

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP - DAKAR



**MEMOIRE pour l'obtention du DIPLOME
D'ETUDES APPROFONDIES**

présenté à la Faculté des Sciences
Département de Biologie Végétale

par

DJIBRIL SANE

Maître ès-Sciences

SUJET :

Clonage d'*Acacia raddiana* (savi.) :
Régénération à partir de jeunes racines excisées
Etude des facteurs de l'enracinement "in vitro"

Soutenu le 10 Juin 1994

devant la Commission d'Examen composée de :

Président	M. Amadou Tidjane Ba Professeur titulaire
Membres	M. Alain Borgel chargé de recherche ORSTOM
	M. Jean-Marc Leblanc chargé de recherche ORSTOM
	Mme Yaye Kene GASSAMA-DIA Maître - assistante
	Mr Nicolas DIALLO Maître - assistant

REMERCIEMENTS

Ce travail a été entièrement réalisé dans le laboratoire commun, à l'ISRA et à l'ORSTOM, de culture *In Vitro* (URCI) du centre de recherche de Bel-Air.

Le sujet proposé par ce laboratoire avec la collaboration étroite du Département de Biologie Végétale de la Faculté des Sciences et Techniques de L'Université Cheikh Anta Diop de Dakar, a été traité sous la responsabilité scientifique de Mr. ALAIN BORGEL, Chargé de Recherche ORSTOM et de Mme YAYE K. GASSAMA-DIA, Maître-Assistant au Département de Biologie Végétale de l'Université de Dakar.

Nous tenons, ici, à remercier toutes les personnes qui nous ont permis de mener à bien ce travail, et, en particulier:

Mr. Philippe Mathieu, Représentant de l'ORSTOM au Sénégal pour avoir accepté notre admission dans votre établissement.

Mr. Amadou Tidiane Bâ, Professeur titulaire, Chef du Département de Biologie Végétale, pour la confiance que vous nous avez témoigné en facilitant notre admission à l'ORSTOM.

Mr. Alain Borgel, Responsable de l'URCI, Chargé de Recherche ORSTOM, pour la spontanéité avec laquelle vous nous avez accepté dans votre laboratoire. Votre générosité, votre patience et votre esprit critique nous ont permis de mener à bien ce travail.

Mme Yaye K. Gassama-Dia, Maître-Assistant au Département de Biologie Végétale pour la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de diriger ce travail. Nous avons surtout beaucoup apprécié votre courtoisie, votre patience et le sens pédagogique dont vous avez fait montre tout le long de ce stage.

MM. Jean-Marc Leblanc, Mékinto Batcho et Nicolas Diallo respectivement Responsable du laboratoire de Génétique et Amélioration des Plantes de l'ORSTOM Bel-Air, Professeur titulaire au Département de Biologie Végétale et Maître-Assistant au Département de Biologie Végétale, pour avoir accepté de faire partie du jury.

Mr. Simon Badji, par votre soutien constant et votre disponibilité, vous nous avez fait bénéficier de votre expérience. Nous osons croire que les résultats auxquels nous avons abouti pourront en partie combler vos espérances.

Nous tenons à remercier tout le personnel de l'URCI, plus particulièrement Mahécor Diouf, Technicien de Culture *in vitro* pour sa disponibilité et son dévouement lors de la mise en place et du suivi de nos expériences.

Nos vifs remerciements s'adressent également à Maurice Sagna, Abdou Sarr, Sidy N'Diaye, Ismael Diarra, Amy Bâ Diop, Marie Claire Da-Sylva, Diaminatou Sanogo, Ousmane Mbodj, Talla Guèye, Stéphane Rondeau, Cheikh N'Diaye pour avoir été les véritables artisans de ce travail et pour le soutien constant que vous nous avez témoigné pendant toute la durée du stage. Nous n'oublierons jamais la parfaite harmonie qui a caractérisé notre amitié.

Enfin à tous les amis, Aboubacar Dieng, Saliou Badji, Abdou N'Diaye, Moussa Sidibé, Mamour Seck, Nouha Coly, Omar Goudiaby, Albert Sadio, Idrissa Diatta, Ababacar Guèye, Chérif Djiba, Pierre Tine, Jean Diop, Landing Coly, Jean-Pierre, Pierre et Gaston Gomis, Cheikhna DiabaKhaté, Moustapha Badji, pour les moments d'angoisse et de joie vécus ensemble.

DÉDICACE

A la mémoire de mon père.

A mes mamans, qui ont consacré toute leur vie à leurs enfants.

A ma grand-mère.

A mes frères et soeurs, dont l'affection à la fois désintéressée et sans limite nous a permis de traverser tous les moments difficiles.

A mes beaux-frères pour leur patience toutes ces années durant.

A ma fille et ma femme qui a partagé mes doutes et vécu beaucoup de moments de solitude.

RESUMÉ

La lutte contre la dégradation progressive des systèmes agro-sylvo-pastoraux, en zones arides et semi-arides, doit passer par la réussite de vastes programmes de reforestation. Il apparaît donc urgent de disposer d'espèces ligneuses adaptées aux conditions écologiques de ces zones. Parmi celles-ci figurent en première place les légumineuses arborescentes et en particulier les acacias sahéliens.

Acacia raddiana (Savi.) est une espèce à fonctions multiples qui répond parfaitement à ces critères et de ce fait devrait occuper une place de choix dans les programmes de sélection et d'amélioration génétique de ces végétaux.

Le travail présenté est une recherche de conditions optimales pour produire des clones de cette espèce par la multiplication végétative conforme *in vitro*. Il comprend deux volets :

1. Tentative de néoformation de tiges *in vitro* à partir des segments de racines, (cette espèce ne drageonne pas naturellement). Acacia albida (Del.) a été utilisé comme témoin. Les différents traitements appliqués, sur un total de 6480 explants, n'ont pas fait drageonner *Acacia raddiana in vitro*. Seuls des cals chlorophylliens ont été obtenus en présence de spermidine. En revanche chez *Acacia albida*, les résultats analysés mettent en évidence deux faits essentiels: d'un côté, une influence très significative de l'âge des explants racinaires sur la néoformation des bourgeons ; de l'autre, un effet également très significatif des conditions de l'environnement physique, montrant l'importance de la lumière sur la régénération.

2. Détermination des meilleures conditions d'enracinement des vitroplants de deuxième subculture d'Acacia raddiana. L'analyse des résultats a permis de dégager les points suivants:

- a. L'enracinement *in vitro* de l'*Acacia raddiana* nécessite d'abord un milieu contenant une auxine ou une combinaison auxine-cytokinine puis un milieu sans auxine.
- b. Un milieu pauvre en ions ammoniums et riche en sulfates est le meilleur pour l'enracinement des microboutures.
- c. L'ANA et l'AIB ont une action spécifique et différente sur la rhizogénèse.
- d. La grosseur du cal basal favorise la prolifération des racines mais inhibe la caulogénèse.

Mots clés: Zones arides; Reforestation; Légumineuses arborescentes; *Acacia raddiana*; Microboutures; Explants racinaires; Subculture; Multiplication végétative conforme; *In vitro*; Clone; Néoformation; Drageons; Auxine; Cytokinine; Spermidine; Cal basal; Acclimatation.

SOMMAIRE

LISTES DES FIGURES ET PLANCHES DU TEXTE.....	10
INDEX DES SIGLES ET ABREVIATIONS DU TEXTE.....	13
INTRODUCTION GENERALE.....	14
A. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	18
I. REGENERATION DE PLANTULES A PARTIR DE LA CULTURE <i>IN VITRO</i> DE JEUNES RACINES EXCISEES.....	18
II. LES FACTEURS DE L'ENRACINEMENT.....	20
1. <u>Structure anatomique du méristème de racine</u>	20
2. <u>La convertibilité des méristèmes de tige et de racine</u>	20
3. <u>Histocytologie de la rhizogénèse</u>	21
4. <u>Phytohormones et rhizogénèse</u>	23
4.1. Apport d'auxines exogènes.....	24
4.2. Les régulateurs de croissance endogènes.....	26
4.2.1. L'auxine.....	27
4.2.2. Les cytokinines.....	29
4.2.3. L'acide abscissique.....	30
5. <u>Influence des composés phénoliques sur la rhizogénèse</u>	30
6. <u>Péroxydases et enracinement</u>	32
B. MATERIELS ET METHODES.....	
I. MATERIEL BIOLOGIQUE.....	33
1. <u>La plante</u>	33
1.1. Position systématique.....	33
1.2. Caractères botaniques	34
1.3. Ecologie et intérêt économique de l'espèce.....	34

2. <u>Provenance des semences</u>	36
 II. MATERIELS, TECHNIQUES ET METHODES	37
1. <u>Préparation et conduite du matériel biologique</u>	37
1.1. Les cultures ...	37
1.1.1. Prétraitement des graines et milieux de germination.....	37
a. Prétraitement des graines.....	37
b. Les milieux de germination.....	38
1.2. La multiplication végétative.....	38
1.2.1. Les explants ...	38
a. La régénération: les cultures de racines isolées.....	38
b. Les microboutures.....	38
1.2.2. Les milieux de culture.....	40
a. Les substances minérales.....	40
b. Les substances organiques.....	40
i. Les éléments trophiques.....	41
ii. Les éléments oligo-dynamiques.....	42
- Les vitamines.....	42
- Les hormones ...	42
c. Autres.....	43
1.2.3. Les conditions de l'environnement physique.....	44
1.2.4. L'acclimatation.....	45
2. <u>Observation et exploitation des résultats</u>	45
2.1. Mesure de la croissance des plants.....	45
2.1.1. Appareil aérien.....	45
a. Les bourgeons issus de segments de racines.....	45
b. Les microboutures.....	46
2.1.2. Appareil souterrain.....	46
2.2. Présentation des données et analyses statistiques.....	46

C. RESULTATS.....	48
I. LES CULTURES DE RACINES ISOLEES.....	48
1. <u>Milieux de germination.....</u>	48
2. <u>Régénération de bourgeons.....</u>	49
2.1. <i>Acacia raddiana</i>	49
2.1.1. Effet de la BAP combinée à l'AIA et à la spermidine.....	49
2.1.2. Effet des polyamines seules.....	50
2.2. <i>Acacia albida</i>	51
2.2.1. Influence des milieux de culture.....	52
a. Sur les explants âgés de 15 jours.....	53
b. Sur les explants âgés de 30 jours.....	53
2.2.2. Influence des conditions d'éclairement.....	54
a. Sur les explants âgés de 15 jours.....	54
b. Sur les explants âgés de 30 jours.....	54
3. <u>Obtention de tiges feuillées.....</u>	55
II. ENRACINEMENT DE L'ACACIA RADDIANA.....	56
1. <u>Microboutures issues de plantules.....</u>	57
1.1. Action des substances de croissance.....	57
1.2. Effet des cytokinines et d'une gibbérelline combinées à une auxine.....	57
2. <u>Microboutures de deuxième subculture.....</u>	59
2.1. Action des auxines utilisées seules ou en association avec un cytokinine.....	59
2.1.1. Induction rhizogène courte.....	60
2.1.2. Induction rhizogène prolongée.....	61
a. Influence des facteurs de l'induction.....	61
i. Effet de la balance hormonale sur le développement des microboutures.....	62
ii. Effet de l'ANA et de l'AIB utilisés seuls.....	62
iii. Effet de l'ANA et de l'AIB combinés à une cytokinine.....	63
iiii. Effet de la balance hormonale sur le développement caulogène des microboutures.....	64

b. Influence du milieu minéral.....	64
i. Sur la rhizogénèse.....	65
ii. Sur la croissance des racines.....	66
iii. Sur la caulogénèse.....	67
c. Influence de la callogénèse sur la rhizogénèse et la caulogénèse.....	68
3. <u>Acclimatation et sortie en champ</u>	71
 D. DISCUSSION.....	72
 I. REGENERATION DE BOURGEONS.....	72
 II. MICROPROPAGATION D'EXPLANTS PRIMAIRES.....	74
 III. MICROPROPAGATION D'EXPLANTS DE DEUXIEME SUBCULTURE.....	75
 IV. ACCLIMATATION.....	80
 E. CONCLUSION.....	81

LISTE DES FIGURES DU TEXTE

Figure n°1: Régénération de bourgeons sur racines d'*Acacia albida*: Interaction entre l'âge des explants et la nature des milieux de culture.

Figure n°2: Régénération de bourgeons sur racines d'*Acacia albida*: Effet comparatif des conditions d'éclairement sur la régénération en fonction de la nature et de l'âge de l'explant.

Figure n°3: Développement des vitroplants de première subculture d'*Acacia raddiana* sur le milieu M.S.: Effet de la balance hormonale exogène.

Figure n°4: Développement des vitroplants de deuxième subculture d'*Acacia raddiana* après induction plus 30 jours d'expression: Effet de la durée d'induction.

Figure n°5: Développement des microboutures de deuxième subculture d'*Acacia raddiana* après 10 jours d'induction plus 30 jours d'expression: Effet de la balance hormonale exogène.

Figure n°6: Développement des vitroplants de deuxième subculture d'*Acacia raddiana* après 10 jours d'induction plus 30 jours d'expression : Effet des macro-éléments.

Figure n°7 (a et b): Expression de l'enracinement des microboutures de deuxième subculture d'*Acacia raddiana* en fonction du temps: Effet de 6 milieux d'induction pendant 10 jours.

Figure n°8: Croissance des tiges de deuxième subculture d'*Acacia raddiana* après 10 jours d'induction plus 30 jours d'expression:
Effet du type d'explant et de la nature des macro-éléments.

Figure n°9: Croissance des tiges après induction 10 ou 20 jours plus 30 jours d'expression:
Effet de la durée d'induction et de la nature des macro-éléments.

LISTE DES PLANCHES DU TEXTE

Planche 1: *Acacia raddiana* (Savi.). J.P.M. Brenan: Manual on taxonomy of *Acacia* species, F.A.O., 1983.

Planche 2: Carte de distribution géographique des différentes sous-espèces d'*Acacia tortilis*. J.P.M. Brenan: Manual on taxonomy of *Acacia* species, F.A.O., 1983.

Planche 3: Régénération de bourgeons sur fragments de racines.
photo a: *Acacia raddiana*
photo b: *Acacia albida*
photo c: vitroplants d'*Acacia albida* issus de racines

Planche 4: Enracinement des vitroplants de deuxième subculture d'*Acacia raddiana*.
photo a: phase d'induction racinaire (induction 10 jours)

Planche 5: Enracinement des vitroplants de deuxième subculture d'*Acacia raddiana*: Effet de l'ANA sur l'expression des racines. Lecture à 1 semaine.
photos b, c et d.

Planche 6: Enracinement des vitroplants de deuxième subculture d'*Acacia raddiana*: Effet de l'AIB sur l'expression des racines. Lecture à 1 semaine.
photos e et f.

INDEX DES SIGLES ET ABREVIATIONS DU TEXTE

ABA	: Acide Abscissique
AIA	: Acide Béta Indol Acétique
AIB	: Acide Béta Indol Butyrique
ANA	: Acide Naphtalène Acétique
BAP	: 6-Benzyl-aminopurine
BHT	: Butylated Hydroxytoluene
CMR	: Coefficient de multiplication racinaire
DRPF	: Direction de Recherche sur les Productions Forestières
FeEDTA	: Fer Ethylène Diamine Tétra-acétique Acide
GA3	: Acide Gibbérellique
ISRA	: Institut Sénégalais de Recherche Agricole
Kin	: kinétine (6-Furfuryl-aminopurine)
ORSTOM	: Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération.
Zéa	: zéatine (6-(4-hydroxy 3-méthylbut-trans-2-enyl) aminopurine).

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

La dégradation accélérée des terres dans le monde est en partie due à la destruction ininterrompue des forêts. Dans les pays en développement, la demande en bois dépasse de loin la production de nouveaux arbres. En effet, en cinq ans à peine, de 1975 à 1980, quelques 37 millions d'hectares de forêts tropicales ont été anéantis en Afrique, 12,2 millions en Asie, 18,4 millions en Amérique centrale et du sud (Kelley, 1983).

La zone sahélienne, au nord du Sénégal, est caractérisée par l'existence d'écosystèmes arborés à très faible productivité. Les espaces boisés, bien que s'épuisant, constituent pourtant la source majeure de matériaux de construction ou de fabrication des objets à usage domestique ainsi que la principale source d'énergie calorifique sous forme de bois de chauffe ou de charbon de bois. Ils constituent, de plus, pendant la saison sèche, la principale source de fourrage pour le bétail et participent à la protection et à la régénération des sols en permettant leur stabilisation et le redressement de leur niveau de fertilité (Gerakis et Tsangarakis, 1970; Giffard, 1974; Poupon, 1980; Bernhard-Reversat, 1982; Zech, 1984 (cités par Badji, 1992); Dommergues, Duhoux et Diem, 1988).

Les années de sécheresse qui ont sévi au cours de ces deux décennies ainsi que les ponctions abusives effectuées sur le patrimoine forestier naturel ont considérablement affaibli la végétation ligneuse. Au Sénégal, des données statistiques ont permis à Buttoud (1989, cité par Badji, 1991) d'établir que ces dégradations correspondent à une déforestation moyenne annuelle supérieure à 50000 hectares.

Face à cette perte considérable de biomasse et à l'avancée galopante du désert, il est urgent de promouvoir l'implantation d'espèces forestières bien adaptées aux conditions écologiques et peu exigeantes sur le plan nutritionnel (Dommergue *et al.*, 1988).

La lutte contre la désertification en zones arides et semi-arides où l'érosion et la surexploitation ont provoqué de graves problèmes d'épuisement des sols, rendant ceux-ci pratiquement improductifs, doit passer par la réussite de vastes programmes de reforestation (Allioux, 1990). Des programmes de régénération artificielle ont été conduits depuis plusieurs années en vue de renouveler le capital forestier dégradé.

Les premiers essais se sont soldés par des échecs par manque de rusticité des espèces utilisées, car on s'était attelé à l'époque à intensifier l'implantation d'espèces exotiques réputées faciles à multiplier et à croissance rapide, sur des sols rendus infertiles ou dégradés par les cultures. Dans de telles conditions, il apparaît nécessaire de disposer de plantes ligneuses aussi frugales et rustiques que possible (Dommergues, Duhoux et Diem, 1988). C'est pourquoi, les programmes de reboisement lancés au cours des dernières années, ont privilégié les espèces ligneuses autochtones, plus robustes et adaptées aux exigences écologiques de la zone (Badji, 1991). Parmi celles-ci figurent en première place les Légumineuses arborescentes et en particulier les acacias sahéliens.

Les perspectives d'utilisation des espèces de Légumineuses dans l'amélioration des sols et la mise en valeur de certains écosystèmes agroforestiers, nécessitent la sélection et l'amélioration génétique de ces végétaux dont les géotypes les plus performants doivent être retenus et multipliés.

La culture *in vitro* est un puissant outil pour la production massale d'individus sélectionnés, d'une part par la stimulation de la croissance due aux conditions *in vitro* et d'autre part par la possibilité qu'elle offre de pouvoir étudier au sein d'une population végétale donnée les géotypes présentant les meilleures potentialités de clonage.

Cependant ces deux approches ne doivent pas faire oublier que le développement du végétal *in situ*, dans des conditions climatiques et édaphiques très aléatoires, dépend avant tout de son adaptation au milieu. En particulier, en raison de la très faible pluviométrie qui caractérise la zone sahélienne, 200 à 400 mm de pluies par an, réparties sur une période de 3 à 4 mois, les espèces végétales retenues doivent être capables de développer un système racinaire particulier qui leur permettra de survivre en dépit des longues périodes sèches de l'année.

La présente étude porte sur le clonage d'une Légumineuse arborescente: *Acacia raddiana* et comporte deux volets:

- le premier consiste en une tentative de néoformation *in vitro* de bourgeons et de tiges à partir de fragments de racines isolées d'une espèce qui ne drageonne pas dans la nature. Nous avons utilisé comme témoin, *Acacia albida*, espèce appartenant au même genre et produisant naturellement des pousses à partir de ses racines (des plantes entières ont déjà été régénérées *in vitro* à partir des racines de cette espèce par Gassama et Duhoux (1992));
- le second volet porte sur l'étude des facteurs de l'enracinement, *in vitro*, de l'*Acacia raddiana*. Il s'agit de déterminer les conditions d'optimisation de la production de racines à partir des vitroplants de cette essence condition *sine qua non* pour la réussite d'une bonne acclimatation.

