmonter, car cette étape

Espèce	Explant	Résultat	Références
<i>A. nilotica</i>	jeunes tiges	bourgeons et racines	Mathur et Chandra, 1983
<i>A. auriculiformis</i>	hypocotyles	bourgeons et racines adventifs sur cals	Ranga Rao et Prasad, 1991
<i>A. auriculiformis</i>	cotylédons	bourgeons adventifs et vitroplants	Das <i>et al.</i> , 1993
<i>A. koa</i>	apex de tige	bourgeons et racines adventifs sur cals et plantes acclimatées	Skolmen et Mapes, 1976 Skolmen, 1986
<i>A. melanoxylon</i>	segments de tige juvénile et de phyllode	bourgeons	Meyer et van Staden, 1987
<i>A. salicina</i>	hypocotyles, fragments de racines	bourgeons sur cals	Zhao <i>et al.</i> , 1990

Tableau 2
Organogénèse des acacias.

constitue un préalable à la mise au point d'un système de transformation génétique.

Embryogenèse somatique

Les embryons somatiques se développent directement sur l'explant ou, le plus souvent, après passage par une structure cal. En se développant, ils donnent naissance à de jeunes plantules dont la variabilité, induite par la phase de callogenèse, peut être maintenue dans des limites strictes. Tous les embryons somatiques d'*Acacia* ont été obtenus à partir de tissus de graines ou de plantules (tabl. 3). La réponse morphogénétique semble maximale à ce stade de développement et cette observation a également été constatée chez les légumineuses ligneuses (Trigiano *et al.*, 1992). Les embryons somatiques d'acacias ont été obtenus après une phase de callogenèse. La culture d'albumen d'*A. nilotica* a conduit à la formation d'embryons somatiques triploïdes.

Espèce	Explant	Résultat	Références
<i>A. koa</i>	cal d'apex de tige et d'hypocotyle	embryons somatiques	Skolmen, 1986
<i>A. catechu</i>	cals de cotylédons	embryons somatiques et plantes acclimatées	Rout <i>et al.</i> , 1995
<i>A. nilotica</i>	albumen	embryons somatiques	Garg <i>et al.</i> , 1996

■ Tableau 3
Embryogenèse somatique des acacias.

Les transformations génétiques

Les essais réalisés sur quatre espèces d'*Acacia* (tabl. 4) ont été effectués par la méthode de transformation la plus courante en utilisant les propriétés d'une bactérie, du genre *Agrobacterium*, qui effectue une transformation génétique naturelle des cellules végétales qu'elle infecte.

Espèce	Technique	Résultat	Références
<i>A. albida</i>	<i>A. tumefaciens</i>	cals, bourgeons	Galiana <i>et al.</i> , 1992
<i>A. mangium</i>	<i>A. tumefaciens</i>	cals	Galiana <i>et al.</i> , 1992
<i>A. crassicarpa</i>	<i>A. tumefaciens</i>	cals	Limanton <i>et al.</i> , 1995
<i>A. flava</i>	<i>A. tumefaciens</i>	cals GUS +	Bray <i>et al.</i> , 1994
<i>A. nilotica</i>			

■ Tableau 4
Transformations génétiques des acacias.

Alors que plusieurs espèces de légumineuses herbacées ont pu être transformées par des souches désarmées d'*Agrobacterium tumefaciens* (pois chiche, luzerne, trèfle, pois, stylosanthes, lotier, *etc.*) ou par le canon à particules (arachide, soja, haricot), aucune étude ne rapporte l'obtention de légumineuse ligneuse transgénique, exceptée *Robinia pseudoacacia*, transformée par une souche sauvage d'*A. rhizogenes* (Han *et al.*, 1993). Les ligneux transgéniques sont encore peu nombreux et on ne compte que quelques espèces arborées fixatrices d'azote (Diouf *et al.*, 1995; Le *et al.*, 1996; Franche *et al.*, 1997).

