

Culture *in vitro* d'acacias sahéliens

Aspects du microbouturage
et de l'embryogenèse somatique

Alain Borgel,
Généticien

Djibril Sané,
Biotechnologue

Yamba Kparé,
Biotechnologue

Mahécor Diouf,
Biotechnologue

Marie-Hélène Chevallier,
Généticienne

Introduction

La conservation des ressources génétiques végétales est une des priorités des programmes nationaux de lutte contre la désertification dans les pays sahéliens. Ces programmes s'inscrivent dans le mouvement mondial en faveur de la protection de l'environnement et de la biodiversité. Parmi les 134 espèces d'acacias représentées en Afrique, plusieurs jouent un rôle capital en bordure du désert dans le maintien du couvert végétal, de l'agriculture et de l'activité humaine. Les plus utiles sont *Acacia tortilis*, *A. nilotica* et, *A. senegal*, ainsi que leurs sous-espèces et les espèces proches (Von Maydell, 1990).

Toutes ces espèces sont considérées comme allogames et hétérozygotes. L'évaluation au champ de la diversité génétique et des potentialités agro-forestières est faite en utilisant des provenances ou des familles de demi-frères. 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 et Park, 1992).

Les espèces ligneuses de la famille des légumineuses sont réputées récalcitrantes à la régénération *in vitro* (Dewan *et al.*, 1992). Néanmoins, des résultats positifs ont été rapportés sur les acacias australiens ainsi que sur des espèces des genres *Dalbergia*, *Leucaena* et *Prosopis* (Dhawan, 1989). Pour les acacias sahéliens, plusieurs auteurs proposent des protocoles de microbouturage pour *A. nilotica* (Mathur et Chandra, 1983), *A. senegal* (Badji *et al.*, 1993) ou *A. tortilis* ssp. *raddiana* (Borgel *et al.*, 1993b; Nandwani, 1995).

L'enracinement est une étape essentielle, mais difficile, de la multiplication végétative *in vitro* pour beaucoup de plantes ligneuses. De plus, l'aptitude à l'enracinement décroît avec la maturation (Pawlicki et Welander, 1995). L'application transitoire d'auxine comme l'AIB a permis d'améliorer l'enracinement d'espèces forestières cultivées *in vitro* (Thorpe *et al.*, 1991). Nandwani (1995) a obtenu des microboutures issues directement de nœuds cotylédonaire d'*A. tortilis*. Il a observé 20 % à 65 % d'enracinement en présence d'AIB ou ANA. Pour l'*A. tortilis* ssp. *raddiana*, une méthode de multiplication végétative *in vitro* à partir de nœuds de jeunes plants a été mise au point (Borgel *et al.*, 1993b). L'enracinement des microboutures est de 90 % à la première culture, il diminue jusqu'à 2 % après la deuxième subculture en présence d'AIA ou AIB et il est nul sur milieu sans hormone.

Un traitement à l'auxine doit être appliqué aux microboutures d'arbres pour induire l'enracinement. L'AIB ainsi que l'ANA sont les auxines les plus utilisées sur *Quercus*, *Castanea* et *Juglans* à des concentrations de 0,02 à 6 mg.l⁻¹ dans les milieux de culture (Schwarz, 1989). Berger et Schaffner (1995) ont montré que l'application d'ANA à 5 mg.l⁻¹ est nécessaire pour l'enracinement des

vitroplants chez un arbre de la famille des légumineuses, *Swartzia madagascarensis*. Hausman (1993) a constaté que l'ANA à $0,3 \text{ mg.l}^{-1}$ est indispensable pour l'enracinement des microboutures de *Betula*. Dans ce cas, l'application d'ANA induit un pic d'activité peroxydasique (AIA-oxydase) dans les tissus des microboutures avant l'expression de l'enracinement. Le transfert des microboutures sur un milieu sans auxine exogène réactive la synthèse d'AIA endogène qui provoque la croissance des racines (Berthon *et al.*, 1989). L'induction de racines sur des microboutures de *Grevillea robusta* a été observée après traitement à l'ANA à $0,05 \text{ mg.l}^{-1}$ mais aucune racine ne s'est développée après 45 jours de culture sur le milieu avec auxine (Rajasekaran, 1994). Bergman et Stomp (1994) ont montré qu'un traitement de dix jours avec un mélange d'AIB à 1 mg.l^{-1} et d'ANA à $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ est nécessaire pour enracer des microboutures de *Pinus radiata*.