En effet chez la plupart des espèces ligneuses, l'enracinement des vitroplants pose d'énormes difficultés. Chez l'*Acacia raddiana*, avec un matériel végétal très juvénile, issu de semis (boutures de première génération) Kparé (1992) a réussi à obtenir un très bon taux d'enracinement (90% de microboutures enracinées) sur milieu Murashige et Skoog (1962) enrichi de 1,2 mg/l d'AIB. En revanche les boutures de la deuxième génération et celles de la troisième perdent progressivement une bonne partie de leurs potentialités organogénétiques. A la troisième génération, par exemple, après 60 jours de culture, le taux d'enracinement a fortement chuté (2%), malgré la gamme de milieux testés, à base des éléments minéraux de Murashige et Skoog (1962) dilués de moitié, sans ou avec des doses faibles à moyennes de phytohormones (auxines et cytokinines). Ces

milieux avaient servi à la fois pour l'élongation et l'enracinement des explants. En prolongement de ces résultats préliminaires, nous avons pensé que le problème posé par l'enracinement de l'*Acacia raddiana*, *in vitro*, doit être abordé différemment. C'est pourquoi, tout comme cela a été réalisé sur des espèces ayant présenté les mêmes difficultés, parmi lesquelles nous pouvons citer l'*Acacia senegal* (gommier) (Badji, 1991), nous avons dissocié d'une part, la phase d'élongation des pousses de celle d'enracinement, et d'autre part, initié une phase d'induction et une autre d'expression racinaire. Par ailleurs, l'étude du comportement racinaire des différents types de matériel végétal nous paraît très utile dans le choix des critères de sélection des essences à fonctions multiples utilisées notamment dans les systèmes agroforestiers.

L'analyse bibliographique que nous vous présentons fait état de l'étude des deux volets, annoncés plus haut, par différents auteurs et sur des espèces également différentes.

**A - ANALYSE
BIBLIOGRAPHIQUE**

A. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

I REGENERATION DE PLANTULES A PARTIR DE LA CULTURE *IN VITRO* DE JEUNES RACINES EXCISEES:

La production de bourgeons à partir de racines ou drageonnage est un phénomène naturel qui constitue une des voies privilégiées de propagation clonale chez certaines espèces végétales.

Depuis de nombreuses années, des auteurs se sont intéressés à la culture des racines isolées.

En 1923, Robbins et Maneral établirent les conditions de régénération de bourgeons à partir des racines de *Convolvulus sp.*

Bonner et Dévirian (1939), puis Bonner (1940) réussirent à maintenir, respectivement, en culture continue des racines de *Raphanus sativus* et de *Medicago sativa*.

La culture *in vitro* a été utilisée efficacement pour l'étude des facteurs de régulation à l'origine de la différenciation de bourgeons à partir de fragments de racines (Lazzeri et Dunwell, 1984).

A coté des voies de propagation végétative comme la culture de noeuds et d'apex qui sont possibles grâce à la présence de structures particulières préexistantes: les méristèmes, la culture de racines isolées en vue d'obtenir des bourgeons, tout comme la culture de pièces florales, d'anthères ou de grains de pollen, supposent, quant à elles, la mise en oeuvre de la totipotence cellulaire végétale.

La culture *in vitro* de racines isolées, pour la multiplication d'espèces végétales a été explorée chez diverses espèces.

C'est ainsi que les conditions de croissance et de subculture de racines de *Lycopersicon esculentum* furent établies par White en 1934.

Levine (1951), obtint la régénération de bourgeons sur racines de *Nicotiana affinis*.

En 1975, Banerjee et Gupta parvinrent à obtenir des embryoides puis des plants diploïdes, à partir de segments de racines de *Nigella sativa*.

En 1984, Mariotti *et al.*, isolèrent des protoplastes à partir des racines de *Medicago sativa*.

La plupart des travaux sur la régénération de bourgeons à partir de racines isolées, ont concerné des végétaux qui possédaient

naturellement la faculté d'émettre des drageons.

A titre d'exemples, des travaux ont été consacrés à quelques légumineuses arborescentes ou non.

Chez les Légumineuses non arborescentes des bourgeons ont été obtenus à partir des racines de *Melilotus alba* (White, 1938 a); *Medicago sativa* (Robbins, 1922 a; White, 1937 a; Bonner, 1940 b); *Phaseolus vulgaris* (Bunting et Harrocks, 1964); *Vicia sp* (White, 1938 a).

A partir des années 1970, des auteurs vont s'intéresser aux Légumineuses arborescentes et proposer des méthodes pour augmenter la multiplication d'arbres forestiers, grâce à l'obtention de nombreux bourgeons adventifs issus du cortex des racines en culture. C'est ainsi que des bourgeons ont été obtenus chez *Dalbergia sissoo* (Hahlbrock *et al.*, 1974; Mukhopadhyay *et al.*, 1981); *Albizia lebeck* (Gharyal et Maheshwari, 1981); *Dalbergia latifolia* (Mascarenhas *et al.*, 1982a); *Acacia albida* (Gassama et Duhoux, 1992).

Des travaux récents nous ont, en outre, révélé que même chez des espèces non drageonnantes il est possible d'obtenir des bourgeons sur fragments de racines si, toutefois, ils sont mis en culture dans un milieu approprié ayant une composition minérale et hormonale particulières. Ainsi Margara (1978) puis Lazzeri et Dunwell (1984), ont pu montrer sur diverses crucifères notamment chou-fleur et chicorée endive d'une part et des racines de *Brassica sp.* d'autre part, en utilisant diverses combinaisons d'auxines et de cytokinines, qu'on peut obtenir des bourgeons sur fragments de racines isolées de ces plantes. Chez les espèces ligneuses forestières Allieux (1990) a pu stimuler la néoformation de bourgeons à partir de fragments de racines d'une Casuarinacée: *Allocasuarina verticillata*, espèce non drageonnante naturellement.

L'ensemble de ces recherches a permis de proposer une alternative pour la propagation d'espèces réticentes aux autres techniques de multiplication (Allieux, 1990). Toutefois il n'y a pas eu à notre connaissance de recherches consacrées aux cultures *in vitro* de racines isolées de Légumineuses arborescentes non drageonnantes.

II. ETUDE DES FACTEURS DE L'ENRACINEMENT

1. Structure anatomique du méristème de racine.

Le méristème de racine est terminé par une coiffe protectrice constituée de cellules qui se desquament et meurent. D'après des études effectuées pendant les dernières décennies, on admet généralement l'existence dans le méristème racinaire, d'un "centre quiescent" situé immédiatement au-dessous des cellules génératrices de la coiffe. Les cellules du centre quiescent présenteraient une activité mitotique faible ou nulle (Clowes, 1959). Dans certains cas le centre quiescent des jeunes racines n'est pas bien visible; il se développera plus tardivement (Margara, 1982).

Plusieurs théories ont été avancées concernant la structure du méristème de racine, parmi celles-ci, la théorie d'Hanstein (1868)(citée par Clowes, 1959) appelée théorie des Histogènes, généralement abandonnée, supposait l'existence de 3 couches de cellules initiales dans le méristème apical: les histogènes. Ces couches histogènes: dermatogène, périblème et plérome, donneraient naissance respectivement à l'épiderme, à l'écorce et au cylindre central.

La structure du méristème de racine est nettement plus simple que celle du méristème de tige. Il ne présente normalement pas d'expansions latérales, les racines latérales se formant, en effet, à une certaine distance du méristème apical. Elles ont généralement une origine profonde (souvent péricyclique) par opposition à l'origine souvent superficielle (avec cependant des exceptions) des méristèmes caulinaires, axillaires ou adventifs (Margara, 1982).

2. La convertibilité des méristèmes de tige et de racine

Le problème de l'interconvertibilité des méristèmes, autrement dit la possibilité d'un méristème de tige à se transformer en un méristème de racine et *vis versa* a suscité beaucoup de controverses. Les avis sont très partagés eu égard à la structure et au fonctionnement très différents des deux types de méristèmes, bien que Emberger (1960) ait pu établir que les deux types d'axes (caulinaire et racinaire) ont la

même origine au cours de la phylogénie et ne présentent pas de différences réellement fondamentales.

Chez les Angiospermes, on admet généralement, qu'il n'y a pas de convertibilité possible entre les deux types de méristèmes et les quelques exemples considérés comme des transformations d'un apex de racine en méristème de tige se rapportent probablement à la néoformation latérale d'un méristème caulinaire à la suite de la dédifférenciation localisée des tissus racinaires.

En effet Ballade (1970) a pu établir chez le Cresson: *Nasturtium officinale* (plante portant naturellement à l'aisselle des feuilles des bourgeons et des racines), que l'application d'une cytokinine (Kinétine) sur des noeuds isolés portant de très jeunes racines, (d'environ 0,4 mm), peut provoquer la formation d'un méristème caulinaire à la place du méristème racinaire.

A l'inverse des Angiospermes, chez certains Cryptogames vasculaires dont les Sélaginelles (Ptéridophytes) le jeune méristème indéterminé peut évoluer en méristème de tige ou de racine (Wochok et Sussex, 1975).

Cette interconvertibilité du jeune méristème chez les Sélaginelles fournit un exemple remarquable de plasticité du méristème; ce qui a poussé Margara en 1978 à émettre l'hypothèse selon laquelle le manque de plasticité du méristème des Angiospermes serait un caractère secondairement acquis au cours de l'évolution, d'où l'espoir de le recouvrer peut-être une fois placé dans des conditions particulièrement favorables.

3. Histocytologie de la rhizogénèse.

La rhizogénèse est l'ensemble des processus physiologiques qui chez la plante aboutissent à la formation des racines.

Plusieurs auteurs ont décrit son évolution histocytologique dont l'origine ainsi que la durée dépendent de l'espèce étudiée (Berthon, 1990).

Les racines ont généralement une origine profonde: à proximité des faisceaux vasculaires, même si dans certains cas particuliers, les racines adventives sont initiées à partir de tissus superficiels parfois épidermiques (*Crassula multica*) mais plus souvent comme chez

diverses crucifères, sous épidermiques (*Armoracia rusticana*, *Cardamine pratensis*, *Nasturtium officinale*) (Favre, 1977).

Il existe dans la plante, comme a pu le montrer Chriqui (1985) des cellules pré-rhizogènes qui vont répondre en premier à toute stimulation conduisant à la rhizogénèse. Ces cellules pré-rhizogènes ont une localisation différente si l'on tient compte d'une part des espèces et d'autre part de leur appartenance ou non au groupe des ligneux.

Par ailleurs quelque soit le cas considéré, il a été établi, que les racines se forment généralement à partir du phloème (Satoo, 1955).

Des observations réalisées chez des espèces non ligneuses révèlent les divergences de vue des auteurs selon les espèces quant à l'origine des primordiums racinaires.

Ces cellules prendraient naissance au niveau des rayons phloémiens chez *Hydrangea macrophylla* (Molnar et Lacroix, 1972) et chez *Hedera helix* (Girouard, 1967) et dans les cellules parenchymateuses près du cambium interfasciculaire chez le pois (Bollmark *et al.*, 1988). Enfin Hicks (1987) observe que les cellules pré-rhizogènes bien que se développant hors du cambium ont été cependant produites par ce dernier.

Chez les ligneux, comme ont pu le noter Lowell et White (1986), les sites rhizogènes existent généralement en très petit nombre; de plus ils sont très difficiles à localiser (Hicks, 1987). Ainsi il est très difficile chez le pommier de préciser si ces cellules se trouvent dans la zone cambiale, dans le phloème primaire ou bien dans le phloème secondaire indifférencié.

Les primordiums racinaires peuvent également apparaître dans les cals (cals rhizogènes ou cicatriciels). De nombreux auteurs ont observé ces formations chez diverses espèces: chez des conifères tels que *Pinus silvestris* et *Pinus radiata* (Grönroos et Von Arnold, 1985) dont l'enracinement *in vivo* des boutures n'a lieu qu'après l'apparition d'un cal basal (Cameron et Thomson, 1969); chez le Caroubier (Thomas et Mahta, 1983); chez *Jasminum officinale* et *Jasminum grandiflorum* (Connault, 1986) et chez certaines légumineuses notamment *Acacia koa* (Skolmen et Mapes, 1976) *Acacia albida* (Duhoux et Davis, 1985) et *Acacia senegal* (Badji, 1991).

Favre (1970, 73, 77) a décrit ce cal cicatriciel comme une des premières étapes conduisant à l'enracinement de la Vigne. Il en a distingué schématiquement 4 étapes. La première marquée par des modifications cytologiques, consiste essentiellement en une "activation" générale de la base de la bouture. La deuxième est caractérisée par l'apparition de divisions cellulaires qui aboutissent à la constitution d'un massif méristématique primaire: le champ morphogénétique racinaire. La troisième recouvre l'organisation du champ morphogénétique en un méristème racinaire. La dernière correspond à l'entrée en croissance de ce méristème et à l'émergence de la première racine.

L'organisation du champ morphogénétique se fait par des allongements et des divisions cellulaires différents suivant la localisation des cellules: au centre et près des vaisseaux conducteurs de la tige, les cellules s'allongent dans le sens radial et se divisent transversalement, constituant l'ébauche du cylindre central, alors qu'à la périphérie apicale du champ morphogénétique, des recloisonnements conduisent à la mise en place d'assises cellulaires à l'origine du cortex et du rhizoderme de la future racine (Moncousin, 1987).

Ces diverses étapes par lesquelles se forment les racines, chez la vigne décrites par Favre et Madard (1969), reprises par Moncousin (1987) sont similaires à celles observées sur *Pinus radiata* (Smith et Thorpe, 1975), sur des explants de pommier (Hicks, 1987), sur le pois (Bollmark et al, 1988) et sur *Sequoiadendron giganteum* (Berthon, 1990).

4. Phytohormones et rhizogénèse.

L'enracinement des pousses issues de multiplication végétative par culture *in vitro* ne pose généralement pas problème lorsqu'il s'agit de plantes annuelles. Il n'en va pas de même avec les plantes ligneuses dont l'enracinement *in vitro* et *ex vitro* reste aléatoire (Kevers, Menard, Marchand, Hausmann et Gaspar, 1990).

La formation de racines adventives et leur développement ultérieur en un système racinaire fonctionnel et vigoureux est nécessaire au sevrage des cultures (Monteuuis et Bon, 1985).

A partir de tigelles produites *in vitro*, plusieurs techniques sont envisageables:

- enracinement des vitroplants en conditions horticoles traditionnelles (Boulay, 1977) comme cela est réalisé à l'échelle industrielle sur le *Sequoia sempervivens*;
- système mixte incluant une induction rhizogène *in vitro* suivie d'un allongement des racines ou "expression racinaire" hors tube *in vivo*.
- rhizogénèse entièrement effectuée *in vitro* généralement sur milieu gélosé bien que d'autres substrats de diverses natures puissent être utilisés (Ex substrat de polypropylène chimiquement neutre jouant le rôle de support physique) (Boulay, 1984; Rancillac *et al.*, 1982).

Pour notre part, cette 3^{ème} méthode a retenu notre attention et a été utilisée pour l'étude de la rhizogénèse chez *Acacia raddiana*.

4.1. Apports d'Auxines exogènes.

En fonction des espèces étudiées comme le rappellent Bekkaoui *et al.*, (1983) l'enracinement *in vitro* peut être obtenu sur milieu unique contenant de faibles doses d'auxines, comme c'est le cas chez *Kalmia latifolia* et *Rhododendron catawbiense* (Kevers, Menard, Marchand, Hausmann et Gaspar, 1990) ou bien nécessiter deux phases successives complémentaires: traitement inducteur en présence d'auxine puis transfert des explants sur un milieu "d'expression racinaire" exempt d'auxine et permettant l'allongement des ébauches racinaires.

Un tel traitement a été utilisé avec succès chez des espèces ligneuses tels que le séquoia géant (Monteuuis et Bon, 1985; Berthon, 1990); le *Jasminum grandifolium* et le *Jasminum officinale* (Connault, 1986) en utilisant comme explants de base un matériel végétal issu de clones adultes réputés être difficilement enracinables.

Chez les légumineuses et en particulier les légumineuses arborescentes les mêmes problèmes se posent pour obtenir un enracinement à partir d'explants âgés même rajeunis soit *in vitro* ou recepés en serre.

Néanmoins de très bons résultats ont été obtenus sur milieu de multiplication contenant des doses faibles à moyennes d'auxines notamment chez *Acacia albida* (Duhoux et Davis, 1985; Gassama, 1992); chez *Cerotonia siliqua* (Sebastian et McComb, 1986); *Dalbergia sissoo* (Mukhopadhyay et M'Ram, 1981), *Robinia pseudoacacia* (Chalupa, 1981 à 1983) mais dans la plupart des cas après passage des explants sur un milieu inducteur: *Acacia koa* (Skolmen et Mapes, 1976); *Dalbergia latifolia* (Mascarenhas et al., 1982 a); *Leucaena leucocephala* (Goyal et al., 1985) *Tamarindus indica* (Mascarenhas et al., 1982); *Acacia senegal* (Badji, 1991).

Les effets d'une auxine exogène sur l'enracinement dépendent de la nature du composé utilisé, de la dose employée et du temps de traitement (Gaspar et al., 1990).

En 1987, Gaspar et Coumans ont pu établir que l'apport d'auxines synthétiques (ANA, AIB, 2,4-D) est généralement plus efficace que celui d'auxine naturelle (AIA) pour l'induction racinaire, car l'AIA est photosensible et est rapidement métabolisé dans la plante (Jackson and Mcwha, 1983; Collet et Le, 1985; Kendall, Park et Mer, 1971).

L'auxine exogène est apportée au milieu d'induction à des concentrations relativement élevées: 10^{-7} à 10^{-5} M (Margara, 1982). Ces fortes concentrations liées à une longue phase d'induction (plusieurs jours) induisent souvent la formation d'un cal avant la formation racinaire chez les plantes ligneuses ce qui ralentit leur enracinement (Satoo, 1956; Grönroos, 1985).

Depuis quelques années de nombreux auteurs s'intéressent à l'absorption et au métabolisme des substances de croissance apportées par le milieu de culture.

Jarvis et Sharheed (1986 a) ont pu observer que l'absorption est d'autant plus forte que l'auxine est en forte concentration, et qu'elle diminue avec l'âge du matériel, de même que le transport acropète de l'auxine exogène dans la plante. Ce transport acropète est lui-même augmenté par une forte concentration d'auxine dans le milieu (Jarvis et Shaheed, 1986 b).

L'absorption de l'auxine par la plante entière dépendrait de sa concentration dans le milieu (Barendse et al., 1987).

L'auxine va être métabolisée au cours de sa migration. Les métabolites seraient une forme de stockage (Riov et al., 1979; Wiesman

et al., 1988; Norcini et Heuser, 1988) ou de détoxification (Andreae, 1967).

Il semble que la teneur en AIA libre doit être importante pour une bonne rhizogénèse (Greenwood et al., 1974).

Ainsi chez l'olivier et la vigne, Espstein et Lavee (1984) observent un faible enracinement quand le métabolisme de l'AIA est trop rapide. De même, Jarvis et Shaheed (1986 a) montrent que le métabolisme de l'AIA est plus intense chez le haricot âgé, à faible enracinement.

Hess (1969) et Haissig (1974) pensent que le métabolisme de l'auxine et plus particulièrement la formation de complexes avec les composés phénoliques, peut favoriser la rhizogénèse.

4.2 Les régulateurs de croissance endogènes.

Très peu d'auteurs se sont penchés sur l'analyse du contenu endogène en phytohormones. La plupart d'entre eux ont fait une analyse indirecte en considérant que l'apport d'auxine nécessaire pour la rhizogénèse entraîne une augmentation du taux endogène et que cette augmentation favorise la formation des primordiums racinaires (Berthon, 1990).