Chez les acacias, des cals transformés non régénérants ont été obtenus chez *A. flava* inoculé avec des souches désarmées d'*A. tumefaciens* (Bray *et al.*, 1994). Chez *A. crassicarpa*, des inoculations avec les souches désarmées LB4404 et EHA101 d'*A. tumefaciens* ont conduit au transfert et à l'expression du gène de la β -glucuronidase sur des plantes infectées entières au niveau des points d'infection, tandis que toutes les infections effectuées sur des explants isolés n'ont donné aucun résultat (Galiana *et al.*, résultats non publiés). Chez *A. albida*, on ne connaît pas de système d'organogenèse. Des souches d'*Agrobacterium tumefaciens* sauvages bourgeonnantes ont alors été utilisées suivant la stratégie mise au point par Brasileiro *et al.* (1991). La souche bourgeonnante Antib 12 d'*Agrobacterium tumefaciens* (ISV, Gif-sur-Yvette), a ainsi permis d'initier des tumeurs sur les jeunes tiges, à l'endroit même de l'inoculation et d'induire des bourgeons à quelque distance du point d'inoculation (Ahée et Duhoux, résultats non publiés). Ces bourgeons ne sont pas transformés et donnent naissance à des pousses; ce procédé constitue donc un nouveau système de régénération *in vitro* pour cet arbre. Des essais de co-inoculation

avec une souche d'*A. tumefaciens* désarmée n'ont pas permis de sélectionner des pousses transformées. De la même façon, l'introduction d'un vecteur binaire dans la souche bourgeonnante s'est révélée infructueuse.

Les cultures de cellules isolées

La culture *in vitro* d'organes, de tissus ou de cellules isolées, permet, théoriquement, de s'affranchir des conditions climatiques de culture d'un arbre et de contrôler, de façon rigoureuse, la production de métabolites secondaires. Il n'est donc pas étonnant de constater que plusieurs auteurs se soient intéressés à ce problème chez un des acacias les plus importants pour la production de gomme, l'*A. senegal* (tabl. 5). La gomme arabique, produite par *A. senegal*, possède en effet de nombreux usages domestiques et industriels et représente une des principales cultures d'exportation du Soudan (Wickens, 1996). Les premières suspensions cellulaires d'*A. senegal* ont été induites à partir de cals obtenus de cambium de branches (Hustache *et al.*, 1986). A partir d'explants issus de l'écorçage de tiges d'*Acacia* cultivés en serre, Vogt *et al.* (1991) ont pu sélection-

Espèce	Explant	Résultat	Références
<i>A. senegal</i>	cals d'écorce de tige de 2 ans	variants somaclonaux (accumulation d'amidon)	Vogt <i>et al.</i> , 1991 Vogt <i>et al.</i> , 1993
<i>A. senegal</i>	suspensions cellulaires	glycoprotéines arabinogalactanes gomme arabique	Mollard et Joseleau, 1991 ; 1994
<i>A. senegal</i>	phloème et tissus cambiaux	cals et suspensions cellulaires	Hustache <i>et al.</i> , 1986
<i>A. vereck</i>	suspensions cellulaires	activité glucurosyl transférase orthophosphate	Liénart <i>et al.</i> , 1986 ; 1988

Tableau 5
Cultures cellulaires des acacias.

ner plusieurs lignées cellulaires représentant divers variants. Ces variants ont pu être caractérisés sur des critères morphologique, cytologique et biochimique (Vogt *et al.*, 1991). Une étape significative a été franchie en 1994 par Mollard et Joseleau, lorsqu'ils ont caractérisé dans le milieu de culture un complexe protéique-arabinogalactane présentant plusieurs analogies structurales avec la gomme arabique. La différence fondamentale étant liée à la partie protéique du complexe, on peut supposer que des conditions de culture différentes pourraient conduire à des excréments contenant un épitope riche en hydroxyproline, comme c'est le cas dans la gomme arabique. La poursuite de ces travaux devrait permettre d'identifier les enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse de l'hydroxyproline dont l'élucidation est fondamentale pour tout travail d'amélioration de la gomme arabique *in planta*.

■ Les symbioses expérimentales d'*Acacia in vitro*

Des vitroplants et des jeunes semis d'acacias sont régulièrement cultivés *in vitro* pour obtenir des nodules fixateurs d'azote et des mycorhizes (tabl. 6). Le système racinaire des plantes est inoculé avec des cultures pures de *Rhizobium*, de *Bradyrhizobium* ou de champignons mycorhiziens. Deux types de culture ont été utilisés : en conditions non axéniques, comme, par exemple, le dispositif des tubes de culture de Gibson (Vincent, 1970) et en conditions axéniques, avec un dispositif dont le support racinaire est constitué de fibres de polypropylène (Galiana *et al.*, 1990).