Une autre voie potentielle de clonage des acacias est l'embryogenèse somatique. La production spontanée d'embryons asexués (agamospermie) chez les Angiospermes est rare mais assez constante. L'agamospermie a été observée sur 280 genres de 94 familles (Sharma et Thorpe, 1995). Ce recensement ne mentionne qu'une seule espèce sur les 1 200 du genre *Acacia* (*A. farnesiana*, originaire du nouveau monde). La production d'embryons somatiques *in vitro* a été rapportée sur environ 150 espèces ligneuses (Dunstan *et al.*, 1995). Cette technologie nécessite que l'explant primaire issu de la plante mère passe par une phase de dédifférenciation (callogenèse) avant d'être induit vers la production d'embryons somatiques. De plus, elle est potentiellement inductrice de variation dans le génome.

Les embryons somatiques sont des propagules de génotype identique au tissu qui leur a donné naissance. Bien que formés à partir du tissu végétatif, ils présentent les principaux caractères de la plante issue de graine : un axe caulinaire qui produira la tige feuillée et un axe racinaire identique à celui de la plante mère. Les premiers embryons somatiques d'*A. nilotica* ont été obtenus à partir d'embryons zygotiques après une callogenèse de 100 jours en présence de 2,4-D à 2 mg.l^{-1} ou à 80 mg.l^{-1} avec du charbon actif à 1 g.l^{-1} (Borgel *et al.*, 1993a). Sur la même espèce, Gargh *et al.* (1996) ont obtenu des embryons somatiques triploïdes à partir d'albumen immature.

Les résultats présentés concernent des avancées récentes sur les deux voies de clonage évoquées ci-dessus. (i) Le microbouturage, où nous étudions l'action de régulateurs de croissance, appliqués de manière transitoire (10 jours), sur l'enracinement de microboutures d'*A. tortilis* ssp. *raddiana* après la deuxième subculture; (ii) l'embryogenèse somatique, dont le protocole a été amélioré. Nous recherchons la présence de variation de la quantité d'ADN nucléaire chez les embryons somatiques.

Matériel et Méthodes

Enracinement

Les semences d'*A. tortilis* ssp. *raddiana* ont été collectées au Sénégal dans la région de Saint-Louis, au village de Mbarigo. Les graines ont été scarifiées à l' H_2SO_4 à 95 % pendant 2 heures. Après rinçage à l'eau distillée stérile, elles ont été mises à germer en conditions aseptiques sur un milieu simple de germination composé de macro-éléments et micro-éléments de MS (Murashige et Skoog, 1962) et d'agar à 0,7 %. A un mois, les plantules ont été découpées en segments uninodaux de 5 à 10 mm de longueur en excluant le nœud cotylédonnaire.

Les microboutures ont été cultivées pendant deux mois sur un milieu de multiplication composé des macro-éléments de WPM (Lloyd et McCown, 1980), des micro-éléments de MS, des vitamines de N & N (Nitsch et Nitsch, 1965), de saccharose à 20 g.l⁻¹, d'agar à 0,6 %, de zéatine à 0,1 mg.l⁻¹ et d'AIB à 1,2 mg.l⁻¹. Les vitroplants ainsi obtenus ont été à nouveau découpés en microboutures uninodales de 5 à 10 mm transférées sur les milieux d'induction de l'enracinement composés des macro-éléments de WPM, des micro-éléments de MS, des vitamines de N & N, de saccharose à 10 g.l⁻¹, d'agar à 0,7 %, avec 6 combinaisons de régulateurs de croissance (AIB ou ANA à 10 ou 20 mg.l⁻¹ combinés ou non avec la kinétine à 0,01 mg.l⁻¹). L'induction a été fixée à 10 jours après lesquels les microboutures ont été transférées sur le milieu d'ex-

pression de l'enracinement, sans régulateur de croissance, composé des macro-éléments de WPM, des micro-éléments de MS, des vitamines de N & N, de saccharose à 20 g.l⁻¹ et d'agar à 0,6 %.

Embryogenèse somatique

Chez les trois espèces *A. tortilis* ssp. *raddiana*, *A. nilotica* ssp. *tomentosa* et *A. nilotica* ssp. *adstringens*, plusieurs types d'explants de départ sont choisis afin d'étudier leur aptitude à la callogenèse : les embryons zygotiques, les cotylédons de graines immatures, les hypocotyles de graines germées ainsi que les téguments internes des graines immatures. Les explants sont cultivés pendant 60 à 100 jours à l'obscurité à 28,5 °C ± 0,5 °C, sur les milieux de callogenèse VA (Von Arnold et Eriksson, 1981) contenant 2 mg.l⁻¹ de 2,4-D et 1 mg.l⁻¹ de BAP. Les cals embryogènes obtenus sont transférés soit sur milieu de maintenance des cals (MS avec 1 mg.l⁻¹ de BAP, 0,5 mg.l⁻¹ d'AIB et 20 g.l⁻¹ de saccharose), soit sur milieu de prolifération des embryons somatiques (MS/2 avec 0,5 mg.l⁻¹ de BAP, 0,05 mg.l⁻¹ d'AIB et 30 g.l⁻¹ de saccharose). Les embryons somatiques produits sont transférés sur un milieu de maturation (MS avec 2,64 mg.l⁻¹ d'ABA et 50 g.l⁻¹ de saccharose). Cette étape de la culture est conduite avec une photopériode de 16 h de jour / 8 h de nuit, liée à une thermopériode de 30 °C / 27 °C. Les embryons somatiques sont mis à germer dans un milieu MS/2 sans hormone, riche en saccharose (50 g.l⁻¹).