Les phytohormones endogènes ont d'abord été mises en évidence par des tests biologiques (test *Avena* de Went, test mésocotyle de Nitsch, test *Pisum* de Went et Van Oberbeck) puis elles ont été séparées par chromatographie en phase gazeuse. Les techniques sont alors devenues plus précises (Bruner, 1978) et le dosage immunologique technique plus sensible que les précédentes est maintenant de plus en plus utilisé. Grâce au test ELISA, les fluctuations des régulateurs de croissance endogènes ont pu être mises en évidence chez *Chrysanthemum morifolium* (Weigel et al., 1984); la tomate (Maldiney et al., 1986) et chez *Sequoiadendron giganteum* (Berthon, Maldiney, Sotto, Gaspar et Boyer, 1989).

La méthode de dosage par test ELISA comporte une phase d'extraction et une phase de purification des composés endogènes. L'extraction se fait à froid (4°C) en solution aqueuse contenant 80% de méthanol en présence de BHT (butylated Hydroxytoluene), qui empêche l'oxydation des substances et la purification se fait en présence d'un marqueur standard (AIA, ABA ou Zéatine) qui permet d'apprécier leur degré de pureté.

Parmi les substances endogènes mises en évidence nous citerons: l'auxine (AIA), les cytokinines et l'acide abscissique. Toutes ces substances, selon les espèces végétales, le type et l'âge des explants ont une activité rhizogène plus ou moins marquée.

4.2.1. L'auxine.

L'enracinement de nombreuses espèces végétales, surtout ligneuses nécessite l'apport d'auxine. Même si Biran et Halevy, (1973) puis Greenwood *et al.*, (1976) ont pensé que le niveau auxinique n'est pas un facteur limitant, l'absence d'enracinement adventif chez certaines boutures a souvent été attribuée à un niveau auxinique endogène trop faible (Smith et Wareing, 1972; Roberts et Fuchigami, 1973).

Ainsi Blakesley *et al.*, (1985) ont mis en évidence une corrélation entre le pourcentage d'enracinement et la teneur initiale en AIA dans des boutures de *Cotinus coggygira*, en comparant l'aptitude rhizogène de boutures faites au printemps (qui contiennent beaucoup d'AIA) et de boutures d'automne (qui en contiennent 10 fois moins).

L'âge des boutures influence le taux d'enracinement. Vieitez et Vieitez (1976) ont pu constater chez *Castanea sativa*, que le taux d'auxine endogène était plus élevé chez les explants juvéniles (faciles à enraciner) que matures (difficiles à enraciner). De même Fouret *et al.* (1986) ont pu établir chez le *Sequoia sempervirens* à partir d'explants issus de semis et de clones âgés de 50 et 500 ans, que les teneurs endogènes en AIA et en acide abscissique (ABA) et surtout le rapport AIA/ABA peuvent être considérés comme des marqueurs d'états physiologiques se traduisant par des résultats d'enracinement décroissant en fonction de l'âge. Cependant Monteuis et Bon (1985) ont montré chez le séquoia géant que l'apport d'auxine à des concentrations plus élevées (100 mg/l) dans le milieu Knop dilué de

moitié, avec ou sans charbon actif, n'a pas permis un meilleur enracinement des explants de clones matures à faibles teneur endogène auxinique. Des résultats similaires ont été obtenus chez le douglas (Caruso *et al.*, 1978), ce qui montre que le taux endogène auxinique n'est pas le seul facteur limitant de l'enracinement des clones matures.

En 1984, Weigel *et al.*, par la méthode ELISA, ont pu montrer sur des boutures de *Chrysanthemum morifolium*, que:

- plus le contenu auxinique des boutures est élevé au moment du bouturage plus le nombre de racines formées est élevé;
- le contenu en AIA reste élevé jusqu'à ce que les racines se forment. A ce moment là, il retrouve son niveau initial;
- l'augmentation de la teneur en auxine libre s'accompagne d'une augmentation de la teneur totale en AIA, ce qui met en évidence une synthèse particulière d'auxine pendant la phase d'enracinement adventif (formes conjuguées de l'AIA plus stable que l'AIA libre).

En 1976, Rekoslavskaya et Gamborg, ont montré que l'acide indole-3-acétyl aspartique, composé le plus fréquemment rencontré parmi les formes conjuguées de l'AIA, stimulait les divisions cellulaires dans une suspension cellulaire de *Nicotiana* de manière plus durable que l'AIA libre. D'après Cohen et Bandurski (1978), ces résultats ne peuvent s'expliquer que par une plus grande stabilité de la forme conjuguée vis-à-vis des AIA-oxydases et par un relâchement progressif d'AIA par hydrolyse du conjugué.

Chez le *Sequoiadendron giganteum*, le dosage par test ELISA a révélé que le taux d'AIA endogène diminue très fortement au cours de l'induction racinaire (Berthon, 1990) puis il augmente considérablement jusqu'à dépasser son niveau initial pendant la phase d'expression.

4.2.2. Les cytokinines.

Les cytokinines ont été définies comme des composés qui, en présence de concentration optimale d'auxine, induisent la division cellulaire (Letham, 1978). Elles interviennent aussi dans la croissance et la différenciation cellulaire ainsi que dans le métabolisme de la plante. Ces phytohormones agissent également sur de nombreux processus physiologiques liés à la croissance et au développement des plantes, notamment durant la rhizogénèse (Skoog et Armstrong, 1970)(repris par Berthon, 1990).

Depuis Skoog et Miller (1975) on sait qu'un rapport élevé entre le taux d'auxine et le taux de cytokinine, autrement dit, une balance hormonale plus riche en auxine qu'en cytokinine favorise l'enracinement.

Nakano *et al.* (1980) concluaient que les cytokinines ne jouaient aucun rôle direct dans l'induction racinaire mais agissaient indirectement en stimulant le débourrement des bourgeons. Ce débourrement, d'après Foong et Barnes (1981), provoquerait une chute du taux de cytokinines endogènes qui serait favorable à l'enracinement.

Les cytokinines, seules, sont donc considérées comme inhibitrices de l'enracinement. Cependant chez certaines espèces, notamment le *Sequoiadendron giganteum* (Ylmaz-Lenz, 1984; Monteouis et Bon, 1985), un faible apport de cytokinines peut permettre un bon enracinement. Le rôle des cytokinines n'est donc pas élucidé et doit être réexaminé (Van Staden et Harty, 1988).

Peu de dosages du taux endogène des cytokinines ont été réalisés au cours de la rhizogénèse. Chez la tomate, le taux des cytokinines diminue très rapidement au cours de la rhizogénèse (Maldiney *et al.*, 1986), mais augmente à nouveau par la suite au moment de l'émergence de la racine formée. En 1990, Berthon par la méthode ELISA, a pu montrer sur des boutures de *Sequoiadendron giganteum*, que le taux de cytokinine (zéatine) augmente progressivement au cours de l'induction racinaire pour atteindre un maximum au bout du 6^{ème} jour. Ce taux diminue au moment de l'émergence des primordia racinaires jusqu'à son niveau initial et n'évolue plus pendant toute la phase de l'expression des racines.

composés sur l'enracinement des plantes et en particulier des espèces ligneuses. De même, de nombreux travaux font état de l'effet interactif des polyphénols, sur certaines phytohormones comme l'AIA, dont l'action essentielle inhiberait le transport de l'AIA, affecterait la rhizogénèse et interviendrait particulièrement sur le catabolisme de cette phytohormone.

Jones et Hatfield (1976), puis James et Thurbon (1979) ont montré successivement chez le pommier et le framboisier que l'apport de phloroglucinol en synergie avec l'auxine dans le milieu de culture augmente l'enracinement; par contre chez le fraisier l'apport de phloroglucinol seul permet l'enracinement des boutures, alors qu'il est réduit par un ajout d'auxine. Chez *Eucalyptus grandis*, Herman, Denisson, Friedman, Le Roux et Mckellar (1992) ont mis en évidence une présence importante de composés phénoliques qui inhibent l'enracinement, mais que l'utilisation d'antioxydants (acide borique, acide ascorbique) peut améliorer.

Chez *Sequoiadendron giganteum*, Berthon (1990) a montré en testant plusieurs composés phénoliques, sur trois clones d'âges différents, que leur influence sur l'enracinement varie avec la plante, la période de traitement ainsi que la nature et la concentration du composé phénolique. Cet auteur a pu distinguer trois catégories de composés:

- des composés neutres pour l'enracinement: acide férulique et naringénine;
- des composés stimulateurs de l'induction racinaire: acide p-coumarique, acide gallique et acide protocatéchique;
- composés stimulateurs de l'expression racinaire: acide caféique, acide chlorogénique, quercétine et rutine. De plus il a pu montrer que les composés phénoliques ont une influence sur l'activité peroxydasique et AIA - oxydasique.

A travers cette diversité de résultats, il convient cependant de distinguer deux groupes de composés phénoliques: les monophénols et les diphénols. Les premiers se comportent comme des cofacteurs favorisant la destruction de l'acide indolyl-acétique (Thomaszewski et Thimann, 1966) alors que les seconds inhibent l'action de l'AIA-oxydase (Marigo, 1979).

6. Péroxydases et enracinement.

Les peroxydases sont des enzymes extrêmement répandues chez les végétaux. Il s'agit d'apoenzymes (glycoprotéines) associées à un groupement prosthétique (ferri-porphyrine). Ces enzymes sont présentes dans tous les tissus des plantes mais en général, chaque tissu ou organe possède une composition isoperoxydasique propre (Scandalios, 1974). On les rencontre dans le cytosol (Goff, 1975), dans les lysosomes et les vacuoles (Grob et Matile, 1980). Leur association aux parois (Catesson, 1980), au plasmalemma (Boyer et Gaspar, 1980) et à l'appareil de Golgi (Catesson, 1980) a été également signalée.

Ces enzymes interviennent au cours de l'enracinement de diverses espèces végétales et des auteurs ont pu observer des fluctuations de l'activité peroxydasique notamment chez le *Prunus* (Quoirin *et al.*, 1974), *Asparagus* (VanHoof et Gaspar, 1976) *Nicotiana* (Gaspar *et al.*, 1977 a; Thorpe *et al.*, 1978), *Phaseolus* (Brunner *et al.*, 1978; Chibbar *et al.*, 1979), *Vitis* (Moncousin, 1987), *Sequoiadendron* (Berthon, 1990). Parfois, l'analyse de ces fluctuations a été couplée avec une analyse des variations du profil isoenzymatique (Gaspar *et al.*, 1975; Moncousin, 1982; Moncousin et Gaspar, 1983; Berthon, 1990).

Ces auteurs ont pu séparer le processus d'enracinement en deux phases: la phase d'induction, durant laquelle l'activité peroxydasique atteint un maximum et la phase d'initiation au cours de laquelle l'activité peroxydasique décroît.

L'activité peroxydasique peut être, également, utilisée comme marqueur d'état physiologique (Moncousin et Gaspar, 1983, Berthon, 1985). En effet ces auteurs ont montré, respectivement, chez l'artichaut et le séquoia que cette activité est intense chez les clones juvéniles et faible chez les vieux clones.

B - MATERIELS ET METHODES

B. MATERIELS ET METHODES

Nous examinerons tout d'abord le matériel biologique constitué par la plante *Acacia raddiana*. Nous verrons ensuite quels ont été les différents matériels techniques utilisés et les méthodes appliquées au cours de nos expériences.

I. MATERIEL BIOLOGIQUE

1. La plante.

1.1. Position systématique.

Super-famille des Légumineuses (=Fabacées)

Sous-famille des Mimosoïdeae, que certains considèrent comme une famille à part entière, les Mimosaceae.

Genre *Acacia*

Espèce *raddiana*

Synonymes: *Acacia tortilis* Hayne; *Acacia fasciculata* Guill. et Perrott.; *Acacia tortilis* (Forsk) Hayne ssp. *raddiana* (Savi.) Brenan; *Acacia tortilis* Hayne var. *pubescens* A. Chev.

Nom vernaculaires: Seing (Ouolof); Sayélé ou Zadié en Bambara-Malinké.

Les auteurs distinguent plusieurs sous-espèces.

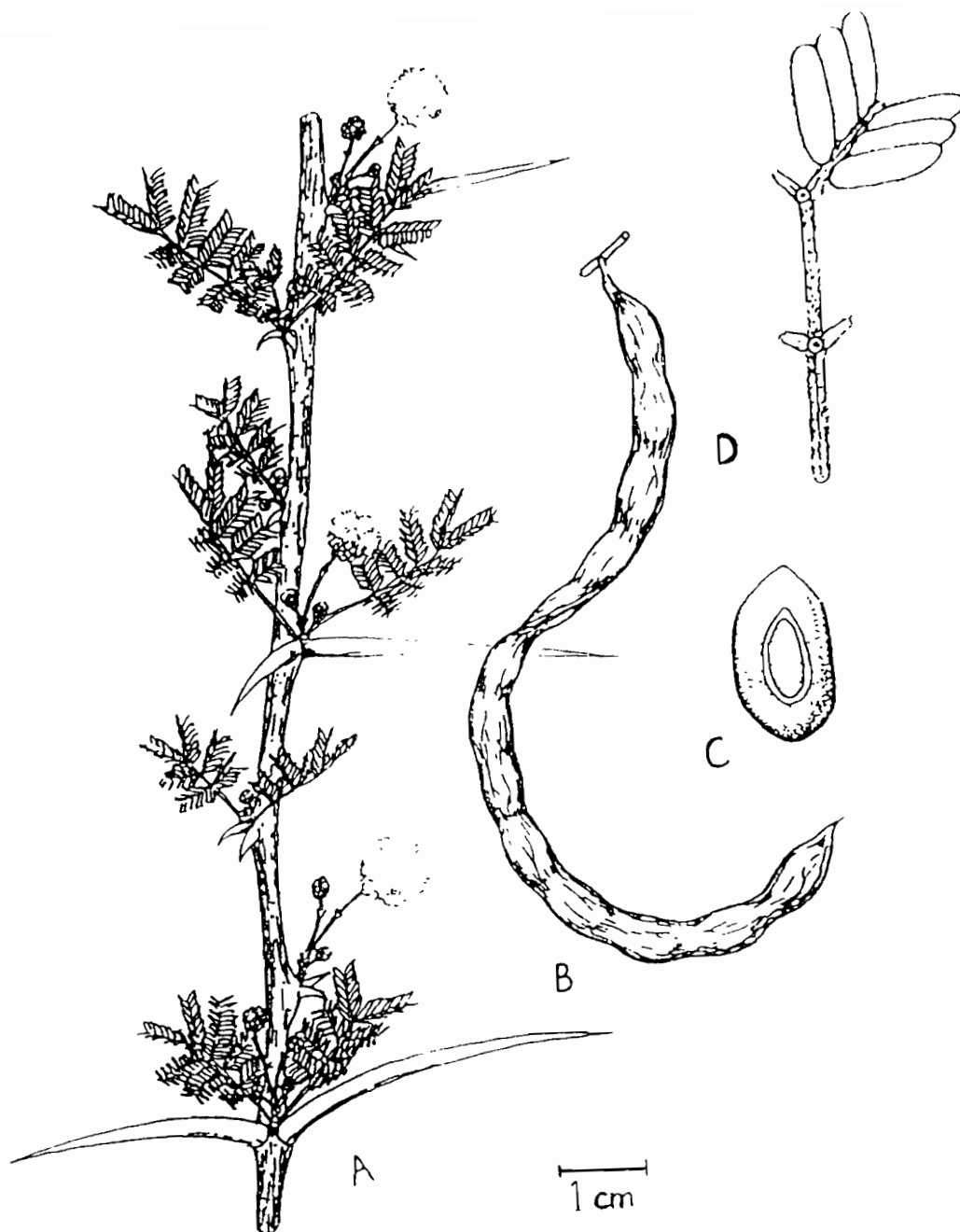


Planche 1: *Acacia raddiana* (Savi.). J.P.M. Brenan: Manual on taxonomy of *Acacia* species, F.A.O., 1983.
 (A): flowering branch; (B): pod; (C): seed; (D): detail of leaf.

1.2. Caractères botaniques

Acacia raddiana (Savi.) est un arbuste ou arbre épineux, pouvant atteindre 8 à 10 mètres de hauteur (rarement 20 mètres), avec une couronne hémisphérique ou étalée, des rameaux pendants et un port le plus souvent buissonnant.

L'arbre ou l'arbuste présente une écorce brun roux dans la jeunesse, puis brun foncé. Présentes par deux sur les rameaux à la base du pétiole, les épines longues de 2 à 5 cm (ou même 10 cm) sont blanchâtres, acérées parfois courbes ou droites (planche 1).

Les feuilles sont bipennées à phyllotaxie spiralée. Le rachis, long de 4 à 6 cm, porte 3 à 4 paires de pinnules ayant 6 à 15 paires de folioles. Les fleurs en capitules sphériques très odorantes, d'environ 1 cm de diamètre, sont portées au sommet d'un pédoncule long de 3 cm au plus. Les gousses typiquement spiralées sont longues de 10 à 15 cm et larges de 5 mm. Elles sont vertes dans la jeunesse, brun clair à maturité et contiennent jusqu'à 10 graines brunes, ovales avec sur les deux côtés une concavité ovale foncée (Aubréville, 1950; Giffard, 1974; Berhaut, 1975; Von Maydell, 1983).

1.3. Ecologie et intérêt économique de l'espèce.

Arbre des régions arides et semi-arides, *Acacia raddiana* se rencontre le long des deux rives latitudinales du Sahara, dans une bande nord-sud qui s'étend depuis le sud marocain (Tindouf) et le sud tunisien (Bled Talla vers Gafsa) jusqu'au Sahel de l'Afrique occidentale et centrale. L'espèce se rencontre également le long de la bordure méridionale du Sahara, dans une région qui s'étend d'Ouest en Est depuis le Sénégal jusqu'à l'Afrique orientale (Soudan anglo-égyptien) et l'Arabie du sud (Péninsule arabique). Il pousse aussi au Proche et au Moyen-Orient et en Afrique du sud (Aubréville, 1950; Sahni, 1968; El-Amin, 1972; Brenan, 1983; Von Maydell, 1983) (planche 2).