Les deux systèmes permettent de faire des observations suivies dans des conditions non destructives. De plus, ces systèmes sont particulièrement judicieux, (1) pour étudier les premiers stades de l'interaction plantes-microorganismes; (2) pour étudier les spectres d'hôte des microorganismes associés; et enfin (3) pour sélectionner précocement les génotypes de la plante hôte, par exemple chez *A. mangium* (Galiana *et al.*, 1991b).

Espèce	Symbiote	Résultat	Références
<i>A. mangium</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	nodules efficaces	Galiana <i>et al.</i> , 1990 ; 1991b
<i>A. mangium</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	nodules	Prin et Reddell, 1993
<i>A. albida</i>	<i>Bradyrhizobium</i> et <i>Rhizobium</i>	nodules efficaces	Gassama, 1995
<i>A. albida</i>	<i>Glomus intraradix</i> <i>Glomus versiforme</i>	mycorhizes VA	Diop <i>et al.</i> , 1993
<i>A. nilotica</i>	<i>Pisolithus</i> , <i>Laccaria</i>	ectomycorhize	Natarajan, 1995
<i>A. holosericea</i>	<i>Bradyrhizobium</i> , <i>Pisolithus</i>	ectomycorhize nodule	Ba <i>et al.</i> , 1994
<i>A. spp</i>	<i>Bradyrhizobium</i> , <i>Rhizobium</i>	nodules efficaces	Dreyfus et Dommergues, 1981

Tableau 6
Nodulation et mycorhization *in vitro* des acacias.

Les dispositifs étudiés permettent aux plantes de croître en asepsie totale ou partielle, tout en assurant un contrôle optimal des différents facteurs (milieu nutritif, conditions de culture,...) indépendamment des variations environnementales. Ces dispositifs sont efficaces pendant les premiers mois de l'installation de la symbiose ; au delà, la plante n'a plus un développement satisfaisant.

Conclusions

L'ensemble des travaux examinés dans cet article souligne à nouveau certains des caractères frappants des végétaux ligneux : leur faible aptitude générale à la régénération à partir de cals et, le plus souvent, leur faible coefficient de multiplication, deux caractères qui ont rendu difficile pendant longtemps leur culture *in vitro*. Cependant, au cours des dix dernières années, de nombreuses tentatives ont été réalisées qui nous permettent aujourd'hui de dégager les principales conclusions relatives à la culture *in vitro* des acacias.

Tout d'abord, les travaux de micropropagation répertoriés concernent plus de 16 espèces différentes. Chacune d'elles ayant ses propres exi-

gences nutritives, on peut penser que cette dispersion sur des plantes aussi variées est défavorable à la mise au point de protocoles approfondis sur quelques plantes modèles. Aussi, on peut déplorer en particulier, l'absence de suivis au champ de vitroplants acclimatés. Nous sommes loin des 250 000 eucalyptus micropropagés (Grattapaglia *et al.*, 1990) au champ en deux ans! Notons toutefois les résultats encourageants, confirmés par plusieurs groupes, chez un acacia de zone humide, *A. mangium*, qui présente des taux de multiplication très intéressants, et chez une autre espèce de zone sèche, *A. nilotica*, où l'embryogenèse somatique réussie semble une technique très prometteuse.

Les phénomènes d'organogenèse sont rares et nous avons vu comment ils limitent la mise au point des techniques de transformation par *Agrobacterium*. Nous avons vu que les conditions de culture *in vitro* se prêtent particulièrement bien à l'étude des relations symbiotiques hôte-microorganisme. Dans ces conditions, l'interaction précoce entre les deux partenaires peut être parfaitement contrôlée par les facteurs de l'environnement et des études diverses incluant à la fois les aspects physiologiques, moléculaires et biochimiques, abordés. Enfin, les travaux réalisés sur l'étude de la biosynthèse des produits exsudés par les cellules isolées d'*A. senegal* ont considérablement progressé ces dernières années. On peut espérer que l'utilisation des techniques de culture *in vitro* permettra de préciser les voies de biosynthèse de la gomme en ouvrant ainsi de nombreuses perspectives d'amélioration par la voie du génie génétique.

Bibliographie

AHEE (J.), DUHOUX (E.), 1994 - Root culturing of *Faidherbia = Acacia albida* as a source of explants for shoot regeneration. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 36 : 219-225.