Cytométrie en flux

Les prélèvements pour l'analyse de la quantité d'ADN nucléaire sont faits sur les cals embryogènes. La méthode, dérivée de Chevallier et Borgel (1995) pour les acacias, comprend l'extraction des noyaux interphasiques intacts par hachage manuel de 30 mg de l'échantillon dans 1,5 ml de tampon et la coloration à l'iodure de propidium à 330 µg.ml⁻¹ pendant 5 min. Pour chaque analyse, environ 2000 noyaux sont mesurés en même temps que 1000 billes fluorescentes de latex de 2 µm de diamètre comme standard interne.

Les témoins sont des jeunes plantes issues de graines des mêmes arbres que les embryons somatiques. Le cytofluorimètre en flux (FAC-Scan, Becton Dickinson) à laser argon (15 mW) réglé en émission à 488 nm mesure l'intensité de fluorescence de chaque noyau et construit l'histogramme de distribution sur une échelle de 0 à 1 024 en unité arbitraire.

Résultats et discussion

Enracinement de microboutures d'A. tortilis ssp. raddiana

Le pourcentage d'enracinement, tous traitements confondus, est de 56 % et atteint 80 % pour les vitroplants traités avec l'AIB à 10 mg.l⁻¹. Le pourcentage le plus faible est atteint avec le traitement à l'ANA à 20 mg.l⁻¹ avec 31 % des vitroplants enracinés (tabl. 1).

| Traitements (mg.l ⁻¹) ⁽¹⁾ | | | Nombre de boutures présentant les nombres suivants de racines ⁽²⁾ | | |
|--|-----|-----------|--|-------|-----------|
| AIB | ANA | Kinéatine | 0 | 1 à 5 | plus de 5 |
| 10 | - | - | 19 | 21 | 56 |
| 10 | - | 0,01 | 29 | 19 | 43 |
| 20 | - | - | 34 | 24 | 35 |
| - | 10 | - | 62 | 28 | 6 |
| - | 10 | 0,01 | 41 | 40 | 15 |
| - | 20 | - | 65 | 26 | 3 |

⁽¹⁾ régulateurs de croissance appliqués pendant l'induction

⁽²⁾ $\chi^2 = 136$ dl = 10 p = 0,00

Tableau 1

Nombre de microboutures d'*A. tortilis ssp. raddiana* enracinées en fonction des traitements d'induction. Observations après dix jours d'induction et 28 jours d'expression (566 individus).

Des différences significatives d'expression de l'enracinement sont mises en évidence en fonction de la nature des régulateurs de croissance utilisés. Ainsi, 73 % à 90 % des vitroplants enracinés après un traitement à base d'ANA présentent des racines peu nombreuses (1 à 5 racines). Au contraire, le traitement à base d'AIB à 10 mg.l⁻¹ avec ou sans kinétine à 0,01 mg.l⁻¹ induit plus de 5 racines par vitroplant dans 69 % à 73 % des vitroplants enracinés. Parmi les vitroplants traités à l'ANA, la meilleure combinaison associe ANA à 10 mg.l⁻¹ et la kinétine à 0,01 mg.l⁻¹ (57 % d'enracinés).

Outre la fréquence d'enracinement, la qualité des racines produites est différente en fonction des régulateurs de croissance utilisés pour l'induction (tabl. 2). L'AIB induit la formation d'un cal à partir duquel se développent de nombreuses racines (10 à 15 avec un maximum excédant 50 racines produites) mais très fines et plagiotropes. A l'opposé, les milieux à base d'ANA induisent des racines peu nombreuses (1 à 5) mais robustes et orthotropes. Ces racines émergent latéralement de la base sectionnée de la microbouture.

| Variables analysées | Traitements (mg.l ⁻¹) | | | | | |
|--|-----------------------------------|--------------------|------------------|--------------------|--------------------|-------------------|
| | ANA 10 | ANA 10 Kin 0,01 | ANA 20 | AIB 10 | AIB 10 Kin 0,01 | AIB 20 |
| Longueur de racine (cm) | 4,9 ^c | 4,6 ^{bc} | 5,0 ^c | 3,7 ^{abc} | 3,4 ^{ab} | 3,1 ^a |
| Nombre de racines | 4,0 ^a | 4,4 ^a | 3,8 ^a | 14,2 ^b | 14,8 ^b | 10,4 ^b |
| Grosseur du cal (unité arbitraire de 0 à 4) | 0,2 ^a | 0,6 ^a | 0,6 ^a | 1,5 ^b | 1,3 ^b | 1,4 ^b |

■ Tableau 2

Effet des régulateurs de croissance sur l'enracinement de microboutures d'*A. tortilis* ssp. *raddiana* après 10 jours d'induction et 28 jours d'expression. Mesures effectuées sur les explants enracinés. Les lettres indiquent des groupes significativement différents (N. K. 5 %, 316 individus).