Au Sénégal, l'espèce est plus commune sur tous les ergs morts du Cayor et les dunes de sable du Ferlo, où elle forme des peuplements clairs, très étendus facilement reconnaissables à distance grâce à son port étalé (Berhaut, 1975). En 1976 Nongonierma avait proposé la

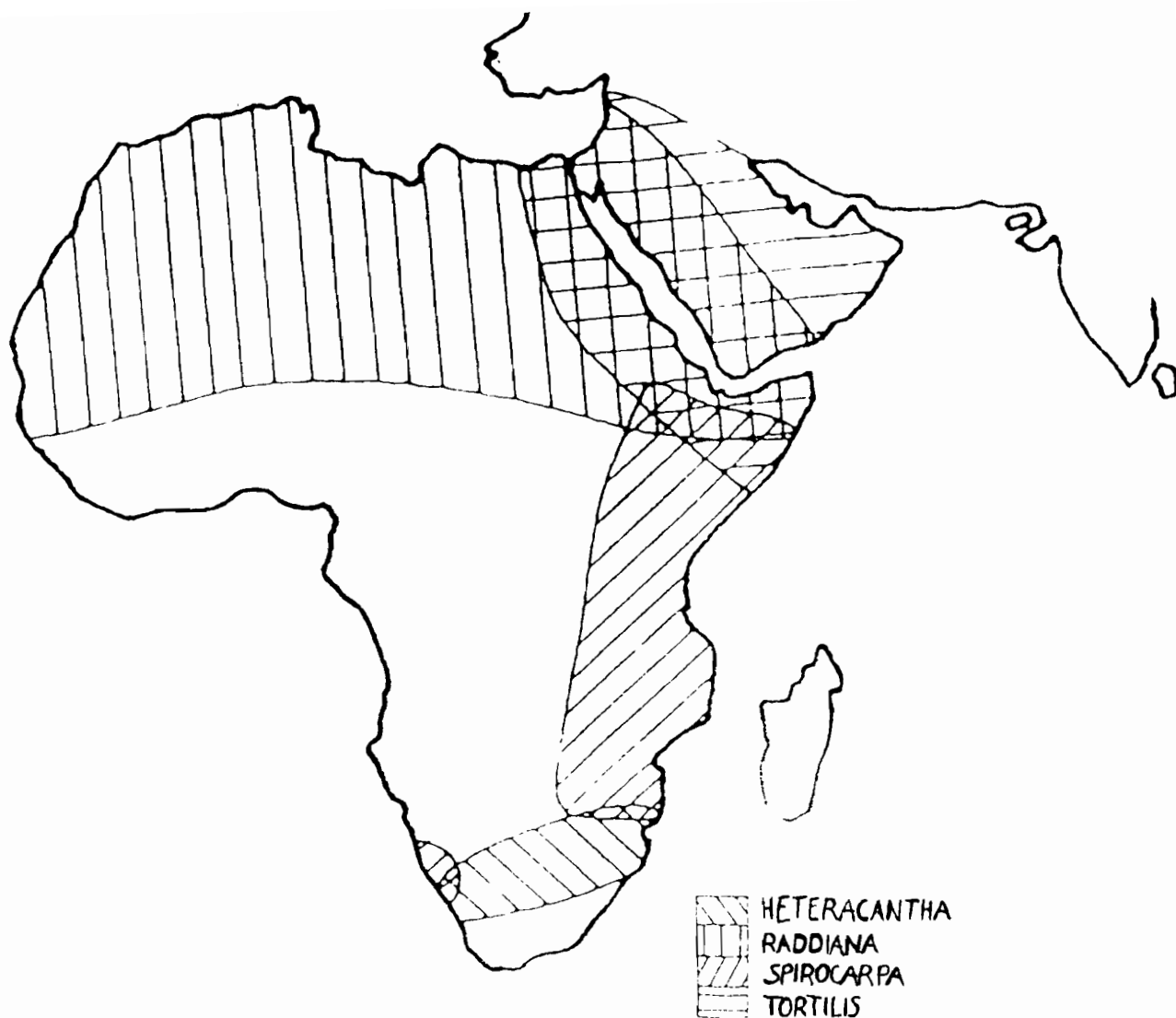


Planche 2: Carte de distribution géographique des différentes sous-espèces d'*Acacia tortilis*. J.P.M. Brenan: Manual on taxonomy of *Acacia* species, F.A.O., 1983.

création d'une nouvelle variété vivant au Sénégal en observant, durant 6 années successives, trois arbres qui bien qu'ils présentent les mêmes caractères morphologiques de l'espèce, ne grenent pas. Cependant des investigations plus poussées devront être poursuivies en faisant appel notamment aux méthodes génétiques qui devraient permettre de vérifier si ce caractère observé pourrait être héritable ou si elle correspond tout simplement à une variation liée à un phénomène d'accommodation.

Poussant dans les régions sub-tropicales et tropicales chaudes et arides, caractérisées par une pluviométrie annuelle de 50 à 1000 mm et par une sécheresse annuelle de 9 à 11 mois, l'espèce atteint son plein développement sur les sols alcalins profonds, limono-sableux situés au bord des points d'eau temporaires ou permanents au voisinage des puits. Il ne tolère aucune inondation et évite les dunes récentes (Von Maydell, 1983).

Au Soudan l'espèce pousse bien, et d'une manière indifférente, du Nord au Sud, sur régions désertique (pluviométrie moyenne annuelle inférieure à 75 mm), semi-désertique (pluviométrie moyenne annuelle comprise entre 75 et 300 mm) et de savane (pluviométrie moyenne annuelle comprise entre 300 et 800 mm) (Shmida, 1986).

Acacia raddiana (Savi.) est une espèce économiquement importante. En effet, outre les fibres qu'il produit en grande quantité, les feuilles et l'écorce (riches en tanins) sont utilisées comme vermifuges contre les maladies de la peau (oedèmes et dermatoses allergiques).

Ses jeunes rameaux et surtout les fruits mûrs tombant au sol fournissent un précieux fourrage de base pour les animaux domestiques (moutons, chèvres, chameaux) et sauvages.

Son bois est un très bon combustible et son charbon de bois peut fournir jusqu'à 4360 Kcal/Kg. Ses piquets et ses perches sont utilisés comme matériel de construction et servent de bois d'oeuvre (Von Maydell, 1983).

En dehors de la gomme qu'il produit également, *Acacia raddiana* améliore la fertilité du sol grâce à la fixation de l'azote atmosphérique par le *Rhizobium* des nodosités de ses racines (Cornet, 1982).

Enfin, il contribue utilement et efficacement à protéger les sols contre les érosions éolienne et hydrique. En effet son système racinaire à la fois traçant et pivotant sert à stabiliser et à fixer les sols dunaires dans certains pays comme la Libye et le Soudan (Jackson and Shawki, 1950; Roy, Kaul et Gyanchand, 1973 cités par Cornet, 1982; Turi, 1982; Ahlcrona, 1988; Arnborg, 1988).

2. Provenances des semences.

Les graines des végétaux étudiés sont réparties en lots en fonctions de leur provenance et/ou descendance. Trois lots de graines d'*Acacia albida* (Del.) ont été utilisés et nous ont servi de témoins dans notre étude du bourgeonnement à partir de la culture des racines isolées. Le premier lot de graines en provenance de Ouadiour (Centre nord du Sénégal) a été aimablement mis à notre disposition par Madame Yaye Kène Gassama-Dia, maître Assistante au département de Biologie Végétale de l'Université Cheikh Anta Diop. Le deuxième lot nous a été gracieusement fourni par l'Institut Sénégalais de Recherches Agricoles (ISRA.) par le canal de la Direction des Recherches sur les Productions Forestières (DRPF.). Le troisième lot en provenance du Mali a été mis à notre portée par le laboratoire de Génétique et d'Amélioration des plantes du centre Orstom de Bel-Air.

Les graines d'*Acacia raddiana* (Savi.), réparties en trois lots également, en provenance de Dahra (familles 88S37; 88A15 et 88A16), de Mbarigo, et de Tunisie ont été mises à notre disposition par le laboratoire de Génétique et d'Amélioration des plantes de l'Orstom.

II. MATERIELS, TECHNIQUES ET METHODES.

1. Préparation et conduite du matériel biologique.

La préparation et la conduite du matériel biologique concernent les cultures, les conditions de cultures et les récipients utilisés au cours des différentes manipulations.

1.1. Les cultures.

1.1.1. Prétraitement des graines et milieux de germination.

a. Prétraitement des graines.

La plupart des semences des espèces sahéliennes et soudaniennes ont un tégument dur imperméable à l'eau, qui provoque un phénomène de dormance; ces graines mettent souvent longtemps à germer, provoquant une hétérogénéité dans les semis, néfaste à l'élevage des plants. Il est donc indispensable d'appliquer un traitement avant le semis, pour s'assurer un pourcentage final de germination élevé mais aussi une germination rapide et uniforme après le semis.

Pour rendre les graines perméables, de nombreuses techniques ont été utilisées:

- traitements humides (eau froide, bouillante ou chaude, acide, solvants organiques, alcool)
- traitements à sec (scarification mécanique).

Pour notre part les graines utilisées ont été prétraitées à l'acide sulfurique pur (95 %) puis rincées à l'eau distillée stérile (5 à 10 rinçages).

Les graines d'*Acacia albida* sont scarifiées et stérilisées, sous la hotte à flux laminaire, après un trempage dans l'acide pendant 60 mn. Pour celles d'*Acacia raddiana*, nous avons réalisé des tests préliminaires de germination en faisant varier le temps de trempage dans l'acide de 60 mn à 180 mn, dans le but de déterminer le temps optimum de trempage, c'est-à-dire devant assurer une germination homogène et une faible production des tanins contenus dans les

téguments des graines (donc un faible brunissement du milieu de germination).

b. Les milieux de germination.

Les graines ainsi stérilisées et scarifiées à l'acide sulfurique pur, sont prégermées dans l'eau distillée stérile pendant 30 mn avant d'être mises en culture dans un milieu de germination.

Trois protocoles ont été adoptés:

- germination dans des tubes contenant une solution minérale à base des éléments minéraux de Murashige et Skoog (1962) entiers ou dilués de moitié et solidifiés avec soit de l'Agar ou de la gelrite;
- germination dans des boîtes de Petri scellées avec du parafilm et contenant un papier filtre également stérile imbibé d'eau distillée stérile;
- enfin germination des graines dans une mini-serre (52.40.38 cm) contenant de la vermiculite stérilisée à l'autoclave à 121°C pendant 30 mn.

1.2. La multiplication végétative.

Le clonage d'une espèce peut se réaliser par différentes manières. Nous avons utilisé deux voies en fonction du type d'explant initialement choisi: celle de la régénération et celle du microbouturage.

1.2.1. Les explants.

a. La régénération: les cultures de racines isolées.

Les explants utilisés pour les cultures de racines isolées sont des fragments de racines de plantules axéniques d'*Acacia albida* et d'*Acacia raddiana* âgées de 15 et 30 jours. Les racines débarrassées des radicelles et de l'apex, sont découpées aseptiquement, sous la hotte à flux laminaire, en segments de 2 à 3 cm de longueur. Ces explants sont ensuite placés dans des boîtes de Petri (10 segments par boîte) scellées avec du parafilm et contenant environ 18 ml de milieu gélosé.

Trois types de segments numérotés de 1 à 3 ont été utilisés et correspondent respectivement aux segments proximal, prélevé à un millimètre du collet, médian, au milieu de la racine et distal, prélevé à quelques millimètres de l'apex de la racine. Ces explants sont mis en incubation dans des chambres de culture soumises à différentes conditions d'éclairement et de température.

b. Les microboutures de tiges.

Les plantules cultivées en tube, atteignent une hauteur de 7 à 10 cm environ, au bout de 60 jours, et portent en moyenne 6 noeuds. Elles ne subissent aucune désinfection puisqu'elles ont été cultivées dans des conditions aseptiques. On les fragmente tout simplement et aseptiquement en explants de 10 mm au moins pourvus d'un seul noeud avant leur introduction en tubes contenant les milieux complets.

Par souci de clarté, nous appelons conventionnellement microboutures de première génération celles obtenues directement à partir des semenceaux et microboutures de deuxième génération celles obtenues à partir de développement du bourgeon axillaire des microboutures de première génération.

Trois types d'explants de première génération (apex, noeuds et noeuds cotylédonnaires) et deux sortes d'explants de deuxième génération (apex et noeuds) ont été utilisés.

Tableau n°1:**Composition minérale des milieux de culture utilisés en mg/l**

Macroéléments	M.S.(A)	B5(B)	JRD(A)	N30NH4(B)	WPM(A)
KNO ₃	1900	2500	950	6060	-
NH ₄ NO ₃	1650	-	825	8000	400
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	150	220	-	96
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	250	185	2460	370
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	-	-	4720	556
KH ₂ PO ₄	170	-	85	1360	170
KCl	-	-	-	3725	-
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	-	150	-	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	134	-	-	-
Microéléments					
KI	0,83				
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3				
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6				
H ₃ BO ₃	6,2				
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25				
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025				
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025				
AlCl ₃	-				
NiCl ₂ .6H ₂ O	-				

N.B.: les milieux (A) ont servi de milieux de base pour la culture des microboutures d'*Acacia raddiana*;

les milieux (B) ont été utilisés pour la culture des racines isolées d'*Acacia raddiana* et d'*Acacia albida*.

Tableau n°2:**Composition des solutions des vitamines utilisées en mg/l****Mélange**

vitaminique:	Nitsch & Nitsch (A)	Von Arnold (B)
Myo-Inositol	100	100
Thiamine-HCl	0,5	5
Acide Nicotinique	5	2
Pyridoxine-HCl	0,5	1
Biotine	0,05	-
Acide Folique	0,5	0,5

1.2.2. Les milieux de culture.

Le choix du milieu de culture est surtout guidé par les besoins nutritionnels des plantes en culture. Avec le développement de la culture *in vitro*, divers milieux de base comprenant des sels minéraux, des composés organiques et des régulateurs de croissance ont été progressivement proposés.

Plusieurs d'entre eux conviennent pour la plupart des tissus et organes végétaux. Ils sont modifiés pour être adaptés à chaque cas particulier ou suivant l'objectif recherché.

a. Les substances minérales.

Nous avons testé cinq milieux de base différents et leurs homologues dans lesquels les sels minéraux ont été dilués de moitié. Il s'agit des milieux de Murashige et Skoog (M.S.) (1962); de Gamborg *et al.*, (milieu B5) (1968); de Jordan *et al.* (JRD) (milieu R), (1978); de Margara (milieu N3ONH4), (1977-1978) et du Woody Plant Medium (W.P.M) (Lloyd et McCown, 1981).

La composition de ces différents milieux est donné dans le tableau 1.

Le fer est utilisé sous forme chélatée c'est-à-dire sous forme de FeEDTA (5.57 g de FeSO₄ et 7,45 g de EDTA) à raison de 5 ml/l de milieu.

b. Les substances organiques.

Les tissus et organes végétaux cultivés *in vitro* ont besoin pour leur croissance de substances organiques. En effet ces cultures sont généralement largement hétérotrophes vis-à-vis du carbone; ceci étant lié à l'absence de photosynthèse.

Les substances organiques comprennent d'une part, des éléments trophiques et d'autre part, des composés oligo-dynamiques (hormones, vitamines).

i. Les éléments trophiques.

Ils sont indispensables dans les milieux de culture, car ce sont les principales sources de carbone nécessaires pour la survie et le développement de l'explant. Ces composées ont une action morphogène spécifique et chez la chicorée, l'adjonction de sucre dans le milieu de culture favorise l'induction florale à partir des bourgeons de racines (Margara, 1982).

Le saccharose est le sucre le plus utilisé à la concentration de 20 à 30 g/l (Doods et Roberts, 1982; Goyal et Arya, 1984), mais le glucose peut se montrer plus efficace chez certaines plantes comme le fraisier (Boxus, 1974) et chez le Murier (Okya et Ohyama, 1982). Pour *Allocasuarina verticillata* (Lam.) L. Johnson, le maltose est conseillé (Yue Hyuacao et al., 1990). Sur les fragments de racines de *Brassica* sp., Lazzeri et Dunwell, en 1984, ont établi que le mélange glucose (20 g/l) -saccharose (10 g/l) dans le milieu de culture, fournit le meilleur taux de régénération de bourgeons comparé à l'action des deux sucres utilisés individuellement.

Dans nos expériences nous n'avons pas fait une étude systématique ni sur la nature, ni même sur la dose de sucre requises, mais en fonction des objectifs recherchés, nous avons utilisé le saccharose seul ou combiné avec le glucose.

Le saccharose a été utilisé:

- à 20 g/l pour la micropropagation des explants de 1^{ère} subculture d'*Acacia raddiana*;
- à 10 g/l pour l'induction racinaire, puis 20 g/l pour l'expression des microboutures de 2^{ème} génération.

Dans les milieux de culture des racines isolées, une combinaison de glucose (20 g/l) et de saccharose (10 g/l) a été utilisée.

ii. Les éléments oligo-dynamiques.

- Les vitamines.

Les vitamines paraissent souvent indispensables et leur absence peut provoquer des perturbations du développement de l'explant. Elles sont parfois associées à des acides-aminés, en particulier à la glycine, à la glutamine et au myo-inositol. Nous avons utilisé trois mélanges vitaminiques dits du groupe B: les vitamines de Murashige et Skoog (1962), de Nitsch et Nitsch (1965) et les vitamines de Von Arnold (1981) dont les compositions sont données dans le tableau n°2. Ces vitamines sont complexées ou non avec de l'hydrolysate de caséine (1 g/l) et de la glutamine (0,2 mg/l); la vitamine B12 ou cyanocobalamine a été systématiquement incorporée dans les milieux de culture de racines isolées à raison de 1,25 mg/l.

- Les hormones

Les régulateurs de croissance végétales ou phytohormones ont une influence très sensible sur la croissance ou le développement des tissus pour des concentrations variables selon les buts visés. Nous nous sommes intéressés aux auxines, aux cytokinines, aux gibbérellines et aux polyamines.

Les auxines jouent un rôle important dans l'organogénèse et stimulent particulièrement la formation des bourgeons et l'induction racinaire.

Les cytokinines sont connues pour leur induction de la prolifération cellulaire.

Les gibbérellines sont généralement utilisées lors de la régénération de la plante après la formation des primordia. Elles peuvent aussi agir en synergie avec les auxines pour provoquer la croissance des entrenoeuds.

Les polyamines, substances naturelles rencontrées dans les organes végétaux, ont été utilisées récemment en culture *in vitro* pour favoriser la morphogénèse. Elles jouent un rôle dans l'induction florale et la rhizogénèse. En 1992, Gassama et Duhoux ont montré que leur apport dans le milieu de culture, a davantage stimulé la

néoformation de bourgeons à partir des fragments de racines d'*Acacia albida*.

Afin de pouvoir déterminer les concentrations en phytohormones susceptibles d'induire un meilleur développement végétatif des explants (production et allongement des tiges, enracinement), nous avons testé trois auxines: l'ANA, l'AIB et l'AIA; trois cytokinines: la BAP, la zéatine et la kinétine; une gibbérelline: le GA₃ et enfin trois polyamines: la spermidine, la spermine et la putrescine.

NB.: Seules les substances naturelles thermolabiles, AIA et zéatine (substances naturelles), sont ajoutées aux milieux après filtration stérilisante à 0,2 micromètre. Les hormones de synthèse sont ajoutées avant autoclavage.

c. Autres.

Deux agents gélifiants ont été utilisés pour nos expériences :

- la Gelrite ou Phytigel à 3,5 g/l pour les cultures de racines isolées.
- le Bacto Agar Difco
 - . à 7 g/l pour la germination des graines et l'induction des racines
 - . à 6 g/l pour l'expression des racines des microboutures de deuxième subculture d'*Acacia raddiana*.

Le pH des milieux est ajusté à 5,8; après un préchauffage d'une dizaine de minutes au four à micro-ondes ou à l'autoclave (110°C pendant 5 minutes), pour fondre l'agent gélifiant (Agar ou Gelrite), les milieux sont distribués à l'aide d'un distributeur automatique (Jouan PM 600) dans des tubes à raison de 20 ml par tube puis stérilisés à l'autoclave à 110°C pendant 20 minutes. Les milieux coulés en boîte de Petri sont d'abord autoclavés puis distribués stérilement sous la hotte à flux laminaire.

1.2.3. Les conditions de l'environnement physique.

Les cultures sont placées dans des chambres de culture soumises à différentes conditions environnementales. L'état hygrométrique à l'intérieur des salles est maintenu homogène (humidité relative environ $70\% \pm 5\%$ de jour comme de nuit) par des brumisateurs (Bionaire 8T-201).

La thermopériode $30/27 \pm 0,25^{\circ}\text{C}$ est partout la même.

Le facteur variable est l'éclairement. Afin de déterminer les conditions optimales d'éclairement nécessaires pour le bourgeonnement à partir des fragments de racines, nos explants ont été répartis en lots placés dans trois modules soumis chacun à une condition d'éclairement.

La lumière est un facteur très important dans l'expression du bourgeonnement à partir des fragments de racines. Cependant, Margara (1982) puis Allieux (1990) ont pu établir respectivement chez *Cychorium intybus* (Chicorée endive) et *Allocasuarina verticillata* que le passage des explants racinaires à l'obscurité est favorable à l'induction des bourgeons.

Dans le but d'étudier le comportement des explants vis-à-vis de ce facteur, nous avons placé un lot à l'obscurité pendant deux semaines, un autre en condition d'alternance jour-nuit avec une photopériode de 16 heures. Le troisième lot est placé dans une salle de culture, en condition de jour permanent, soumise à un éclairage de 24 heures sur 24. L'éclairement est assuré par des tubes fluorescents (L58 W 77) situés latéralement, à 50 cm, par rapport aux cultures. Ces tubes fournissent une intensité lumineuse d'environ 3500 lux.

Un apport d'éclairage en rouge lointain est assuré par des ampoules, à filament de tungstène de 220 volts, sous-voltées à 55 volts. Cette source lumineuse permet de compléter le spectre de lumière des tubes fluorescents.