Rapport FAO de la 9ème session du groupe d'experts FAO sur les ressources génétiques forestières du 3-5 oct., 1995, FAO, Rome.

BA (A. M.), BALAJI (B.), PICHE (Y.), 1994 - Effect of time of inoculation on *in vitro* ectomycorrhizal colonization and nodule initiation in *Acacia holosericea* seedlings. *Mycorrhiza*, 4 : 109-119.

BADJI (S.), MAIRONE (Y.), NDIAYE (I.), MERLIN (G.), DANTHU (P.), NEVILLE (P.), COLONNA (J. P.), 1993 -

- In vitro* propagation of the gum arabic tree (*Acacia senegal* (L.) Willd.)
1. Developing a rapid method for producing plants. *Plant Cell Rep.*, 12 : 629-633.
- BADJI (S.), MERLIN (G.),
NDIAYE (I.), MAIRONE (Y.), DOIRE (P.),
PALMA (B.), COLONNA (J. P.),
GESLOT (A.), NEVILLE (P.) 1991 -
« Multiplication végétative *in vitro*
d'*Acacia senegal* (L.) Willd. »
In Physiologie des ligneux de zones arides,
Groupe de l'Arbre éd, INRA,
Nancy-Champenoux, France :
303-309.
- BARAKAT (M. N.),
EL-LAKANY (M. H.), 1992 -
Clonal propagation of *Acacia saligna*
by shoot tip culture. *Euphytica*,
59 : 103-107.
- BONNER (J.), 1942 -
Culture of isolated roots of *Acacia melanoxylon*. *Bull. Torrey Bot. Club.*,
69 : 130-133.
- BORGEL (A.),
DIOUF (M.), KPARE (Y.), 1993 -
Effet de l'origine génétique
sur l'aptitude au clonage *in vitro*
d'*Acacia raddiana*. *Bois et Forêts des Tropiques*, 238, 23.
- BRASILEIRO (A. C. M.), LEPLE (J. C.),
MUZZIN (J.), OUNNOUGH (D.),
MICHEL (M. F.), JOUANIN (L.) 1991 -
An alternative approach for gene
transfer in trees using wild-type
Agrobacterium strains.
Plant Mol. Biol., 17 : 441-452.
- BRAY (L.), ECOURURIER (V.),
DI MICHELE (M. N.), 1994 -
« Étude de la sensibilité
d'*Acacia flava* et d'*Acacia nilotica*
à *Agrobacterium tumefaciens*.
» *In : Quel avenir pour l'amélioration
des plantes ?* AUPELF-UREF éd.,
John Libbey Eurotext, Paris : 459-471.
- CRAWFORD (D. F.),
HARTNEY (V. J.), 1987 -
« Micropropagation of *Acacia mangium* and *Acacia stenophylla*. »
*In : Australian acacia in developing
countries.* (J. W.) Turnbull éd.,
Proceedings of international
workshop. ACIAR-Proc-Ser.
Canberra : 64-65.
- DARUS (A. H.), 1991 -
« Multiplication of *Acacia mangium*
by stem cuttings and tissue culture
techniques. » *In Advances in tropical
Acacia research.* (W.) Turnbull éd.,
ACIAR Proceedings n° 35,
Canberra : 32-35.
- DARUS-HAJI (A.), DARUS (H. A.),
CARRON (L. T.), AKEN (K. M.), 1992 -
« Micropropagation techniques for
Acacia mangium x *A. auriculiformis*. »
*In Breeding technologies for tropical
acacias.* Proceedings of an
international workshop, Tawau,
Sabah, Malaysia, 1-4 july 1991
ACIAR-Proceedings Series
37 : 119-121.
- DARUS-HAJI (A.), DARUS (H. A.), 1991 -
Micropropagation of *Acacia mangium*
from aseptically germinated seedlings.
J. Trop. Forest., 3 : 204-208.
- DAS (P. K.), CHAKRAVARTI (V.),
MAITY (S.), 1993 -
Plantlet formation in tissue culture
from cotyledon of *Acacia auriculiformis*
A. Cunn. ex Benth.
Indian J. For., 16 : 182-192.
- DETREZ (C.), 1994 -
Shoot production through cutting
culture and micrografting from mature
tree explants in *Acacia tortilis* (Forsk.)
Hayne sub sp. *raddiana* (Savi)
Brenan. *Agroforest. Syst.*,
25 : 171-179.
- DETREZ (C.), NDIAYE (S.),
KERBELLEC (F.), DUPUY (N.),
DANTHU (P.), DREYFUS (B.), 1992 -
« Meristem micrografting of adult
Faidherbia albida. » *In : Faidherbia
albida in the West African Semi-
Tropics.* (R. J.) Vandenbeldt éd.,
ICRISAT, Patancheru, Andhra