Chez les plantes pérennes, l'enracinement adventif des microboutures est une étape critique dont le succès dépend de l'âge physiologique de la microbouture et de l'action de régulateurs de croissance externes pendant la phase d'induction. Nous avons observé que l'appétitude à l'enracinement diminue fortement au fur et à mesure des subcultures (résultats non présentés). Brand et Lineberger (1992) avaient

noté le même comportement en comparant des semenceaux et des microboutures de *Betula sp.*

Nos résultats sur *A. tortilis* ssp *raddiana* confirment ceux de Bergman et Stomp (1994) sur *Pinus radiata*. En effet, un traitement inductif de dix jours sur milieux enrichis en AIB ou ANA a amélioré le taux d'enracinement [(nombre de plants avec au moins une racine/ nombre de plants mis en culture) \times 100] des microboutures. Le taux d'enracinement d'*A. tortilis* ssp *raddiana*, qui était proche de zéro même en présence permanente d'auxine, a été ramené à 56 % tous traitements confondus avec un protocole comprenant une phase d'induction de 10 jours et une phase d'expression. Il est possible qu'une induction encore plus courte (un jour ou quelques heures) soit suffisante. Par exemple, Pawlicki et Welander (1995) ont obtenu 100 % d'enracinement sur le porte-greffe de pommier avec une induction de neuf heures en présence de l'AIB à 10 mg.l⁻¹. Les racines d'acacia ne se développent qu'après le transfert sur milieu d'expression sans régulateur de croissance exogène. Les auxines comme l'AIB ou l'ANA sont donc nécessaires pour induire la formation de racines sur des microboutures d'*A. tortilis* ssp *raddiana*, mais elles inhibent leur croissance.

L'AIB est utilisé fréquemment comme inducteur d'enracinement pour les vitroplants de plantes ligneuses (Torrey, 1976). Son efficacité sur la fréquence d'enracinement est confirmée pour l'acacia (70 %). Cependant, cet enracinement se développe à partir d'un cal basal important et les racines néoformées, bien que nombreuses, sont ténues et courtes. Il serait intéressant de vérifier l'existence de connections vasculaires entre ce type de système racinaire et la tige de la microbouture. Un tel système racinaire peut s'avérer inopérant pour des arbres sahéliens comme *A. tortilis* ssp *raddiana* à la transplantation au champ pour la recherche de l'eau. Par ailleurs, nous avons observé que l'AIB inhibe la croissance des tiges par rapport à l'ANA.

L'ANA induit la formation de racines de type orthotrope identiques au pivot du système racinaire naturel de l'espèce. De plus, les microboutures traitées à l'ANA présentent un cal basal très réduit (cal cicatriciel). Cet effet est observé quelle que soit la concentration d'auxine appliquée (10 mg.l⁻¹ ou 20 mg.l⁻¹). De même, l'adjonction de kinétine à faible concentration (0,01 mg.l⁻¹) ne modifie pas l'effet princi-

pal de la nature de l'auxine. Rajasekaran (1994) a aussi observé, sur *Grevillea robusta*, que l'ANA induit des racines mieux formées que l'AIB.

Le meilleur traitement inducteur de notre expérience combine l'ANA à 10 mg.l⁻¹ et la kinétine à 0,01 mg.l⁻¹. Il permet d'atteindre un taux d'enracinement de 57 % et les racines formées ont une morphologie normale.

Embryogenèse somatique (A. tortilis ssp. raddiana, A. nilotica ssp. tomentosa et adstringens)

Le microbouturage des acacias présente plusieurs difficultés qui limitent son utilisation potentielle. Le taux de multiplication est relativement faible comparé à celui d'autres espèces ligneuses multipliées *in vitro* (*Prunus sp.*, *Eucalyptus sp.*). Malgré l'amélioration décrite ci-dessus, l'enracinement des microboutures n'est pas suffisant. Les racines peuvent présenter une morphologie inadaptée aux conditions de terrain difficiles. En conséquence, une étude de l'embryogenèse somatique a été entreprise.

La méthode décrite antérieurement (Borgel *et al.*, 1993a) a été améliorée et étendue à *A. tortilis ssp. raddiana* par le travail présenté ici. Les premières vérifications de la conformité des plants produits par rapport au matériel de départ ont été conduites sur des caractères cytogénétiques : nombre de chromosomes et quantité d'ADN nucléaire (qADN) en phase G0 et G1.