1.2.4. L'acclimatation.

L'acclimatation peut-être considérée comme la phase ultime car elle permet d'une part de juger de l'efficacité de la méthode de multiplication végétative *in vitro* et d'autre part, de vérifier la viabilité des microboutures à la sortie des tubes.

Les vitroplants enracinés sont sortis et repiqués dans des mottes "Melfert" puis placés dans des mini-serres, en atmosphère confinée (hygrométrie relative 100%). L'ensemble est entreposé dans une grande serre. En 10 ou 15 jours d'acclimatation l'hygrométrie relative de l'air est progressivement diminuée jusqu'à atteindre les conditions naturelles. Ce procédé d'une pratique courante (Skolmen et Mapes, 1978), permet de réduire la transpiration et évite le dessèchement des plants lors du passage des vitroplants en conditions horticoles.

2. Observation et exploitation des résultats.

2.1. Mesure de la croissance des plants.

Les observations et les mesures ont été faites sur les semenceaux, les fragments de racines et les microboutures cultivés dans les différentes conditions *in vitro*.

Les parties aériennes et souterraines sont observées et nous précisons, à chaque fois, les facteurs étudiés et les variables à analyser.

2.1.1. Appareil aérien.

a. Bourgeons issus des cultures de racines isolées.

Deux séries d'expériences ont été réalisées. Dans la première série, les facteurs étudiés concernent les espèces (2), les milieux de cultures (4), les conditions d'éclairement (3), l'origine du segment de racine (3) et l'âge des explants (2). Chaque essai a été répété 30 fois et 4320 explants ont été utilisés pour l'étude. Trois variables ont été analysées: le pourcentage d'explants régénérant, le nombre

moyen de bourgeons/explant ayant régénéré et le pourcentage d'explants nécrosés.

Cette première série d'expériences permet de compléter et de préciser les résultats de Gassama et Duhoux (1992) grâce à l'étude de certains facteurs tels que: milieu (milieu N30NH4), âge des explants et conditions de l'environnement physique (éclairage).

Les résultats de la première série d'expériences nous ont suggéré de tester, dans une deuxième série d'expériences, les effets de différentes concentrations de polyamines en lumière permanente et à l'obscurité sur les racines d'*Acacia raddiana*.

b. Les microboutures de tige.

La croissance moyenne des pousses est mesurée à intervalles réguliers. Pour cela on dénombre les noeuds et les tiges produits ainsi que la callogénèse et on apprécie la couleur des explants.

Pour exprimer le nombre des fragments bouturables nous avons utilisé le terme de taux de multiplication (TM) qui prend en considération uniquement le développement des bourgeons axillaires de microboutures en tiges de taille égale ou supérieure à un centimètre.

2.1.2. Appareil souterrain.

La vitesse moyenne d'émission des racines est évaluée en notant l'apparition des racines une fois par semaine, pendant 30 jours. L'allongement des racines est mesurée en même temps qu'on relève le nombre de racines apparues. A la fin de l'expérience, l'allongement moyen est calculé sur les explants qui se sont enracinés.

2.2. Présentation des données et analyses statistiques.

Les résultats chiffrés sont présentés sous forme de tableaux, de courbes de croissance et d'histogrammes où figurent, simultanément dans certains cas, les croissances aériennes (vers le haut) et souterraines (vers le bas).

Les variables quantitatives ont été soumises à l'analyse de variance. Pour comparer les moyennes, nous avons utilisé le test de Newman et Keuls (Gouet et Philippeau, 1986).

Les variables du développement des êtres vivants étant connues pour avoir une distribution Log normale, nous avons comparé les résultats d'analyse de variance de variables brutes (longueur des tiges) et de variables après transformation Log normale. Dans notre étude les variables après transformation ne donnent pas de résultats différents des variables brutes.

C. RESULTATS.

Nos résultats peuvent être présentés en deux grandes parties, et concernent d'une part les cultures de racines isolées, et d'autre part les facteurs de l'enracinement *in vitro*.

I. LES CULTURES DE RACINES ISOLEES

1. Milieux de germination

La démarche a été orientée vers la recherche de conditions permettant un développement maximal des plantules issues de semis. L'objectif principal était l'obtention de racines assez vigoureuses et suffisamment longues pour être utilisées comme explants.

Nous avons donc mis au point les trois protocoles précédemment décrits (cf. § 1.1.1/b). Les résultats figurent dans le tableau n°3.

Les pourcentages de germination ainsi que la croissance des racines varient selon les espèces et les milieux de germination testés (tableau n°3).

Les taux de germination les moins élevés s'observent en boîtes de Petri. Les plantules se rabougrissent et leur pivot dépasse rarement 5 cm.

Or des tests préliminaires ont montré que les explants racinaires d'*Acacia raddiana* de longueur inférieure ou égale à 1 cm se nécrosent dès la première semaine d'incubation sur milieu Murashige et Skoog avec ou sans hormones.

Cette méthode ne permet pas d'obtenir les trois types de segments (proximal, médian et distal) de taille suffisante (supérieure ou égale à 2 cm) à même d'assurer une reprise de croissance des explants.

En mini-serre, les taux de germination sont élevés. Les plantules se développent et portent des feuilles bien vertes. En revanche le pivot des plantules d'*Acacia raddiana*, bien que suffisamment long, est peu vigoureux. Par ailleurs, les plantules sont attaquées par des champignons qui provoquent une fonte de semis importante, après 7 jours de culture, affectant plus du quart des plantules, malgré deux ou trois pulvérisations au Dériclor (2 mg/ml) (substance anti-fongique) tous les sept jours pendant un mois.

Tableau n°3:

**Germination et développement racinaire d'*Acacia albida* et
*Acacia raddiana***

% germination 7 jours après semis

Environnement	<i>Acacia raddiana</i>		<i>Acacia albida</i>	
Mini-serre	100/100	100.0%	78/80	97.5%
Boîtes Petri	9/24	37.5%	13/24	54.2%
Tubes (milieu MS)	61/61	100.0%	61/61	100.0%

Longueur de la racine pivotante à 30 jours en cm

Environnement		
Mini-serre	13,3	11,5
Boîtes Petri	4	3
Tubes (milieu MS)	12,2	11,6

N.B.: les mesures de longueur des racines sont effectuées sur 24 plants choisis au hasard. Pas de différences significatives, pour le développement racinaire, entre plants cultivés en mini-serre et plants incubés en tubes.

C - RESULTATS

En tubes, sur milieu gélosé enrichi des sels minéraux de Murashige et Skoog (MS) (1962), on observe une uniformisation des taux de germination (100%). Les plantules présentent une très bonne croissance du pivot et des tiges qui atteignent 10 cm et portent en moyenne 6 à 8 noeuds.

Au vu des résultats qui précèdent, la mise en germination en tubes, sur milieu gélosé enrichi des éléments minéraux de MS, s'est révélée plus favorable en fournissant les meilleurs taux de germination et une très bonne croissance des plantules.

De plus le protocole fournit un matériel végétal axénique qui n'a nullement besoin d'être décontaminé.

2. Régénération: néoformation de bourgeons.

2.1. *Acacia raddiana*

Les fragments de racines d'*Acacia raddiana* n'ont jamais régénéré des bourgeons de manière spontanée sur l'ensemble des milieux testés.

Quel que soit leur âge, les explants de 15 jours comme ceux de 30 jours ont présenté les mêmes types de réactions vis-à-vis des facteurs étudiés (milieux et conditions d'éclairement).

2.1.1. Effet de la BAP combinée à l'AIA et à la Spermidine.

La concentration de BAP de 10 mg/l a été combinée à 0,1 mg/l et 1,5 mg/l de spermidine. Cette combinaison n'a pas permis d'induire la formation de bourgeons néoformés sur les fragments de racines. On constate une désorganisation plus ou moins importante des tissus mis en culture en présence de ces régulateurs de croissance.

A la lumière comme à l'alternance lumière-obscurité, les explants se recouvrent de petits cals spongieux de 2 à 3 mm de diamètre chlorophylliens ou non chlorophylliens. Leur apparition est plus fréquente sur les segments S₁ et l'est moins sur les segments S₂ et S₃. En revanche les segments S₃ se nécrosent plus rapidement (en moins d'une semaine de culture). Les cals envahissent toute la surface des segments racinaires, puis ils dégènèrent. Les explants

incubés sur milieux B5 se nécrosent plus rapidement que les explants cultivés sur milieu $N_3O NH_4$.

A l'obscurité, les manifestations callogènes sont plus importantes. Les explants se transforment en plus gros cals, spongieux et achlorophylliens. On observe très peu de nécroses sur les deux milieux testés. Mais transférés à la lumière, ils dégénèrent assez rapidement au bout de 2 semaines de culture.

2.1.2. Effet des polyamines

La spermidine a été testée à la concentration de 1,5 mg/l. Cette dose n'a permis d'obtenir aucune néoformation de bourgeons. Aucune formation de cals n'a été observée.

A la lumière, les explants incubés sur milieu B5 tout comme ceux cultivés sur milieu $N_3O NH_4$, se nécrosent systématiquement au bout d'une semaine de culture. A l'obscurité, on n'observe aucune nécrose.

Des racines latérales apparaissent souvent sur les explants cultivés sur milieu $N_3O NH_4$. Elles croissent et se ramifient à leur tour.

Transférés à la lumière, tous les explants incubés sur milieu B5 se nécrosent assez vite. Sur milieu $N_3O NH_4$, seuls les segments S_3 se nécrosent dès la première semaine. En revanche les segments S_1 et S_2 ne subissent aucune altération. Certains s'organisent et laissent apparaître au bout du 15^{ème} jour un petit renflement d'environ 3 mm de diamètre à l'une de leur extrémité. Ces structures deviennent vite chlorophylliennes et se développent. Elles peuvent avoir dans certains cas un diamètre de 5 mm, mais elles demeurent à ce stade et n'évoluent jamais en bourgeons (planche 3, photo a).

L'apparition de ces structures chlorophylliennes à l'une des extrémités des segments racinaires placés à l'obscurité puis transférés à la lumière, nous a suggéré d'étudier, dans une deuxième série d'expériences, parallèlement à l'effet de la spermidine, l'effet de deux autres polyamines, spermine et putrescine, sur les segments S_1 et S_2 des racines d'*Acacia raddiana* cultivées sur milieux B5 et $N_3O NH_4$.

Les observations suivantes ont été faites sur des segments placés à la lumière et sur des segments cultivés à l'obscurité pendant 15 jours puis transférés à la lumière.

Trois concentrations ont été utilisées pour chacune de ces phytohormones.

Pour la spermidine, les différentes concentrations utilisées (3,5-7 et 14 mg/l) n'ont pas permis d'induire la formation de bourgeons néoformés sur les fragments de racines. Aucune formation de cals n'a été observée à l'obscurité. Transférés à la lumière, les milieux B5 deviennent liquides et les explants se nécrosent au bout d'un mois de culture. Leur pH (5,19) indiquent qu'ils se sont légèrement acidifiés.

Dans les milieux $N_3O NH_4$, seuls les explants mis en culture dans le milieu contenant 3,5 mg/l ont donné des structures chlorophylliennes similaires à celles précédemment décrites.

Pour la spermine, les différentes concentrations utilisées (2,5-5 et 10 mg/l) n'ont également pas induit la néoformation de bourgeons. Il n'y a pas eu de formation de cals. Les milieux B5 s'acidifient à la lumière et deviennent liquides, tandis que dans les milieux $N_3O NH_4$ on observe invariablement dans tous les milieux des boursoufflures bien vertes à l'extrémité de quelques explants, mais elles demeurent à ce stade et n'évoluent pas en bourgeons.

Quant à la putrescine, l'utilisation de concentrations variables (2-4 et 8 mg/l) n'a pas permis l'obtention de bourgeons néoformés sur les racines. On n'observe aucune forme d'organisation des tissus des explants. Quelque soit le milieu considéré, on constate la nécrose des explants. Dans ces conditions aucun bourgeon ne s'est néoformé.

2.2. *Acacia albida*

Contrairement à l'*Acacia raddiana*, des bourgeons sont apparus sur les fragments de racines d'*Acacia albida* placés à la lumière comme sur les segments placés en condition d'alternance jour-nuit et ceux placés à l'obscurité. Une importante caulogénèse a été observée sur les milieux $N_3O NH_4$ (Margara 1978) et B5 (Gamborg *et al.*, 1968) enrichis de phytohormones. Les compositions des différents milieux figurent dans les tableaux n°1 et n°2.

Quelque soit l'âge et l'origine des explants, les bourgeons néoformés apparaissent toujours sur toute la longueur du segment racinaire (planche 3, photo b). On notera que les segments proximaux

Tableau n°4:

Influence des milieux de culture sur la régénération des bourgeons à partir de segments racinaires âgés de 15 et 30 jours après un mois de mise en culture (effectif = 90 explants par traitement).

% d'explants régénérant

Milieux	15 jours	30 jours
N30NH4(A)	37	45
N30NH4(B)	36	62
B5(A)	48	44
B5(B)	32	58

Nombre moyen de bourgeons/explant

Milieux	15 jours	30 jours
N30NH4(A)	4,0 (a)	4,5 (b)
N30NH4(B)	3,6 (a)	6,2 (a)
B5(A)	4,0 (a)	4,3 (b)
B5(B)	3,2 (a)	6,0 (a)
P (test F)	P=0,17	P=0,02

% d'explants nécrosés

Milieux	15 jours	30 jours
N30NH4(A)	7	13
N30NH4(B)	1	5
B5(A)	5	12
B5(B)	3	6

Les milieux (A) contiennent 10 mg/l de BAP, 0,1 mg/l d'AIA et 1,5 mg/l de spermidine

Les milieux (B) contiennent uniquement de la spermidine.

Intervalle de confiance $P = 0,95$.

Comparaisons de moyennes: test de Newman-Keuls au seuil de 5%.

sont plus caulogènes que les autres et plus le fragment de racine est proche de l'apex de la racine moins on obtient de bourgeons. Environ 3 à 5 jours après la mise en culture, l'épiderme s'entrouvre et laisse apparaître un cortex chlorophyllien sur lequel on peut observer à l'oeil nu, de petits nodules rouges ou verdâtres qui se développent en bourgeons.

Selon les conditions de culture, de cals friables, de plus ou moins grande taille, et de couleur généralement blanchâtre, se forment à la surface des explants. On remarque que la production de ces cals est plus importante à l'obscurité qu'à la lumière. Nous avons pu nous rendre compte, cependant, que les bourgeons se forment toujours à partir des tissus sous-épidermiques et jamais sur les cals.

Au bout de 30 jours de culture, nous avons quelque fois, observé la formation de gros cals aux extrémités des explants. Mais ceux-ci demeurent à ce stade et n'évoluent pas en bourgeons. Le développement des bourgeons en tiges feuillées bien chlorophylliennes s'effectuent très rapidement. En même temps qu'ils se développent, les néoformations de bourgeons se poursuivent et ont toujours lieu au niveau de formations similaires à celles précédemment décrites. Dans ces conditions certains explants peuvent présenter plus de 15 bourgeons.

2.2.1. Influence des milieux de culture.

Les segments de racines ont été placés dans les solutions minérales $N_3O_{NH_4}$ (Margara, 1978) et B5 (Gamborg *et al.*, 1968) enrichies soit avec une combinaison à base de BAP, d'AIA et de spermidine, soit de spermidine seule. Pour chaque condition de milieu, on a relevé le pourcentage de régénération c'est-à-dire le nombre de segments racinaires ayant régénéré sur le total des explants mis en culture, le nombre de bourgeons et le taux de nécrose (tableau n°4).

Dans nos conditions expérimentales, les pourcentages de régénération ainsi que le nombre moyen de bourgeons par explant et les taux de nécrose varient selon les milieux de culture et l'âge des segments racinaires mis en culture (tableau n°4)

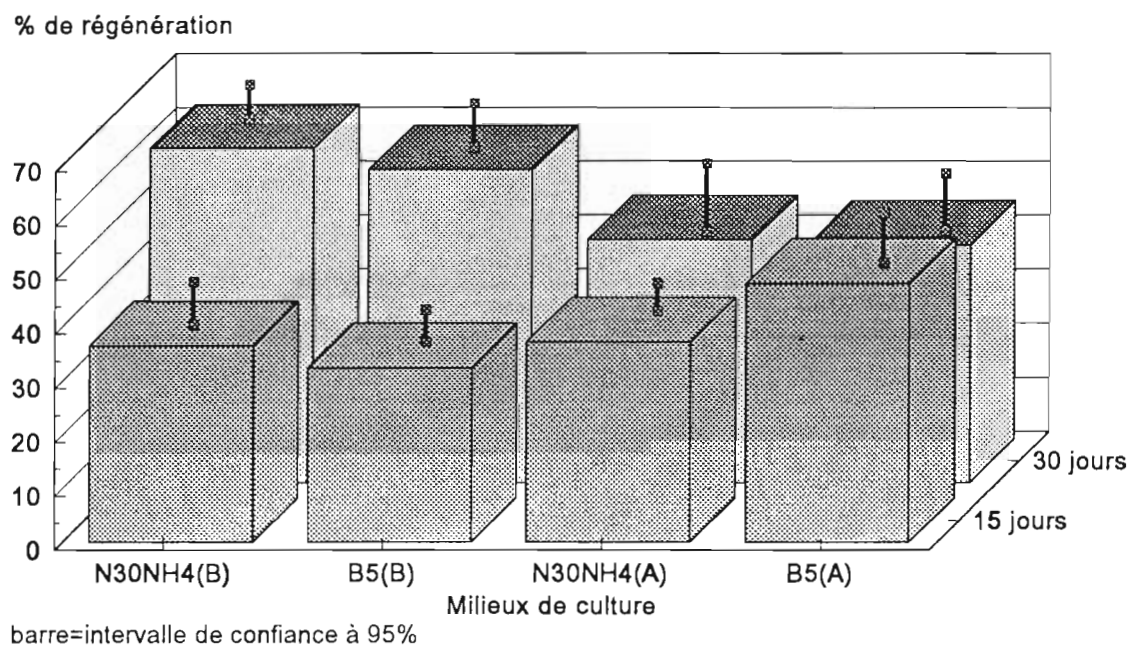
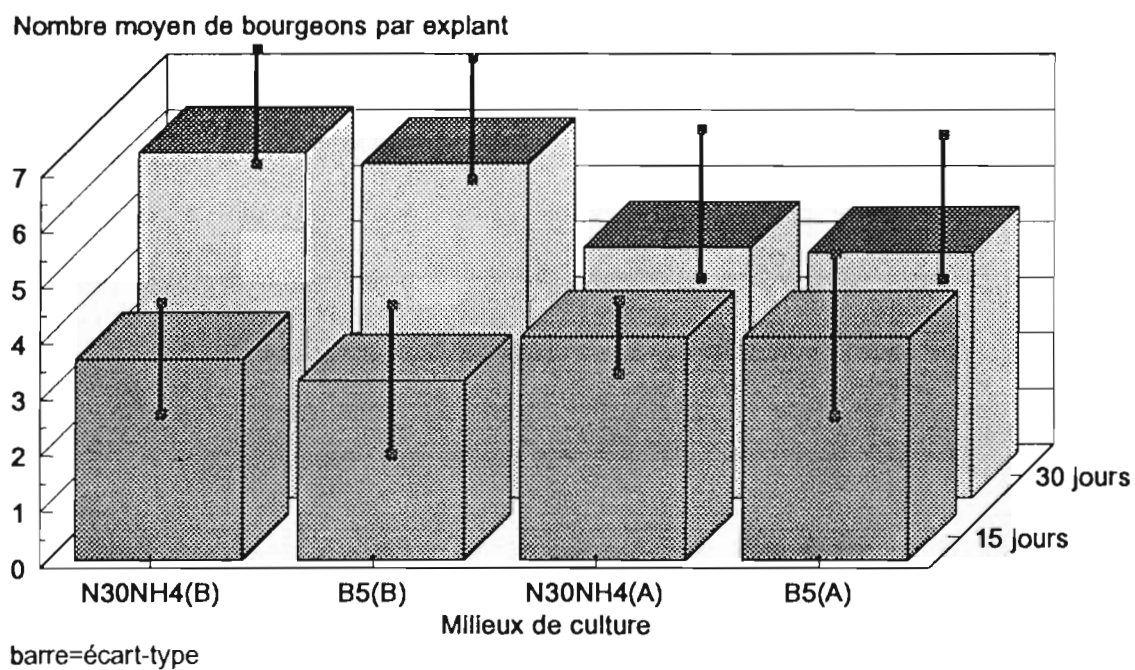


figure n° 1: Régénération de bourgeons sur racines d'*Acacia albida*:
Interaction entre l'âge des explants et la nature des milieux
de culture

a. Sur les explants racinaires issus de plantules âgées de 15 jours.