- Pradesh, India and ICRAF, Nairobi, Kenya : 91-97.
- DEWAN (A.), NANDA (K.), GUPTA (S. C.), 1992 - *In vitro* micropropagation of *Acacia nilotica* sub sp. *indica* Brenan via cotyledonary nodes. *Plant Cell Rep.*, 12 : 18-21.
- DI MICHELE (M. N.), BRAY (L.), 1994 - « Multiplication végétative *in vitro* d'*Acacia flava* syn. *erhenbergiana*. » In : *Quel avenir pour l'amélioration des plantes ?* AUPELF-UREF éd. John Libbey Eurotext Paris : 195-204.
- DIOP (T. A.), PLENCHETTE (C.), STRULLU (D. G.), 1993 - Les endomycorhizes d'*Acacia albida*. Écologie et méthodes axéniques de culture. *Bois et Forêts des Tropiques*, 238 : 28.
- DIOUF (D.), GHERBI (H.), PRIN (Y.), FRANCHE (C.), DUHOUX (E.), BOGUSZ (D.), 1995 - Hairy root nodulation of *Casuarina glauca* : a system for the study of symbiotic gene expression in an actinorhizal tree. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 8 : 532-537.
- DREYFUS (B. L.), DOMMERGUES (Y. R.), 1981 - Nodulation of *Acacia* species by fast- and slow-growing tropical strains of *Rhizobium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41 : 97-99.
- DUHOUX (E.), DAVIES (D.), 1985 - Caulogénèse à partir des bourgeons cotylédonaire de *Acacia albida* et influence du saccharose sur la rhizogénèse. *J. Plant Physiol.*, 121 : 175-180.
- FRANCHE (C.), DIOUF (D.), LE (Q. V.), N'DIAYE (A.), GHERBI (H.), BOGUSZ (D.), GOBE (C.), DUHOUX (E.), 1997 - Genetic transformation of the actinorhizal tree *Allocauarina verticillata* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant J.*, 11 : 897-904.
- GALIANA (A.), ALABARCE (J.), DUHOUX (E.), 1990 - Nodulation *in vitro* d'*Acacia mangium* Willd. (Leguminosae). *Ann. Sci. For.*, 47 : 451-460.
- GALIANA (A.), FRANCHE (C.), SYLLA (F.), BOGUSZ (D.), PHELEP (M.), AHEE (J.), PRIN (Y.), DUHOUX (E.), 1992 - « Genetic transformation of tropical nitrogen-fixing forest trees. Workshop on molecular Biology of Forest Trees », 15-18 Juin 1992, Maubuisson, France.
- GALIANA (A.), TIBOK (A.), DUHOUX (E.), 1991a - *In vitro* propagation of the nitrogen-fixing tree-legume *Acacia mangium* Willd. *Plant Soil.*, 135 : 151-159.
- GALIANA (A.), TIBOK (A.), DUHOUX (E.), 1991b - Nitrogen-fixing potential of micropropagated clones of *Acacia mangium* inoculated with different *Bradyrhizobium* spp strains. *Plant Soil.*, 135 : 161-166.
- GARG (L.), BHANDARI (N. N.), RANI (V.), BHOJWANI (S. S.), 1996 - Somatic embryogenesis and regeneration of triploid plants in endosperm cultures of *Acacia nilotica*. *Plant Cell Rep.*, 15 : 855-858.
- GASSAMA (Y. K.), 1995 - *Étude de voies d'amélioration génétique par la biologie de la reproduction, les potentialités de clonage in vitro et la symbiose fixatrice d'azote chez Acacia albida* (Del.) A. Chev. Thèse Université CAD, Dakar.
- GASSAMA (Y. K.), DUHOUX (E.), 1986-87 - Micropropagation de l'*Acacia albida* Del. (Leguminosae) adulte. *Bull. I.F.A.N.* 46, A 314-320.
- GASSAMA-DIA (Y. K.), DUHOUX (E.), 1992 - « Régénération de bourgeons à partir de culture de racines d'*Acacia*