Production d'embryons somatiques

L'aptitude des explants à la callogenèse a été mesurée pour les trois espèces étudiées (tabl. 3). Seuls les explants cotylédonnaires ont produit des cals embryogènes chez les deux sous-espèces d'*A. nilotica* alors qu'*A. tortilis ssp. raddiana* a produit des cals embryogènes à partir d'embryons zygotiques. Les hypocotyles et les téguments internes de graines n'ont produit aucun cal. Ces résultats confirment et étendent ceux de Borgel *et al.* (1993a) sur la bonne aptitude à la callogenèse des embryons zygotiques d'acacias.

Les différents paramètres de la production d'embryons somatiques sur deux clones par espèce ont été évalués (tabl. 4). Aucun effet génotype n'a été observé sur le nombre de cals produits. En revanche, la production de plantules à partir de ces cals est inégale. *A. tortilis* ssp. *raddiana* produit moins d'embryons et ces embryons ont un taux de conversion moindre que chez *A. nilotica*. A l'intérieur de chaque espèce, l'effet clone se manifeste à des étapes différentes. Les deux clones d'*A. nilotica* ssp. *adstringens* présentent

| Espèces | Explants | | | | Durée de culture (jours) |
|--|-------------|------------|---------------------|--------------------|--------------------------|
| | Hypocotyles | Cotylédons | Embryons zygotiques | Téguments internes | |
| <i>A. nilotica</i> ssp. <i>tomentosa</i> | - | + | - | - | 60 j |
| <i>A. nilotica</i> ssp. <i>adstringens</i> | - | + | - | - | 80 j |
| <i>A. tortilis</i> ssp. <i>raddiana</i> | - | - | + | - | 90 j-à100 j |

(+) := explant produisant des cals ; (-) := pas de cal.

Tableau 3
Aptitude à la callogenèse des explants d'acacias sahéliens.

| Génotypes | Cals | | Embryons | | |
|--|--------|-----------------|----------|----------------------|-------------------------|
| | Nombre | % avec embryons | Nombre | % d'embryons matures | % de plantules obtenues |
| <i>A. nilotica</i> ssp. <i>Tomentosa</i> | | | | | |
| clone 2-2 | 24 | 96 | 310 | 100 | 38 |
| clone 2-5 | 22 | 68 | 237 | 100 | 88 |
| Total | 46 | 83 | 547 | 100 | 60 |
| <i>A. nilotica</i> ssp. <i>adstringens</i> | | | | | |
| clone 1-1 | 19 | 68 | 218 | 88 | 56 |
| clone 1-2 | 22 | 100 | 411 | 80 | 53 |
| Total | 41 | 85 | 629 | 83 | 54 |
| <i>A. tortilis</i> ssp. <i>raddiana</i> | | | | | |
| clone by1 | 23 | 64 | 102 | 58 | 30 |
| clone by2 | 17 | 65 | 128 | 60 | 17 |
| Total | 40 | 65 | 230 | 59 | 23 |
| Totaux | | | 1406 | 85 | 51 |

Tableau 4
Production d'embryons somatiques de trois espèces d'acacias sahéliens.

des potentialités d'embryogenèse différentes mais des taux de germination semblables. Au contraire, chez *A. nilotica* ssp. *tomentosa*, les deux clones sont différents pour leur taux de germination.

Au total, 719 plantules ont été produites par embryogenèse somatique sur 1406 embryons isolés (51 %). Il serait nécessaire d'implanter ces clones en pépinière et en rhizotron afin d'évaluer la reprise en conditions naturelles des vitroplants ainsi que la morphologie de leur système racinaire. Ensuite, un essai comparatif au champ avec les témoins issus de semis des mêmes plantes mères permettra de mesurer l'uniformité intra-clone et les différences entre clones issus d'une même plante mère mais de génotype différent. Enfin, il conviendra de rechercher l'apparition éventuelle de caractères variants tout au long de l'ontogenèse de la plante.