L'influence des milieux de culture n'est pas significative sur la production des bourgeons ($F = 1,7$; $P = 0,17$). Les pourcentages de régénération les plus élevés correspondent à ceux obtenus avec les milieux (A). Le taux maximum de régénération (48%) est obtenu avec la solution minérale B5 additionnés de BAP, AIA et spermidine aux concentrations indiquées au bas du tableau n°4.

Les pourcentages d'explants nécrosés demeurent dans l'ensemble relativement faibles. Les taux les plus élevés sont ceux obtenus avec les milieux (A).

b. Sur les explants racinaires issus de plantules âgées de 30 jours.

Les résultats de l'analyse de variance révèlent un effet milieu significatif ($F = 3,57$; $P = 0,02$) sur la néoformation de bourgeons. Nous remarquons que les pourcentages de régénération ainsi que le nombre de bourgeons néoformés par segments racinaire sont plus élevés que sur les explants âgés de 15 jours.

La figure 1, indique un effet stimulateur sur la régénération, de la spermidine quand elle est utilisée seule dans le milieu de culture (milieux B). Le pourcentage maximum de régénération (62%) est obtenu avec la solution minérale $N_3O NH_4$. Comme sur les explants âgés de 15 jours, les taux de nécrose les plus élevés sont obtenus avec les milieux (A).

Il apparaît clairement, au vu de ces résultats, que le choix de l'âge des segments racinaires à mettre en culture est très important. La réactivité des tissus aux différentes conditions de milieu serait fonction de leur degré de maturité.

Tableau n°5:

Effet de l'éclairement sur la régénération des bourgeons après 30 jours de culture sur milieux $N_{30}NH_4$ et B_5 avec BAP, AIA et spermidine combinés ou spermidine seule. (Effectif=120 explants / condition / âge / type de segment) (total = 2160 explants).

% d'explants régénérant

Conditions	15 jours			30 jours		
	S1	S2	S3	S1	S2	S3
Lumière	81	34	15	100	59	32
Alternance	58	24	15	72	45	7
Obscurité	46	31	12	71	33	12

Nombre moyen de bourgeons/explant régénérant

Conditions	15 jours			30 jours		
	S1	S2	S3	S1	S2	S3
Lumière	8 (a)	4 (a)	1 (a)	11 (a)	6 (a)	3 (a)
Alternance	8 (a)	4 (a)	1 (a)	10 (a)	4 (b)	1 (b)
Obscurité	4 (b)	3 (a)	1 (a)	7 (b)	3 (b)	1 (b)

% d'explants nécrosés

Conditions	15 jours			30 jours		
	S1	S2	S3	S1	S2	S3
Lumière	0	2	16	3	10	22
Alternance	2	5	11	3	9	27
Obscurité	0	0	0	0	3	0

S1= segment proximal; S2= segment médian; S3= segment distal

Intervalle de confiance P= 0,95.

Comparaisons des moyennes: test Newman-Keuls au seuil de 5%

2.2.2. Influence des conditions d'éclairement sur la régénération des bourgeons.

Parallèlement à l'étude de l'influence des milieux utilisés, l'étude des facteurs environnementaux en particulier l'éclairement a été envisagée dans le but de définir les meilleures conditions de régénération de bourgeons *in vitro* à partir de fragments de racines. Pour ce faire 3 conditions ont été testées. Les explants ont été placés à la lumière, à l'obscurité et sous un régime photopériodique de 16 heures. Pour chaque condition expérimentale, on a relevé les pourcentages de régénération, le nombre de bourgeons par explant et les taux d'explants nécrosés. Les résultats figurent dans le tableau n°5.

Les pourcentages de régénération ainsi que le nombre de bourgeons produits par explant et les taux de nécrose varient selon les conditions d'éclairement et l'âge des segments racinaires. La fréquence de l'organogénèse décroît de S₁ à S₃ (tableau n°5).

a. Sur les explants racinaires issus de plantules âgées de 15 jours.

Des bourgeons sont apparus aussi bien sur les fragments placés à la lumière que sur ceux placés à l'obscurité. Les résultats de l'analyse de variance indiquent une influence significative des conditions d'éclairement ($F = 3,29$; $P = 0,04$) et de l'origine des segments de racine ($F = 38,66$; $P = 0,000$) sur la régénération au sens large (c'est-à-dire le pourcentage d'explants régénérant et le nombre de bourgeons/explant régénérant).

La figure 2, indique que la lumière joue un rôle inducteur très important et stimule davantage la régénération des bourgeons. Cet effet diminue considérablement des segments proximaux vers les segments distaux.

Les taux de nécrose, les plus élevés s'observent sur les segments S₃; on ne remarque aucune nécrose à l'obscurité.

b. Sur les explants racinaires issus de plantules âgées de 30 jours.

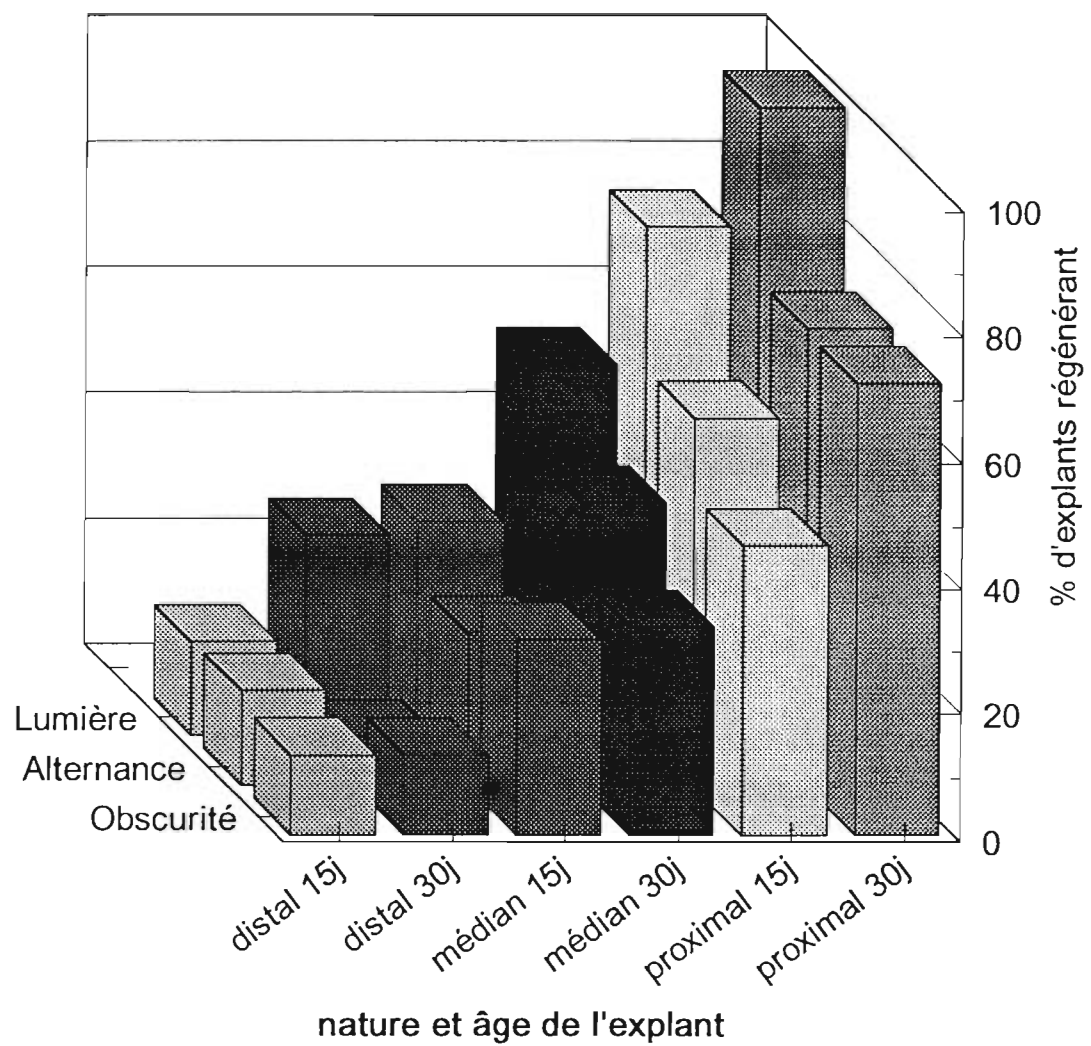


figure n°2: Régénération de bourgeons sur racines d'*Acacia albida*: Effets comparatifs des conditions d'éclairement, de la nature et de l'âge de l'explant

Pour les mêmes conditions environnementales, nous remarquons que les pourcentages de régénération ainsi que le nombre moyen de bourgeons néoformés par explant racinaire sont nettement plus élevés que sur les segments âgés de 15 jours.

L'influence des conditions d'éclairement ($F = 10,89$; $P = 0,000$) ainsi que celle de l'origine des explants ($F = 83,48$; $P = 0,000$) sont très significatives sur la régénération.

Les explants cultivés à la lumière permanente ont une réponse plus rapide et plus intense que celle des explants placés sous régime photopériodique et ceux cultivés à l'obscurité. Ceci est valable tant pour les pourcentages de régénération que pour le nombre moyen de bourgeons par segment de racine ayant régénéré.

L'effet stimulateur de la lumière sur le bourgeonnement est tout à fait comparable à celui observé sur les explants âgés de 15 jours. Il est plus important sur les segments proximaux et l'est moins sur les segments médians et distaux.

Cependant, il est clair que l'âge des explants, avant la mise en culture, est un facteur très déterminant dans l'expression des bourgeons.

3. Obtention de tiges feuillées.

Les bourgeons obtenus à partir des explants racinaires ont été transférés en tubes sur milieu MS dilué de moitié, sans hormones. Le développement des bourgeons en tiges feuillées s'effectue rapidement. Après un mois de culture, on observe un important système racinaire à la base des microboutures (planche 3 photo c). Quelques fois, on peut observer un phénomène de compétition entre les systèmes racinaires et aériens.

Toutefois des tiges feuillées bien développées ont été obtenues.

Ces résultats permettent de présenter un protocole complet qui va de la mise en culture des fragments de racines à l'obtention de plants enracinés.

II. ENRACINEMENT DE L'*ACACIA RADDIANA*

Les résultats de Kparé (1992) montrent que le microbouturage d'*Acacia raddiana* est possible mais que l'aptitude à la micropropagation disparaît peu à peu au fil des subcultures de vitroplants: l'aptitude à l'enracinement qui est de 90 % à la première subculture diminue jusqu'à 2 % à la troisième subculture. Dans une moindre mesure l'aptitude à la production de pousses diminue aussi. Ces résultats sont obtenus pour de nombreuses combinaisons de milieux de culture (éléments minéraux et balances hormonales). Des résultats similaires ont été rapportés sur le Sequoia géant (Monteuuis et Bon, 1985) et l'*Acacia senegal* (Merlin et Doire (C.V.)); cités par Badji, 1991). C'est pourquoi notre démarche a consisté d'abord à rechercher les conditions permettant un développement caulinaire maximal, sans favoriser la rhizogénèse, à partir d'explants primaires, et ensuite seulement, nous avons cherché à obtenir l'enracinement des microboutures de deuxième génération, avant de nous préoccuper de leur développement caulinaire.

Cette démarche déjà adoptée par Monteuuis et Bon (1985) puis Badji (1991) nécessite plusieurs étapes, faisant intervenir des conditions de milieux différentes et donc des repiquages plus nombreux:

- (1) Obtention de tiges à partir du noeud de l'explant primaire.
- (2) Enracinement de l'explant secondaire (=microbouture uninodale) provenant d'une tige produite par l'explant primaire.
- (3) Obtention d'un développement satisfaisant des racines et des tiges.
- (4 et suivantes). Ces deux dernières étapes devront être répétées à chacune des générations suivantes.

L'étape (2) définie ci-dessus, correspond à une phase d'induction de la rhizogénèse et l'étape (3) à une phase de croissance générale tant caulinaire que racinaire.

Dans la présente étude nous avons recherché des milieux permettant un déroulement favorable des étapes (1), (2) et (3) définies ci-dessus en jouant sur leur composition minérale et hormonale.

Tous les travaux ont été effectués avec un matériel végétal, à très grande réactivité, issu de plantules axéniques d'*Acacia raddiana*.

1. Microboutures issues de plantules (= microboutures de 1^{ère} subculture)

Comme suite aux résultats obtenus par Kparé (1992) qui ont montré que le milieu minéral M.S. est plus favorable au développement des microboutures de première subculture d'*Acacia raddiana*, nous nous sommes proposés de reprendre ce milieu pour multiplier notre matériel végétal.

1.1 Action des substances de croissance

Les balances hormonales utilisées par optimiser le taux de multiplication des explants primaires dans le milieu M.S., sont celles qui nous ont été présentées, comme plus favorables pour le développement des microboutures de cet âge (Kparé, 1992).

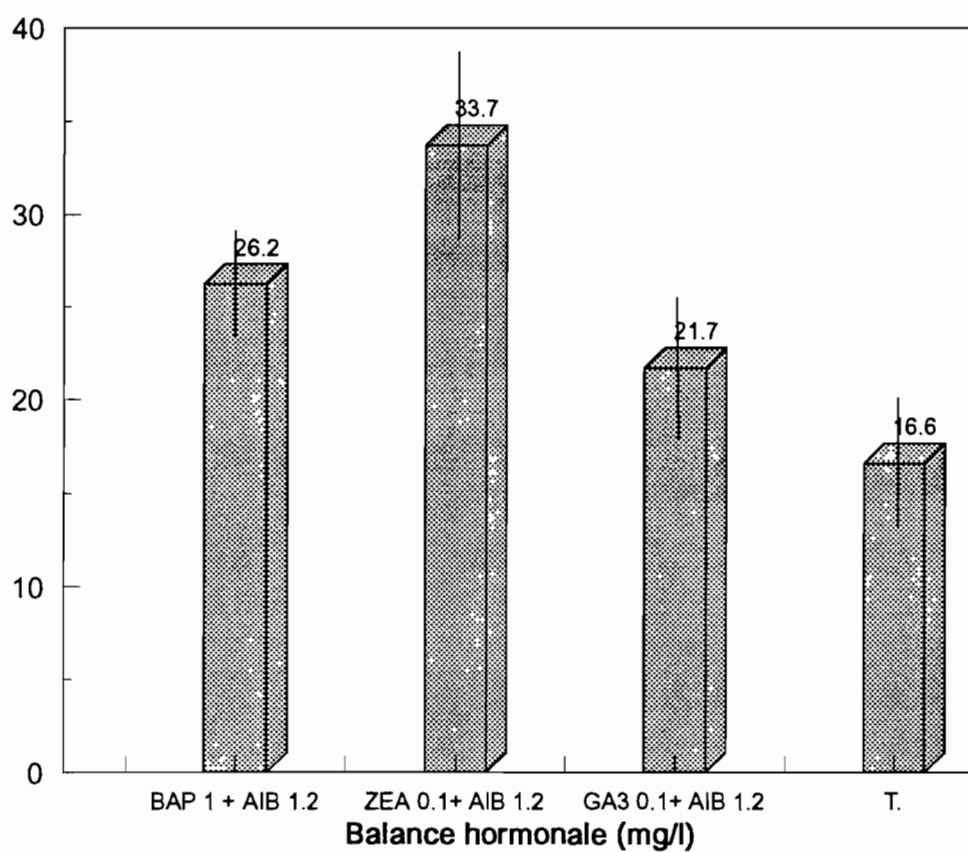
Dans cette partie, nous examinerons donc les effets de deux cytokinines et d'une gibbérelline employée en mélange avec une auxine sur le développement des microboutures de première subculture. Ensuite, nous envisagerons l'étude des auxines utilisées seules ou en combinaison avec une cytokinine sur l'enracinement des microboutures de deuxième subculture

1.2. Effet des cytokinines et d'une Gibbérelline combinées à une auxine

Les milieux dits de "multiplication" contiennent généralement des cytokinines. Ces phytohormones sont censées stimuler le bourgeonnement et auraient d'autre part un effet antisénescent mis à profit pour favoriser la réapparition de formes juvéniles (Fouret et al., 1984).

La BAP est traditionnellement préférée aux autres cytokinines. Nous avons tenu néanmoins à comparer cette substance synthétique à la Zéatine, cytokinine naturelle et à l'acide gibbérellique (GA₃). Ces phytohormones ont été utilisées en association avec une dose unique d'AIB (auxine synthétique).

Accroissement, du 2ème au 6ème noeud (mm)



barre = écart type

figure n°3: Développement des vitroplants de première subculture d'*Acacia raddiana* sur le milieu M.S.: Effet de la balance hormonale exogène.

Les explants cultivés dans le milieu MS enrichi de BAP, Zéatine et GA₃ combinés à l'AIB se développent. Le débourrement a été plus ou moins rapide et les tiges néoformées s'allongent et atteignent quelquefois au bout de 60 jours une hauteur de 10 à 12 cm, avec en moyenne 6 à 8 noeuds axillés le plus souvent par des feuilles bipennées bien vertes.

Une certaine spécificité de réaction des microboutures a pu être constatée en fonction du traitement hormonal appliqué.

Nous avons pu corréler cette réaction des vitroplants par des mesures de la longueur des entre-noeuds de la région comprise entre le 2^{ème} et 6^{ème} entre-noeud.

Le traitement statistique des données, révèle un effet très significatif de la balance hormonale, sur l'allongement des entre-noeuds de la région ainsi délimitée ($F = 20,55$; $P = 0,000$). Les résultats obtenus, présentés sur la figure 3, indiquent clairement l'action élongatrice plus importante, sur les entre-noeuds, de la Zéatine. L'effet des cytokinines utilisées est globalement plus important que celui du GA₃. La supériorité de la Zéatine par rapport à la BAP, déjà discernable dans les milieux de culture, résulte de la taille plus courte des entre-noeuds produits sur milieu BAP.

Le tableau n°6, obtenu à partir du traitement statistique différentiel de l'action des différentes balances hormonales utilisées, montre que l'action élongatrice des cytokinines est à peu près constante sur l'allongement des entre-noeuds de la région délimitée. L'effet du GA₃ est tout à fait identique à celui observé sur les témoins. On peut constater que la stimulation de l'élongation décroît graduellement du 2^{ème} vers le 6^{ème} entre-noeud.

La multiplication des microboutures de première subculture d'*Acacia raddiana*, requiert donc l'utilisation d'une balance hormonale exogène riche en cytokinine.

Tableau n°6:

Mesure de l'allongement (en mm) des entrenoeuds, après 60 jours de culture, en fonction de la balance hormonale du milieu MS et du rang de l'entrenoeud (effectif=24 expl/traitement).

Allongement de l'explant en mm

Balance hormonale (mg/l)	Rang de l'entrenoeud				
	2ème	3ème	4ème	5ème	6ème
BAP1+AIB1,2	5 (b)	5 (b)	5 (b)	6 (a)	5 (b)
Zéa0,1+AIB1,2	7 (a)	7 (a)	6 (a)	7 (a)	6 (a)
GA0,1+AIB1,2	6 (a)	5 (b)	5 (b)	4 (b)	2 (c)
Témoin (0)	5 (b)	5 (b)	3 (c)	2 (c)	1 (c)
P(test F)	P=0,01	P=0,004	P=0,000	P=0,000	P=0,000

BAP1+AIB1,2 = 1mg/l BAP + 1,2mg/l AIB

Zéa0,1+AIB1,2 = 0,1mg/l Zéa + 1,2mg/l AIB

GA0,1+AIB1,2 = 0,1mg/l GA3 + 1,2mg/l AIB

Intervalle de confiance P= 0,95

Comparaisons de moyennes: test de Newman-Keuls au seuil de 5%.