- albida*. » In *Interactions Plantes-Microorganismes IFS* (International Foundation for Science) Dakar, 441.
- GRATTAPAGLIA (D.), CALDAS (L. S.), MACHADO (M. A.), ASSIS (T. F.), 1990 - « Large scale micropropagation of Eucalyptus species and hybrids. » Abstracts, VII International Congress on plant tissue and cell culture. Amsterdam, 113.
- HAMZAH (M. B.), ALANG (Z. C.), SALEKAN (J.), 1987 - « *In vitro* propagation of *Acacia mangium* from young seedlings. » In Proceedings of the seminar on tissue culture of forest species. (A. N.) Rao, (Y.) Aziah Mohe éds : 104-128.
- HAN (K. H.), KEATHLEY (D. E.), DAVIS (J. M.), GORDON (M. P.), 1993 - Regeneration of a transgenic woody legume (*Robinia pseudoacacia* L., black locust) and morphological alterations induced by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation. *Plant Sci.*, 88 : 149-157.
- HUANG FENG (H.), AL-KHAYRI JAMEEL (M.), GBUR (E.), 1994 - Micropropagation of *Acacia mearnsii*. *In vitro Cell Dev. Biol.*, 30 : 70-74.
- HUSTACHE (G.), BARNOUD (F.), JOSELEAU (J. P.), 1986 - Callus formation and induction of a cell culture from *Acacia senegal*. *Plant Cell Rep.*, 5 : 365-367.
- JONES (C.), SMITH (D.), 1988 - Effect of 6-benzylaminopurine and 1-naphtylacetic acid on *in vitro* axillary bud development of mature *Acacia melanoxylon*. *Comb. Proc. Intl. Plant Prop. Soc.*, 38 : 389-393.
- JONES (C.), 1986 - Getting started in micropropagation of Tasmanian Blackwood (*Acacia melanoxylon*). *Comb. Proc. Intl. Plant Prop. Soc.*, 36 : 477-481.
- JONES (T. C.), BATCHELOR (C. A.), HARRIS (P. J. C.), 1990 - *In vitro* culture and propagation of *Acacia* species (*A. bivenosa*, *A. holosericea*, *A. salicina*, *A. saligna* and *A. sclerosperma*). *Int. Tree Crops J.*, 6 : 183-192.
- KATHJU (S.), TEWARI (M. N.), 1973 - Development of the root from cotyledonary callus of *Acacia senegal*. *Labdev. J. Sci. Tech.*, 11 : 84-85.
- LE (Q. V.), BOGUSZ (D.), GHERBI (H.), LAPPARTIENT (A.), DUHOUX (E.), FRANCHE (C.), 1996 - *Agrobacterium tumefaciens* gene transfer to *Casuarina glauca*, a tropical nitrogen-fixing tree. *Plant Sci.*, 118 : 57-69.
- LIENART (Y.), COMTAT (J.), BARNOUD (F.), 1986 - A wall-bound 1,3-a-D-glucanase from *Acacia* cultured cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 883 : 353-360.
- LIENART (Y.), COMTAT (J.), BARNOUD (F.), 1988 - Wall-bound 1,3-a-D-glucan : Orthophosphate glucosyltransferase activity from *Acacia* cultured cells. *Plant Sci.*, 58 : 165-170.
- LIMANTON (A.), FRANCHE (C.), DUHOUX (E.), DAHMANI (N.), GALIANA (A.) 1995a - « Progress towards the genetic transformation of *Acacia crassicaarpa*. Somatic Cell Genetics and Molecular Genetics of Trees », *IUFRO*, 26-30 Septembre 1995, Gand, Belgique.
- LIMANTON (A.), FRANCHE (C.), DUHOUX (E.), DAHMANI (N.), GALIANA (A.), 1995b - « Progress towards the genetic transformation of *Acacia crassicaarpa*. » In *Communications et posters, EUCARPIA Meeting on Tropical Plants*, March 11-15 1996, Montpellier, France, 295.

MATHUR (I.), CHANDRA (N.), 1983 - Induced regeneration in stem explants of *Acacia nilotica*. *Current. Sci.*, 52 : 882-883.