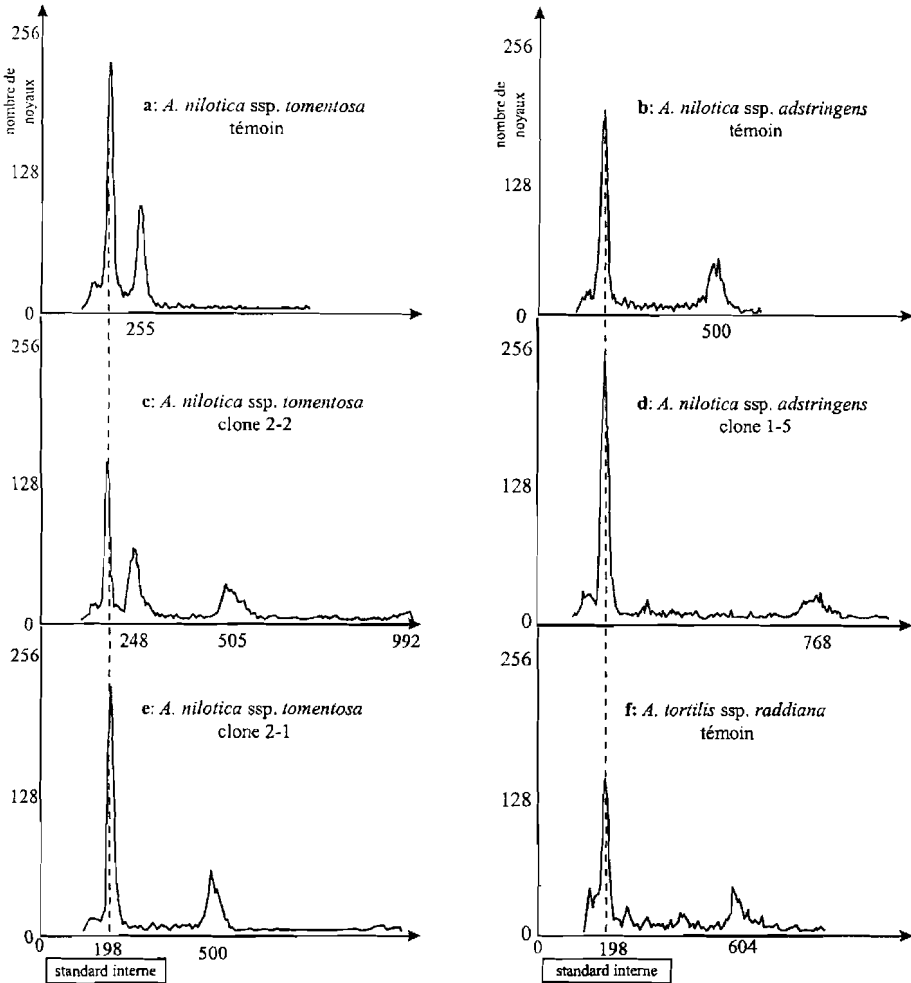
Contrôle des variations quantitatives de l'ADN nucléaire

L'étude de la conformité des vitroplants produits par embryogenèse somatique a été entreprise dès le début de l'ontogénie sur cals embryogènes. Les variations de quantité d'ADN nucléaire ont été étudiées par cytométrie en flux.

La comparaison d'*A. nilotica* ssp. *tomentosa* et *A. nilotica* ssp. *adstringens* à l'aide de témoins issus de graines confirment les différences de niveau de ploïdie déjà observées auparavant (Chevallier et Borgel, 1995). La seconde espèce a exactement un qADN double de la première (fig. 1a et b). Les comptages chromosomiques de ces deux espèces indiquent respectivement 52 et 104 chromosomes. *A. tortilis* ssp. *raddiana*, qui a aussi 104 chromosomes, montre cependant environ 20 % d'ADN en plus qu'*A. nilotica* ssp. *adstringens* (fig. 1f).

L'analyse de 89 cals embryogènes issus des trois espèces montre des situations très différentes. La plupart des cals est identique aux témoins issus de graines, mais six cals présentent des variations importantes par rapport aux témoins : (i) doublement de la quantité d'ADN (fig. 1e), (ii) augmentation de la quantité d'ADN par un facteur 1,5 (fig. 1d), (iii) chimère de deux niveaux de ploïdie différents dans le même échantillon (fig. 1c). Ces variations touchent les trois espèces. Il conviendra de vérifier, par comptage du nombre de chro-

mosomes, quelle est l'origine des variations observées, augmentation du nombre de chromosomes ou amplification de la quantité d'ADN.



■ Figure 1

Cytométrie en flux de noyaux. a, b et f = noyaux extraits de feuilles de plantes issues de semis (témoins). c, d et e = noyaux extraits d'embryons somatiques anormaux. Le pic marqué « standard interne » est obtenu avec des billes de latex fluorescentes, les autres pics sont ceux de l'échantillon. L'intensité de fluorescence (unités arbitraires sur l'axe des abscisses en échelle linéaire) est proportionnelle à la quantité d'ADN nucléaire de l'échantillon. La présence de 3 pics (Figure 1 c) traduit la présence de deux niveaux de ploïdie dans l'échantillon (chimère).

Ces résultats montrent que les cals embryogènes sont des tissus encore peu organisés où persistent des modifications importantes de l'ADN induites par la callogenèse. On peut émettre l'hypothèse que ces structures anormales n'aboutiront pas, pour la plupart, à des embryons somatiques capables de germer et seront de ce fait éliminées. Il est cependant possible que des variations plus discrètes et non létales puissent être intégrées dans la structure ou le fonctionnement du génome et exprimer un caractère variant tardivement dans le cycle ontogénique de la plante.