2. Microboutures de deuxième subculture.

Dans l'ensemble, l'incorporation des régulateurs de croissance et en particulier des cytokinines donnent des résultats sensiblement supérieurs aux traitements sans hormones. Nous avons pu définir quelques conditions de production de 4 à 6 explants secondaires bouturables. Il restait à vérifier quel serait le comportement des microboutures de deuxième génération lorsqu'elles sont mises en culture.

Les explants d'*Acacia raddiana* de cette nature perdent, déjà à partir de cette génération, une bonne partie de leurs potentialités organogénétiques lorsqu'on repiquait directement dans des conditions de cultures analogues à celles établies, pour la multiplication des microboutures de première génération.

En 1991, Badji observe un comportement similaire sur les microboutures de deuxième génération d'*Acacia senegal* et se demande si l'absence de racines n'était pas la cause essentielle de non réussite de leur multiplication. C'est pourquoi il nous a paru intéressant de vérifier si l'utilisation d'auxines à ce stade, connues pour leur pouvoir rhizogène, n'améliorerait pas le comportement de ces microboutures.

2.1. Action des auxines utilisées seules ou en association avec une cytokinine.

Les effets d'une auxine exogène sur l'enracinement dépendent de la nature du composé utilisé, de la dose employée et du temps de traitement (Monteuuis et Bon, 1985). Des tentatives répétées en vue d'obtenir une bonne rhizogénèse à partir de microboutures de deuxième subculture d'*Acacia raddiana* sur milieu de multiplication M.S. dilué de moitié avec ou sans charbon actif ont été vaines au bout de 60 jours d'incubation (Kparé, 1992). Des doses de 0; 0,01; 0,1 mg/l d'ANA ou d'AIB, associées éventuellement à 0,1 ; 1 ou 2 mg/l de BAP de Kin ou de Zéa, n'ont pas permis d'obtenir un bon enracinement des explants. En effet, après 2 mois de culture, les manifestations callogènes, surtout dans les milieux sans charbon actif, prennent une ampleur telle qu'elles inhibent l'apparition de racines et provoquent

Tableau n°7:

Vitrification, après 15 jours de culture, en fonction de la nature du milieu et de l'explant (effectif 24 explants/traitement).

Nombre d'explants vitrifiés

Milieux	Apex	Noeuds
JRD/2 ANA	19	13
WPM/2 ANA	21	16
JRD/2 AIB	24	24
WPM/2 AIB	24	24

à terme la dégénérescence des explants.

Ces observations nous ont incité à adopter deux stratégies pour provoquer la rhizogénèse. Chacune de ces stratégies comporte deux étapes. La première étape est appelée "phase d'induction" car les microboutures sont déposées pendant un temps déterminé dans des solutions minérales enrichies de fortes doses de régulateurs de croissance.

La deuxième est nommée "phase d'expression racinaire" ou "phase d'élongation racinaire" car les explants sont repiqués directement dans les mêmes milieux, cette fois dépourvus de phytohormones.

2.1.1. Induction rhizogène courte.

La base des microboutures est trempée pendant 24 heures dans une solution titrant 100 mg/l d'ANA ou d'AIB, puis les explants sont repiqués sur milieux d'expression JRD/2 et WPM/2. Les résultats obtenus sont exposés dans le tableau n°7.

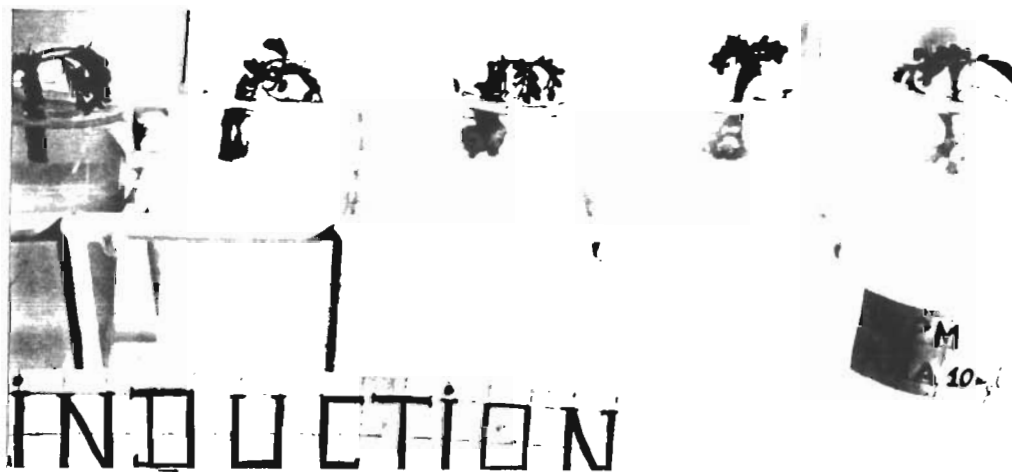
L'analyse du tableau n°7 révèle:

- à doses élevées, les boutures de l'*Acacia raddiana* sont plus sensibles à l'AIB qui apparait comme une auxine plus forte que l'ANA;
- les fortes doses d'ANA sont mieux tolérées par les noeuds que les apex.
- les solutions minérales employées présentent une influence presque identique sur le devenir des microboutures.

Dans nos conditions expérimentales, outre la vitrification des explants, nous avons remarqué un noircissement de la base des vitroplants. Aucune racine n'est apparue au bout de 30 jours de culture.

Ces résultats n'étant pas positifs, une deuxième technique a été utilisée comme méthode alternative.

Planche 4: Enracinement des vitroplants de deuxième subculture
d'*Acacia raddiana*



a

G: x 1

photo a: phase d'induction racinaire (induction 10 jours); de petits cals rhizogènes sur lesquels apparaissent des ébauches de racines sont visibles à la base des microboutures.

2.1.2. Induction rhizogène prolongée.

La phase d'induction rhizogène a été effectuée sur milieu de culture gélosé. Les microboutures sont déposées dans les milieux WPM, WPM/2, JRD et JRD/2 additionnés de AIB, ANA, AIB + Kin et ANA + Kin. Les auxines ont d'abord été utilisées seules à 10 et 20 mg/l, puis elles ont été combinées à la Kinétine à 0,01 mg/l.

Après un séjour de 10 ou 20 jours dans le milieu d'induction, les explants ont été transférés dans les milieux d'élongation racinaire, de même composition minérale que les précédents, mais cette fois-ci sans hormones.

Entre le 3^{ème} et 4^{ème} jour de l'expression rhizogène, les racines sont visibles à l'oeil nu dans certains milieux. Elles apparaissent au niveau de cals cicatriciels basaux et leur extrémité forme un manchon noir après 10 jours de culture. Dans le milieu d'expression, le système racinaire s'allonge et se multiplie en même temps que les bourgeons débourent.

L'influence de la durée d'induction, du milieu minéral, des hormones (nature et dose) et de la nature de l'explant (apex ou noeuds), sur l'organogénèse a été analysée.

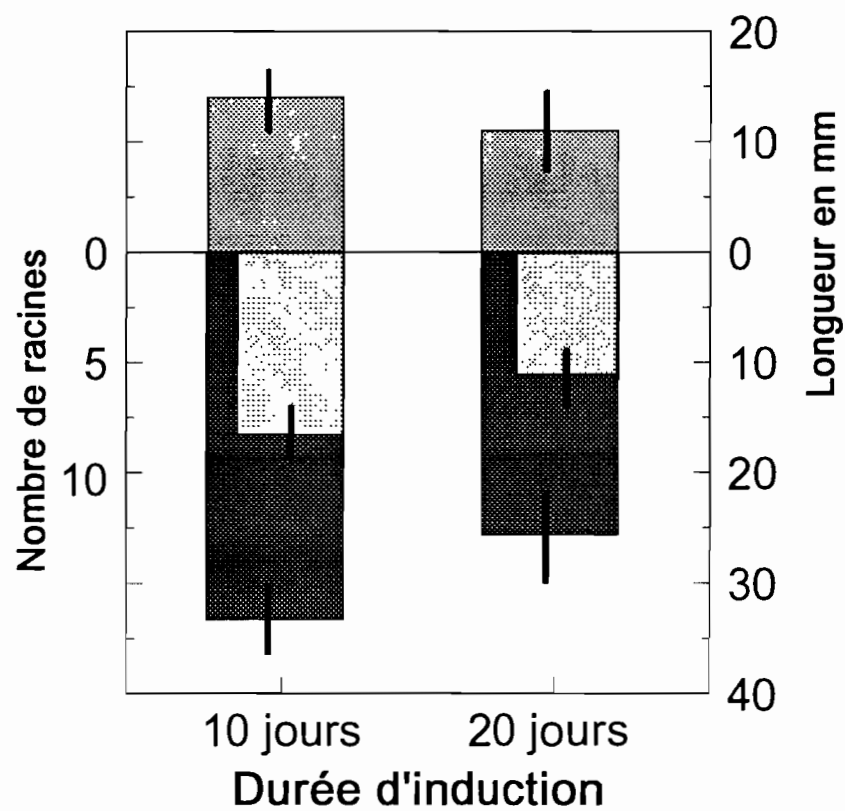
L'étude a été entièrement réalisée avec des vitroplants de deuxième subculture d'*Acacia raddiana*.

a. Influence des facteurs de l'induction.

Galzy (1972) signale, pour les plants issus du développement des apex de *Vitis rupestris*, que le délais de débourrement des bourgeons, sur un milieu sans hormone, est directement proportionnel au temps passé sur le milieu d'induction contenant de l'ANA.

Sur l'*Acacia raddiana*, deux périodes d'induction ont été éprouvées en vue d'optimiser le développement des microboutures, c'est-à-dire la qualité (longueur et diamètre), la production de racines ainsi que la croissance des tiges néoformées.

Après une période d'induction de 10 ou 20 jours, l'expression de la rhizogénèse et de la caulogénèse a été analysée, 30 jours après, dans les milieux d'élongation.



barre =intervalle de confiance à 95%

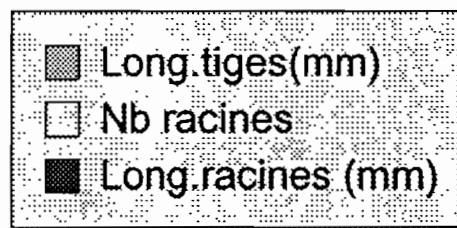


figure n°4: Développement de vitroplants de deuxième subculture d'*Acacia raddiana* après induction plus 30 j. d'expression: Effet de la durée d'induction

Les données de l'analyse de variance, révèlent un effet significatif de la durée d'induction ($F=4,16$; $P=0,04$) ainsi que de la balance hormonale utilisée ($F=12,43$; $P=0,000$) sur la croissance des vitroplants.

Les résultats, présentés sur la figure 4, montrent qu'une période d'induction de 10 jours permet une expression nettement meilleure, des microboutures d'*Acacia raddiana*, qu'une induction de 20 jours. En effet le nombre de racines produites par microbouture ainsi que leur longueur et celle des tiges sont inversement proportionnels à l'augmentation du temps de séjour des explants dans les milieux inducteurs.

Ces résultats, nous ont suggéré de poursuivre l'étude du développement des vitroplants sur le seul traitement de 10 jours d'induction, les effectifs étant suffisants ($N=366$).

i. Effet de la balance hormonale sur le développement des microboutures.

L'influence, sur la croissance des microboutures, de la balance hormonale utilisée dans les milieux d'induction racinaire a été analysée. Les résultats figurent dans le tableau n°8.

Le tableau n°8 montre que le pourcentage de plants enracinés ainsi que le nombre de racines néoformées par microbouture et leur aspect varient selon les concentrations en ANA, AIB et Kin utilisées.

ii. Effet de l'ANA et l'AIB utilisés seuls dans les milieux d'induction.

Afin de comparer l'influence des auxines sur la croissance des microboutures, les explants ont été cultivés dans des milieux inducteurs contenant des concentrations de 10 et 20 mg/l d'ANA ou d'AIB.

Les résultats, présentés (tableau n°8), montrent que l'action stimulatrice sur la rhizogénèse, de l'AIB est très nettement supérieure à celle de l'ANA. La comparaison des coefficients de multiplication racinaire (C.M.R) ($=\%$ de plants enracinés x nombre de racines néoformées/microbouture) (Duhoux et Davis, 1985) met en

Tableau n°8

Influence des hormones des milieux inducteurs sur le développement des racines des vitroplants après 30 jours de culture sur milieux d'expression (sans hormones)

Induction = 10 jours

Balance hormonale (mg/l)	Effectifs enracinés*	% enracinés	Nbre. de rac./expl	C.M.R	Diamètre des racines		
					R.F.	R.M.	G.R.
ANA10	34/96	35	4,0 (a)	1,4	–	+	++
ANA20	29/94	31	3,7 (a)	1,1	–	+	++
ANA10/Kin0,	55/96	57	4,4 (a)	2,5	+	+	++
AIB10	77/96	80	14,1 (b)	11,3	–	++	+
AIB20	59/93	63	10,4 (b)	6,6	+	++	+
AIB10/Kin0,0	62/91	68	14,8 (b)	10,1	+	++	+

P(test F)

N = 366

P= 0,000

*: nbre de racines > 0

Coefficient de multiplication racinaire: C.M.R. = % d'explants enracinés x nombre de racines néoformées

R.F., R.M. et G.R. respectivement racines fines, racines moyennes et grosses

racines (le diamètre des racines est estimé à l'oeil nu):

+ : présence; ++ : plus fréquentes; – : absence

Intervalle de confiance P= 0,95; test Newman-Keuls au seuil de 5%

évidence, que toutes doses confondues, l'AIB est plus favorable à l'enracinement de l'*Acacia raddiana* que l'ANA. Le pourcentage maximum de plants enracinés (80%) a été obtenu avec la concentration de 10 mg/l d'AIB. Nous remarquons que toute augmentation de la dose d'auxines entraîne une réduction du % de l'enracinement et du nombre de racines néoformées par microbouture.

iii. Effet de l'ANA et de l'AIB combinés à la kinétine dans les milieux d'induction.

Des microboutures ont été cultivées dans les milieux inducteurs en présence d'une combinaison auxine-cytokinine comprenant de la kinétine (Kin) à 0,01 mg/l combinée avec 10 mg/l soit d'ANA ou d'AIB.

Le tableau n°8, révèle que l'adjonction de Kin dans le milieu d'induction augmente le % d'enracinement en présence d'ANA (+20%), ce qui n'est pas le cas en présence d'AIB (-12%).

Une activité rhizogène très importante se manifeste souvent à la base de certaines microboutures avec un nombre de racines pouvant atteindre 40 à 50. Cette hétérogénéité dans la réponse pourrait correspondre à la variabilité génotypique des explants.

Dans nos conditions expérimentales, le système racinaire de l'*Acacia raddiana in vitro* présente un aspect hétérogène. Le diamètre des racines, apprécié à l'oeil nu est très variable. Selon les milieux trois catégories de racines ont pu être répertoriées:

- les racines fines (R.F.): elles n'ont été observées que dans quelques milieux (cf. tableau n°8). Leur longueur dépasse rarement 10 mm. Ces racines ne subsistent guère longtemps dans le milieu de culture et dégénèrent assez vite.
- Les grosses racines (G.R.): elles sont plus fréquentes que les précédentes et sont observées dans presque tous les milieux de culture. Ce sont les racines les plus longues et elles forment un système pivotant profondément enfoncé dans la gélose.
- les racines moyennes (R.M.): leur diamètre est intermédiaire entre les racines fines et les grosses racines. Ces racines sont abondantes lorsque le système racinaire est dense et elles sont moins longues que les grosses racines.

Dans la plupart des cas, ces racines forment un système mixte à la

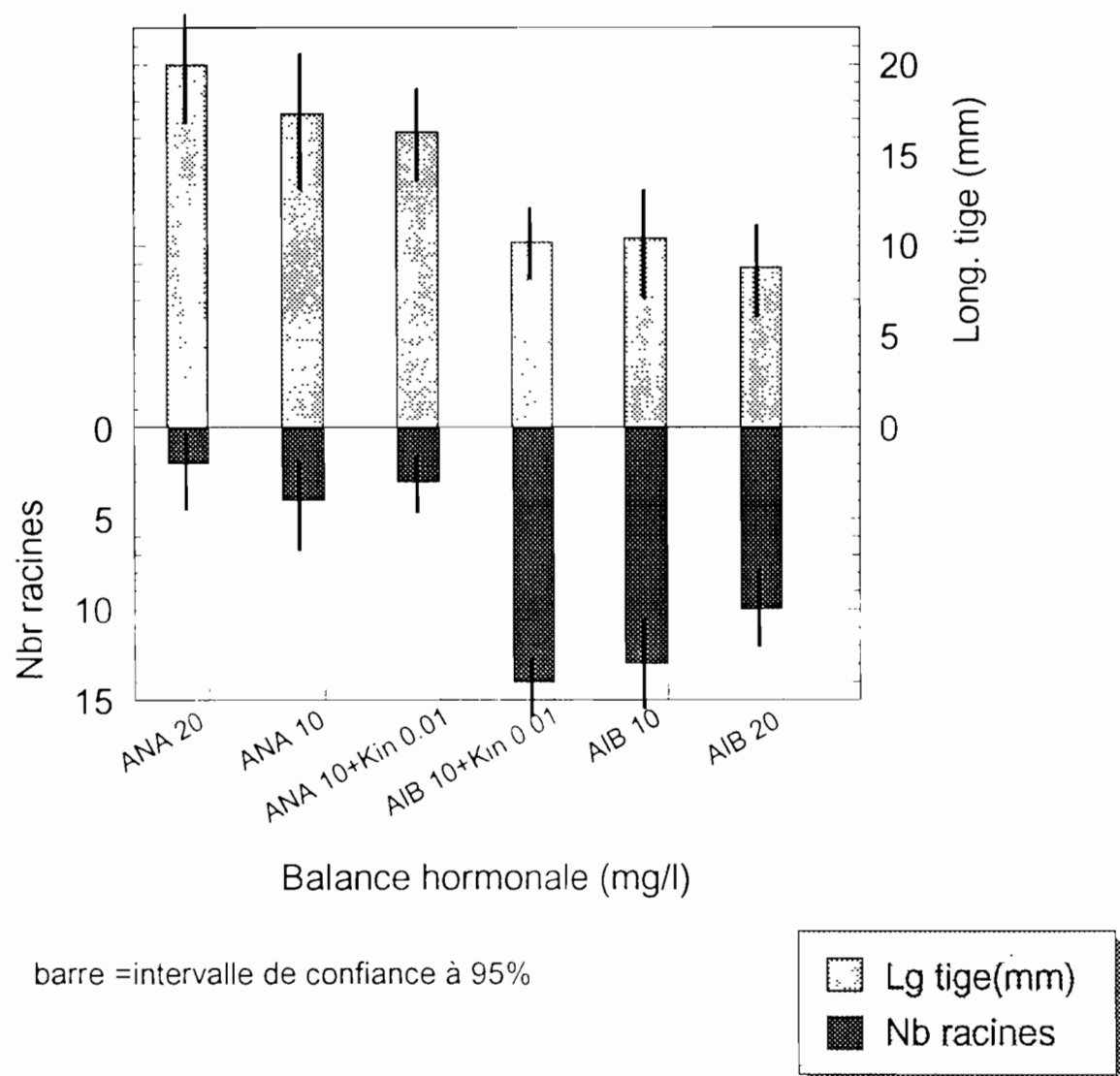


figure n°5: Développement de vitroplants de deuxième subculture d'*Acacia raddiana* après 10 j. d'induction plus 30 j. d'expression: Effet de la balance hormonale exogène

base des microboutures. Ce système racinaire hétérogène pourrait s'expliquer par les phénomènes de compétition qui s'établissent à la base des microboutures au moment de l'émergence des racines. En effet nous pouvons remarquer que le diamètre des racines est proportionnel au nombre de racines néoformées à la base des microboutures; moins elles sont nombreuses, plus les racines sont grosses et longues.

iiii. Effet de la balance hormonale sur le développement caulogène des microboutures.