MEYER (H. J.),
VAN STADEN (J.) 1987 - Regeneration of *Acacia melanoxylon* plantlets *in vitro*. *S Afr Tydskr Plantk*, 53 : 206-209.

MITTAL (A.), AGARWAL (R.),
GUPTA (S. C.), 1989 - *In vitro* development of plantlets from axillary buds of *Acacia auriculiformis* a leguminous tree. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 19 : 65-70.

MOLLARD (A.), JOSELEAU (J. P.), 1991 - Extracellular xyloglucans from *Rosa glauca* and *Acacia senegal* suspension-cultured cells. *Food Hydrocol.*, 5 : 177.

MOLLARD (A.), JOSELEAU (J. P.), 1994 - *Acacia senegal* cells cultured in suspension secrete a hydroxyproline deficient arabinogalactan-protein *Plant Physiol. Biochem.*, 32 : 703-709.

MONTEUIS (O.) 1995 - *In vivo* grafting and *in vitro* micrografting of *Acacia mangium* : impact of ortet age. *Silvae Genet.*, 44 : 190-193.

MURASHIGE (T.), SKOOG (F.), 1962 - A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15 : 473-497.

NANDWANI (D.), 1995 - *In vitro* micropropagation of a tree legume adapted to arid lands *Acacia tortilis* sub sp *raddiana*. *Ann. Sci. For.*, 52 : 183-189.

NATARAJAN (K.),
NAGARAJAN (G.), EDDY (M. S.), 1995 - *In vitro* mycorrhization and growth response of *Acacia nilotica* seedlings by inoculation with ectomycorrhizal fungi. *Indian J. Microbiol.*, 35 : 35-38.

PALMA (B.),
VOGT (G.), NEVILLE (P.), 1994 - Comparison of root pruning systems of seedlings and plantlets of *Acacia senegal* (L.) Willd. *Phyton*, 55 : 137-146.

PALMA (B.),
VOGT (G.), NEVILLE (P.), 1996 - A combined *in vitro/in vivo* method for improved grafting of *Acacia senegal* (L.) Willd. *J. Hort. Sci.*, 71 : 379-381.

PRIN (Y.), REDDELL (P.), 1993 - Les stades précoces de la nodulation chez *Acacia mangium*. *Bois et Forêts des Tropiques*, 238 : 29.

RAJADURAI (D.),
RAO (A. N.), LOH (C. S.), 1989 - « *In vitro* culture studies on two leguminous species. » *In : Proceedings of the seminar on tissue culture of forest species.* (A. N.) Rao, (Y.) Aziah Mohe éds : 104-128.

RANGA RAO (G. V.),
PRASAD (M. N. V.), 1991 - Plantlet regeneration from the hypocotyl callus of *Acacia auriculiformis*- Multipurpose tree legume. *J. Plant Physiol.*, 137 : 625-627.

REDDY (P. C.), VEERANAGOUDA-PATIL,
PRASAD (T. G.), PADMA (K.),
UDAYAKUMAR (M.), PATIL (V.), 1995 - *In vitro* axillary bud break and multiple shoot production in *Acacia auriculiformis* by tissue culture technique. *Cur. Sci.*, 69 : 495-496.

ROUT (G. R.),
SAMANTARAY (S.), DAS (P.), 1995 - Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus culture of *Acacia catechu* a multipurpose leguminous tree. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 42 : 283-285.

RUFFONI (B.), MASSABO (F.),
COSTANTINO (C.), ARENA (V.),
DAMIANO (C.), 1992 - Micropropagation of *Acacia*

« *mimosa* ». *Acta Hort.*,
300 : 95-102.

RUREDZO (T. J.), HANSON (J.), 1993 -
Plant recovery from seedling-derived
shoot tips of *Faidherbia albida* grown
in vitro. *Agroforest. Syst.*, 22 59-65.

SAITO (Y.), IDE (Y.),
KOJIMA (K.), SASAKI (S.), 1993 -
Isolation of protoplasts from various
tissues of *Acacia mangium* cultured
in vitro. *Bull. Tokyo Univ. For.*,
90 : 17-21.

SEMSUNTUD (N.), NITIWATTANACHAI (W.),
TURNBULL (J. W.), 1991 -
« Tissue culture of *Acacia
auriculiformis*. » In : *Advances in
tropical acacia research*. Proceedings
of an international workshop held
in Bangkok, Thailand, 11-15 Fevrier
1991. ACIAR -Proceedings-Series,
35 : 39-42.