Les plantes régénérées à partir de structures dédifférenciées (cals, protoplastes, suspensions cellulaires) peuvent présenter des phénotypes variants dus à des changements de la structure du génome ou de son expression (Larkin et Scowcroft, 1981). Les phénotypes variants ont des origines très diverses : variation du nombre de chromosomes, mutations structurales importantes (translocations, délétions), mutations à haute fréquence, arrêt de l'expression de certains gènes (observé notamment sur les transgènes), mutations touchant l'ADN cytoplasmique (stérilité mâle, albinisme) (Phillips *et al.*, 1990). Il est important de noter que ces changements ne sont pas systématiques, certains auteurs font état de la stabilité de conformation du mtDNA même après une longue période de culture *in vitro*, en particulier sur le mil (Shenoy et Vasil, 1992).

En résumé, nous avons montré que l'embryogenèse somatique est à l'origine de variations de la quantité d'ADN par noyau dans les cals embryogènes des acacias. Même si les variants observés sont peu fréquents, le développement de cette technique devra prendre en compte le contrôle de la conformité du matériel végétal produit.

Conclusion

La micropropagation d'acacias sahéliens a été améliorée sur plusieurs aspects. (i) L'enracinement de microboutures d'*A. tortilis* ssp. *raddiana*, qui tend à disparaître après plusieurs subcultures, a été réactivé par un traitement transitoire à l'auxine. (ii) Il a été montré

que la morphologie du système racinaire néoformé dépend de la nature de l'auxine utilisée pour le traitement inducteur. La qualité des racines a été améliorée en utilisant l'ANA qui permet le développement de racines de type pivot. (iii) Une méthode d'embryogenèse somatique a été mise au point sur *A. nilotica* ssp. *adstringens* et *tomentosa* et *A. tortilis* ssp. *raddiana*.

Ces nouveaux protocoles concourent, par des voies parallèles, à permettre le clonage, indispensable dans différents domaines de recherche. Les résultats obtenus permettront d'utiliser des clones d'acacias pour tester l'aptitude à la nodulation et à la fixation de l'azote de collections de rhizobium en éliminant la variance génétique de la plante hôte. Les clones d'arbres dits « d'élite » adultes permettront d'en tester la valeur génétique vraie ainsi que les interactions génotype-environnement dans plusieurs conditions climato-édaphiques. Pour cela, l'embryogenèse somatique devra être développée à partir de téguments de graines ou d'inflorescences pour étudier le génotype de la plante mère.

Bibliographie

- BADJI (S.), MAIRONE (Y.), NDIAYE (I.), MERLIN (G.), DANTHU (P.), NEVILLE (P.), COLONNA (J.), 1993 - *In vitro* propagation of the gum arabic tree (*Acacia senegal* [L.] Willd.). Developing a rapid method for producing plants. *Plant Cell Reports*, 12 : 629-633.
- BERGER (K.), SCHAFFNER (W.), 1995 - *In vitro* propagation of the leguminous tree *Swartzia madagascariensis*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 40 : 289-291.
- BERGMANN (B. A.), STOMP (A. M.), 1994 - Effect of genotype on rooting of hypocotyls and *in vitro*-produced shoots of *Pinus radiata*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 39 : 195-202.
- BERTHON (J.), MALDINEY (R.), SOTTA (B.), GASPART (T.), BOYER (N.), 1989 - Endogenous levels of plant hormones during the course of adventitious rooting in cuttings of *Sequoiadendron giganteum* (Lindl.) *in vitro*. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 184 : 405-412.
- BORGEL (A.), BRIZARD (J. P.), ABERLENC (F.), HUET (C.), HAMON (S.), 1993a - « Obtention de cals embryogènes et d'embryons somatiques d'acacias sahéliens : étude histologique comparée avec l'embryogenèse zygotique ». Actes du XII^e Colloque IAPTC, Montpellier France, Orstom, Cirad, Univ. Montpellier II édés, 16-17 novembre 1993, : p 48.

- BORGEL (A.),
DIOUF (M.), KPARÉ (Y.), 1993b -
Effet de l'origine génétique sur
l'aptitude au clonage *in vitro*
d'*Acacia raddiana.*, *Bois et Forêts
des Tropiques*, 238 : 23.
- BRAND (M. H.),
LINEBERGER (R. D.), 1992 -
In Vitro Rejuvenation of *Betula*
(Betulaceae) : Morphological
Evaluation. *Amer. J. Bot.*
79 (6) : 618-625.
- CHEVALLIER (M. H.),
BORGEL (A.), 1995 -
Contribution to the classification
of 32 acacia species with reference
to their genome size determined by
flow cytometry. 5th Congress of
the European Society of Evolutionary
Biology, Edimbourg (Ecosse)
(Poster).
- DEWAN (A.),
NANDA (K.), GUPTA (S.), 1992 -
In vitro micropropagation of *Acacia
nilotica* subsp *indica* (Brenan) via
cotyledonary nodes. *Plant Cell Rep.*,
12: 18-21.
- DHAWAN (V.), 1989 -
« Micropropagation and
nodulation of tree legumes. », *In
Application of biotechnology in
forestry and horticulture*, Plenum
Press, New York, London,
(23) : 286-295.
- DUNSTAN (D. I.), TAUTORUS (T. F.),
THORPE (T. A.), 1995 -
« Somatic embryogenesis in woody
plants. », *In : In vitro* Embryogenesis
in Plants, (T. A.) Thorpe éd., Kluwer
Academic Pub, Dordrecht, Boston,
London, 12 : 471-538.
- 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 Reports*,
15 : 855-858.
- HAUSMAN (J. F.), 1993 -
Changes in Peroxidase Activity,
Auxin Level and Ethylene Production
during Root formation by poplar
shoots raised *in vitro*. *Plant Growth
Regul.*, 13 : 263-268.
- LARKIN (P. J.),
SCOWCROFT (W. R.), 1981 -
Somaclonal variation - a novel
source of variability from cell cultures
for plant improvement. *Theor. Appl.
Genet.*, 60 : 197-214.
- LLOYD (G. B.), MCCOWN (B. H.), 1980 -
Commercially-feasible
micropropagation of mountain-laurel,
Kalmia latifolia, by use of shoot tip
culture. *Comb. Proc. Int. Plant Prop.
Soc.*, 30 : 412-427.
- MATHUR (I.), CHANDRA (N.), 1983 -
Induced regeneration in stem
explants of *Acacia nilotica*. *Curr. Sci.*,
52 : 882-883.
- MULLIN (T. J.), PARK (Y. S.), 1992 -
Estimating genetic gains from
alternative breeding strategies for
clonal forestry. *Can. J. Forest. Res.*,
22 (1) : 14-23.
- MURASHIGE (T.), SKOOG (F.), 1962 -
A revised medium for rapid growth
and biassays 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 subsp *raddiana*.
Ann. Sci. Forest., 52 : 183-189.
- NITSCH (J. P.), NITSCH (C.), 1965 -
Néoformation de fleurs *in vitro*
chez une espèce de jours courts :
Plumbago indica. *Ann. Phys. Vég.*,
7 : 251-256.
- PAWLICKI (N.), WELANDER (M.), 1995 -
Influence of carbohydrate source,
auxin concentration and time of
exposure on adventitious rooting of
the apple rootstock Jork 9. *Plant Sci.*,
106 : 167-176.

- PHILLIPS (R. L.), KAEPLER (S. M.), PESCHKE (V. M.), 1990 - « Do we understand somaclonal variation? » *In Progress in plant cellular and molecular biology*, (H. J. J.) Nijkamp, (L. H. W.) Van Der Plas, (J.) Van Aartrijk éds, Dordrecht, Kluwer Academic Press : 131-141.
- RAJASEKARAN (P.), 1994 - Production of clonal plantlets of *Grevillea robusta* in *in vitro* culture via axillary bud activation. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 39 : 277-279.
- SCHWARZ (O. J.), 1989 - Plant Growth Regulator Effects in the *In Vitro* Propagation of three Hardwood Tree Genera : *Castanea*, *Juglans*, and *Quercus*. *Plant Growth Reg.*, 6 : 113-135.
- SHARMA (K. K.), THORPE (T. A.), 1995 - « Asexual embryogenesis in vascular plants in nature ». *In vitro Embryogenesis in Plants*, (T. A.) Thorpe éd., Kluwer Academic Press, Dordrecht, Boston, London, : 17-72.
- SHENOY (V. B.), VASIL (I. K.), 1992 - Biochemical and molecular analysis of plants derived from embryogenic tissue cultures of napier grass (*Pennisetum purpureum* K. Schum.). *Theor Appl. Genet.*, 83 : 947-955.
- THORPE (T. A.), HARRY (I. S.), KUMAR (P. P.), 1991 - « Application of micropropagation to forestry. » *In Micropropagation technology and application*, Debergh, Zimmerman éds, Kluwer Academic Press, Dordrecht, Boston, London : 311-336.
- TORREY (J. G.), 1976 - Root hormones and plant growth. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 27: 435-459.
- VON ARNOLD (S.), ERIKSSON (T.), 1981 - A revised medium for growth of pea mesophyll protoplasts. *Physiol. Plant*, 39 : 257-260.
- VON MAYDELL (H. J.), 1990 - *Arbres et arbustes du Sahel, leurs caractéristiques et leurs utilisations*. GTZ-Josef Margraf Scientific Book Verlag, D-Weikersheim, 531 p.