SINGH (H. P.), SINGH (S.),
SAXENA (R. P.), SINGH (R. K.) 1993 -
In vitro bud break in axillary nodal
segments of mature trees of *Acacia
nilotica*. *Indian J. Plant Physiol.*,
36 : 21-24.

SKOLMEN (R. G.), 1986 -
« *Acacia (Acacia koa Gray)*. »
*In Biotechnology in Agriculture and
Forestry* vol 1 : Trees I. (Y. P. S.) Bajaj
éd., Springer-Verlag Berlin Heidelberg,
375-384.

SKOLMEN (R. G.), MAPES (M. O.), 1976 -
Acacia koa Gray plantlets from
somatic callus tissue. *J. Hered.*,
67 : 114-115.

SKOLMEN (R. G.), MAPES (M. O.), 1978 -
« Aftercare procedures required
for field survival of tissue culture
propagated *Acacia koa*. »
*In International Plant
Propagators Society Combined
Proceedings* for 1978, 28 : 156-164.

TODA (T.),
TAJIMA (M.), BRINI (P. B.), 1995 -
Tissue culture of *Acacia mangium*,

A. auriculiformis and their hybrid.
Bull. Nation For Tree. Breed Center,
13 : 157-165.

Trigiano (R. N.), Geneve (R. L.),
Merkle (S. A.), Preece (J. E.), 1992 -
Tissue and cell cultures of woody
legumes. *Hort. Rev.*, 14 : 265-332.

UMBOH (I.), SETIAWAN (I.), KAMIL (H.),
YANI (S.), SITUMORANG (J.), 1989 -
L'application de techniques de culture
in vitro à la multiplication d'espèces
forestières tropicales en Indonésie.
Bull. Soc. Bot. Fr. Actual. Bot.,
136 : 179-184.

VINCENT (J. M.), 1970 -
A manual for the practical study of
the root nodule bacteria. IBP
Handbook 15, Blackwell, Oxford.

VOGT (G. F.), HOHMANN (V.),
LOUESSE (S.), NEVILLE (P.),
MOURENT (G. M.), 1993 -
Starch accumulation by two
tissue strains of *Acacia senegal* (L.)
Willd. *Rev. Cytol. Biol. Végét.*,
16 : 163-172.

VOGT (G. F.), LOUESSE (S.),
HOHMANN (V.), LAURENT (C.), 1991 -
« Cultures *in vitro* de cellules et
de tissus d'*Acacia senegal* (L.)
Willd., en vue de production de
métabolites secondaires. »
*In Physiologie des ligneux de zones
arides*, Groupe de l'Arbre Ed.,
INRA, Nancy-Champenoux, France :
289-302.

WATANABE (Y.),
IDE (Y.), IDEKA (H.), 1994 -
Plant regeneration from axillary bud
culture of one-year-old seedling
of *Acacia auriculiformis* grown in
greenhouse. *Bull. Tokyo Univ. For.*,
92 : 29-35.

WICKENS (G. E.), 1996 -
Rôle des acacias dans l'économie
rurale des régions sèches
d'Afrique et du Proche-Orient.
Cahier FAO conservation,
27, Rome.

ZHANG (H. W.),
HUANG (X. X. L.), FU (J.),
YANG (M. Q.), CHEN (C. Q.), 1995 -
Axillary bud culture and plantlet
regeneration of *Acacia auriculiformis*
and *A. mangium*. *J. Trop. Subtrop.*
Bot., 3 : 62-68.

ZHAO (Y. X.), YAO (D. Y.),
HARRIS (P. J. C.), 1990 -
In vitro regeneration of plantlets from
explants and callus of *Acacia*

salicina. *Nitrogen Fixing Tree Res.*
Rep., 8 : 113-115.

Zobel (B. J.), Ikemori (Y. K.), 1983 -
« Vegetative propagation in
eucalypts. » *In Clonal forestry : its
impact on tree improvement and our
future forests.* (L.) Zsuffa, (R. M.)
Rauter, (C. W.) Yeatman éds, Proc.
19th Meeting Canadian Tree
Improvement Assn. Part 2. Toronto,
Ontario : 136-144.