Parallèlement à l'étude de l'influence de la balance hormonale sur l'enracinement des microboutures d'*Acacia raddiana*, l'effet des phytohormones sur la caulogénèse a été analysé.

Les résultats obtenus, présentés sur la figure 5, montrent que le développement caulogène des microboutures est plus important après une induction dans un milieu contenant de l'ANA que dans un milieu contenant de l'AIB. L'ANA à 20 mg/l favorise la meilleure élongation des tiges néoformées. En revanche, l'addition de Kinétine dans les milieux d'induction avec auxines, n'est pas favorable pour le développement caulogène des microboutures.

Ces résultats peuvent être corrélés avec les phénomènes de compétition, annoncés précédemment et qui se déroulent au moment de la rhizogénèse. En effet nous pouvons remarquer que le développement caulogène est inversement proportionnel à la production de racines. Les balances hormonales favorisant la rhizogénèse, sont inhibitrices de la caulogénèse.

L'expression de la rhizogénèse et celle de la caulogénèse ont été également corrélées avec les manifestations callogènes (cf. § 2-4) qui semblent jouer un rôle important sur l'organogénèse des microboutures.

b. Influence du milieu minéral.

La composition et la concentration ou salinité d'un équilibre minéral donné, peuvent influencer l'organogénèse *in vitro* de certaines espèces végétales.

Tableau n°9:

Influence du milieu minéral sur la rhizogénèse caulogénèse, 30 jours après repiquage dans les milieux d'expression racinaire (sans phytohormone)

Induction 10 jours et 20 jours

Milieux	Effectifs	% Plants enracinés	Nbr.moy.de rac./expl	Long. moy des rac/expl mm	Long. moy des tiges/expl mm	Nbr.moy de nds/expl
WPM	175	83	11 (a)	36,4 (a)	13,8 (a)	3 (a)
WPM/2	114	38	6 (b)	22,7 (b)	9,4 (b)	2 (b)
JRD	143	48	5 (b)	32,5 (a)	14,5 (a)	3 (a)
JRD/2	126	53	4 (b)	27,0 (b)	10,1 (b)	2 (b)
P(test F)	N = 558		P = 0,000	P = 0,000	P = 0,000	P = 0,000

Intervalle de confiance P= 0,95; test de Newman-Keuls au seuil de 5%

Il est généralement reconnu, en effet, que les solutions trop riches inhibent la rhizogénèse et entraînent des dégénérescences de l'explant. Aussi, la plupart des auteurs utilisent-ils une solution minérale diluée.

Dans le but de rechercher, après l'induction, un milieu minéral à même d'assurer à la fois l'enracinement et l'élongation satisfaisants des pousses, nous avons voulu comparer l'influence des équilibres minéraux WPM et JRD ainsi que celle de leurs homologues dilués de moitié, sur le développement des microboutures de 2^{ème} subculture d'*Acacia raddiana*.

La multiplication des microboutures s'est déroulée assez rapidement dans le milieu d'expression. En effet deux semaines plus tard, les bourgeons se sont allongés et ont donné naissance à une petite tige feuillée. A la base des explants le système racinaire s'est multiplié et allongé. A un mois de culture, l'influence du milieu d'expression sur l'organogénèse a donné les résultats mentionnés dans le tableau n°9.

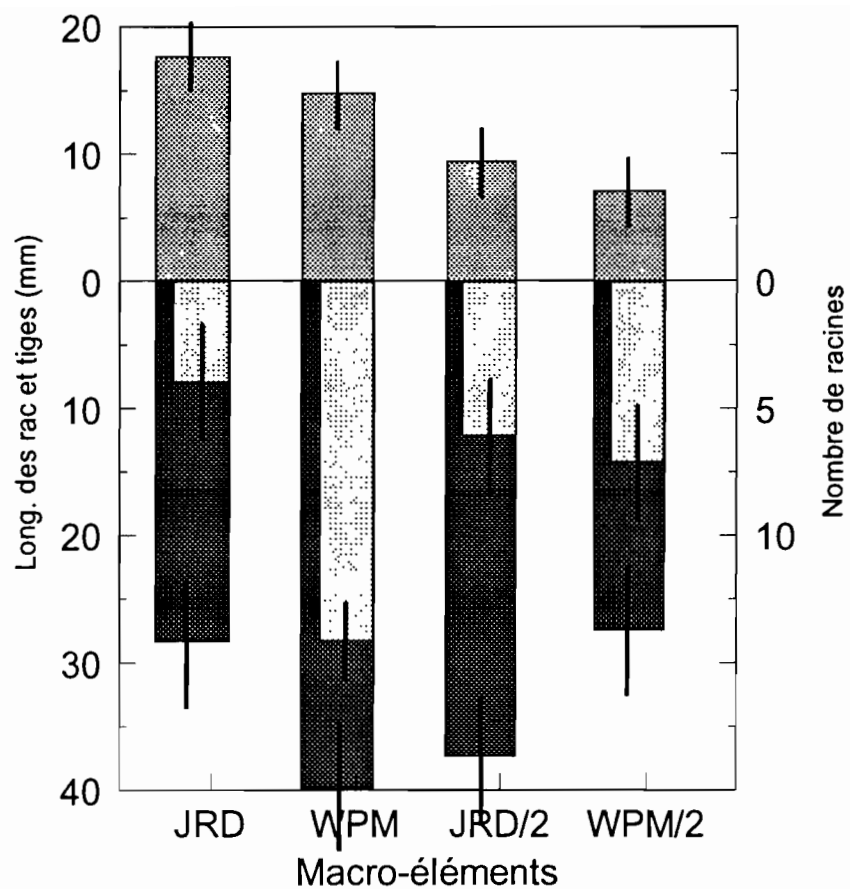
Le pourcentage de plants enracinés ainsi que l'expression de la rhizogénèse et celle de la caulogénèse varient selon les milieux de culture utilisés (tableau n°9).

i. Influence sur la rhizogénèse.

L'expression des racines a été observée toutes les semaines pendant un mois dans les milieux WPM, WPM/2, JRD et JRD/2 sans phytohormone.

L'analyse de variance révèle une influence très significative du milieu d'expression sur la néoformation ($F=12,7$; $P=0,000$) et l'allongement des racines ($F = 6,1$; $P = 0,000$) en fonction des milieux utilisés.

Les résultats, présentés (tableau n°9), révèlent que le milieu minéral WPM est plus favorable à l'enracinement des microboutures de l'*Acacia raddiana* que les milieux WPM/2, JRD et JRD/2. Ce milieu permet d'obtenir le pourcentage de plants enracinés, le plus élevé (83%).



barre =intervalle de confiance à 95%

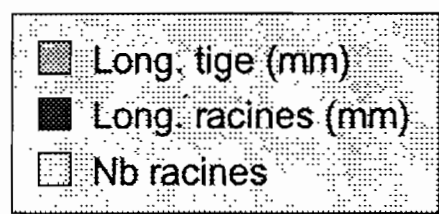


figure n°6: Développement de vitroplants de deuxième subculture d'*Acacia raddiana* après 10 j. d'induction plus 30 j. d'expression: Effet des macro-éléments.

La figure 6 montre que la solution minérale WPM fournit non seulement le plus grand nombre de racines néoformées par microbouture mais également les plus longues racines. La dilution du milieu WPM (milieu WPM/2) ne paraît pas favorable à l'enracinement des vitroplants.

La supériorité du milieu WPM par rapport au milieu JRD, déjà discernable au cours des différentes observations, pourrait résulter de l'action de certains constituants du milieu de culture, présents en quantité optimale et qui favoriseraient l'enracinement.

En effet, il ressort du tableau n°10, qui permet d'établir une comparaison entre la composition ionique des milieux WPM et JRD, que ces deux solutions minérales ont la même force ionique (ou pression osmotique) et la même proportion de NH_4^+/N total. En revanche la quantité totale d'azote du milieu JRD est 2 fois supérieure à celle du milieu WPM. Le déficit d'azote dans le milieu WPM pourrait expliquer les différences des résultats obtenus sur l'enracinement des microboutures.

ii. Influence sur la croissance des racines.

Après la fin de l'induction racinaire (10 ou 20 jours), le développement des racines (nombre et longueur des racines) a été mesuré chaque semaine pendant un mois (à 7 jours, 14, 21 et 28 jours).

La figure 7 (a et b) montre que la dynamique de l'enracinement de l'*Acacia raddiana* dépend de la balance hormonale (nature, dose et combinaison) utilisée dans le milieu d'induction racinaire.

Les deux auxines testées ont chacune une action spécifique très marquée sur la rhizogénèse de cette espèce.

L'ANA favorise la production de grosses racines peu nombreuses (3 à 4 racines par microbouture) mais de type "pivot" et profondément enfoncées dans le milieu gélosé. En effet cette auxine favorise une croissance très rapide des racines dès la première semaine d'expression (planche 5, photos b, c, d): 3cm en moyenne contre 1,5cm avec l'AIB. L'allongement moyen des racines atteint 5cm au bout d'un mois de culture.

Tableau n°10:

Comparaison des compositions ioniques des macro-éléments en meq/l

Lloyd et McCown (WPM)(1981)

NO3-	PO4---	SO4--	Cl-	K+	Ca++	Mg++	NH4+	H+	Total N	NH4+/N	Somme I+	P.osmotique mM
9,7	3,74	14,36	1,3	12,6	6,01	3	4,99	2,49	14,69	0,33	29,09	44,01

Jordan et al., (1983)

19,7	1,87	1,5	2,99	10,09	2,99	1,5	10,305	1,245	30,005	0,34	26,06	47,875
------	------	-----	------	-------	------	-----	--------	-------	--------	------	-------	--------

WPM/Jordan

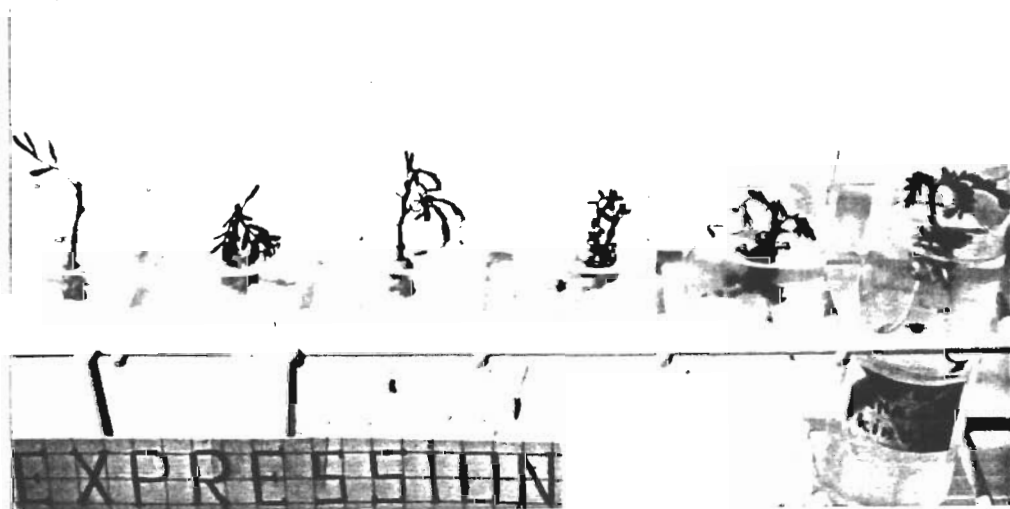
0,5	2	10	0,5	1	2	2	0,5	2	0,5	1	1	1
-----	---	----	-----	---	---	---	-----	---	-----	---	---	---

Planche 5: Enracinement des vitroplants de deuxième subculture d'*Acacia raddiana*: Effet de l'ANA sur l'expression des racines.



b

G: x 0,5



c

G: x 0,7



d

G: x 0,7

photos b, c et d: phase d'expression (ou d'élongation) racinaire (lecture à une semaine); observez l'action spécifique de l'ANA sur l'enracinement des microboutures: on note la présence de racines peu nombreuses, grosses et longues.

En revanche l'AIB favorise la production de touffes denses de racines plus fines et peu allongées; seulement 3,5cm après un mois de culture (planche 6, photos e et f). Cette tendance est très nette dès la première semaine d'expression avec en moyenne 7 racines par microbouture contre 4 avec l'ANA.

Après un mois de culture, le nombre de racines est de 14 à 16 pour les vitroplants induits en présence d'AIB. Le nombre maximum de racines (4 racines) des plants induits en présence d'ANA est atteint dès la première semaine d'expression.

L'adjonction de Kin dans le milieu d'induction a une action régulatrice du développement des racines pendant la durée de l'expérience.

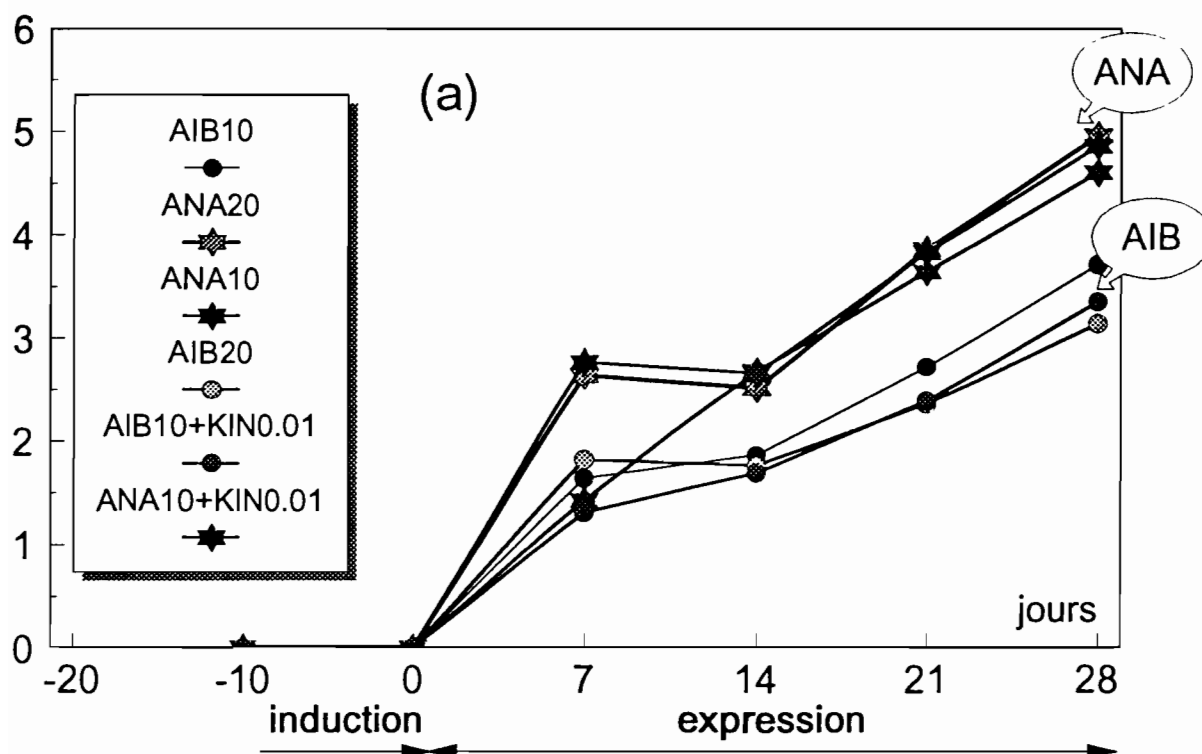
iii. Influence sur la caulogénèse.

A quatre semaines de culture, les tiges néoformées mesurent environ 9 à 20 mm et possèdent chacune 2 à 3 bourgeons axillaires. Le développement d'une seule tige par microbouture a été observé. Le traitement statistique des données, a révélé une influence significative de la durée d'induction racinaire sur l'élongation des tiges ($F=3,8$; $P=0,01$)

En effet, les résultats présentés sur la figure 9, révèlent que l'expression caulogène des microboutures, dans les milieux WPM et JRD, est plus importante à 10 jours qu'à 20 jours d'induction, que dans les milieux WPM/2 et JRD/2. C'est pourquoi, l'étude de l'influence du milieu minéral sur l'élongation des tiges, n'a seulement été envisagée que pour le traitement de 10 jours d'induction.

Le tableau n° 9 montre que la croissance des tiges varie selon la concentration des éléments minéraux testés. Les tiges des microboutures cultivées dans les milieux entiers JRD et WPM, s'allongent plus vite et fournissent non seulement les tiges les plus longues, mesurant respectivement 14,5 et 13,4 mm, mais également le plus grand nombre de noeuds par tige néoformée. La dilution de moitié de ces équilibres minéraux (milieux WPM/2 et JRD/2) n'est pas favorable à l'élongation des tiges.

Longueur de racines (cm)



Nombre de racines

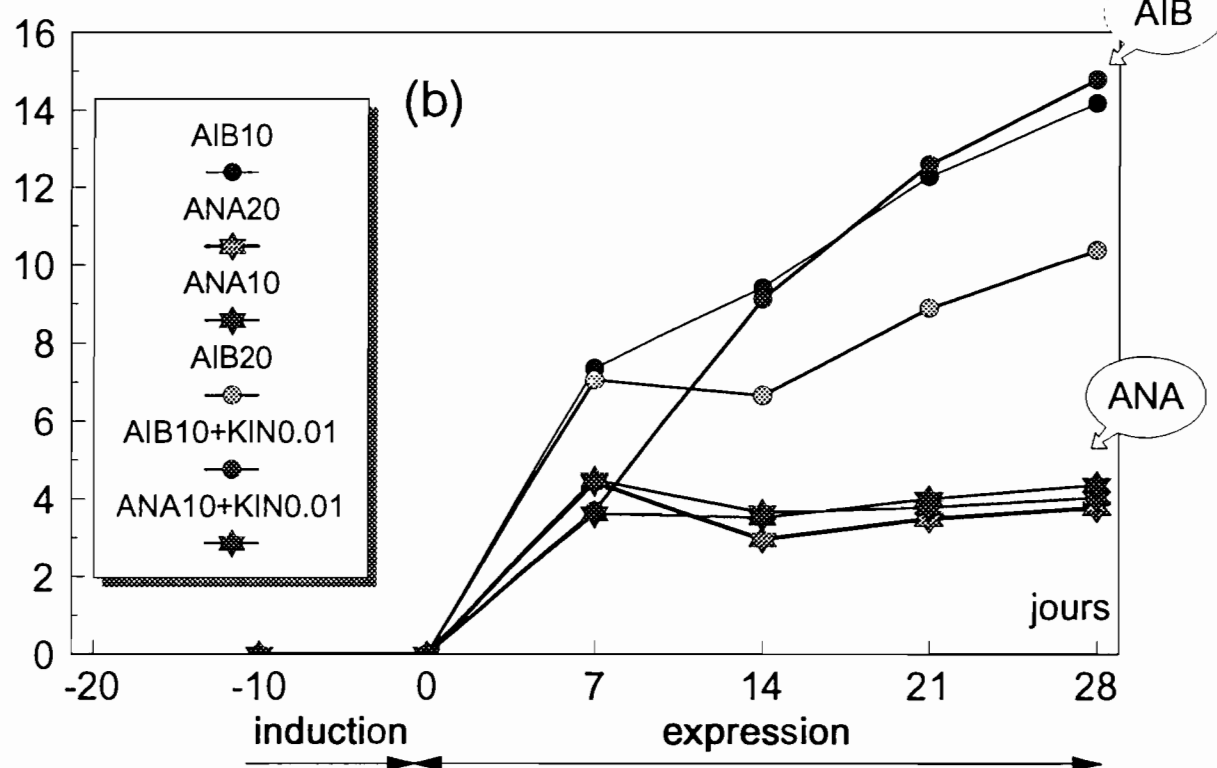


figure n°7: Dynamique de l'enracinement des microboutures de deuxième subculture d'*Acacia raddiana*: Effet de 6 milieux d'induction pendant 10 j. (vitroplants enracinés)

Planche 6: Enracinement des vitroplants de deuxième subculture d'*Acacia raddiana*: Effet de l'AIB sur l'expression des racines.

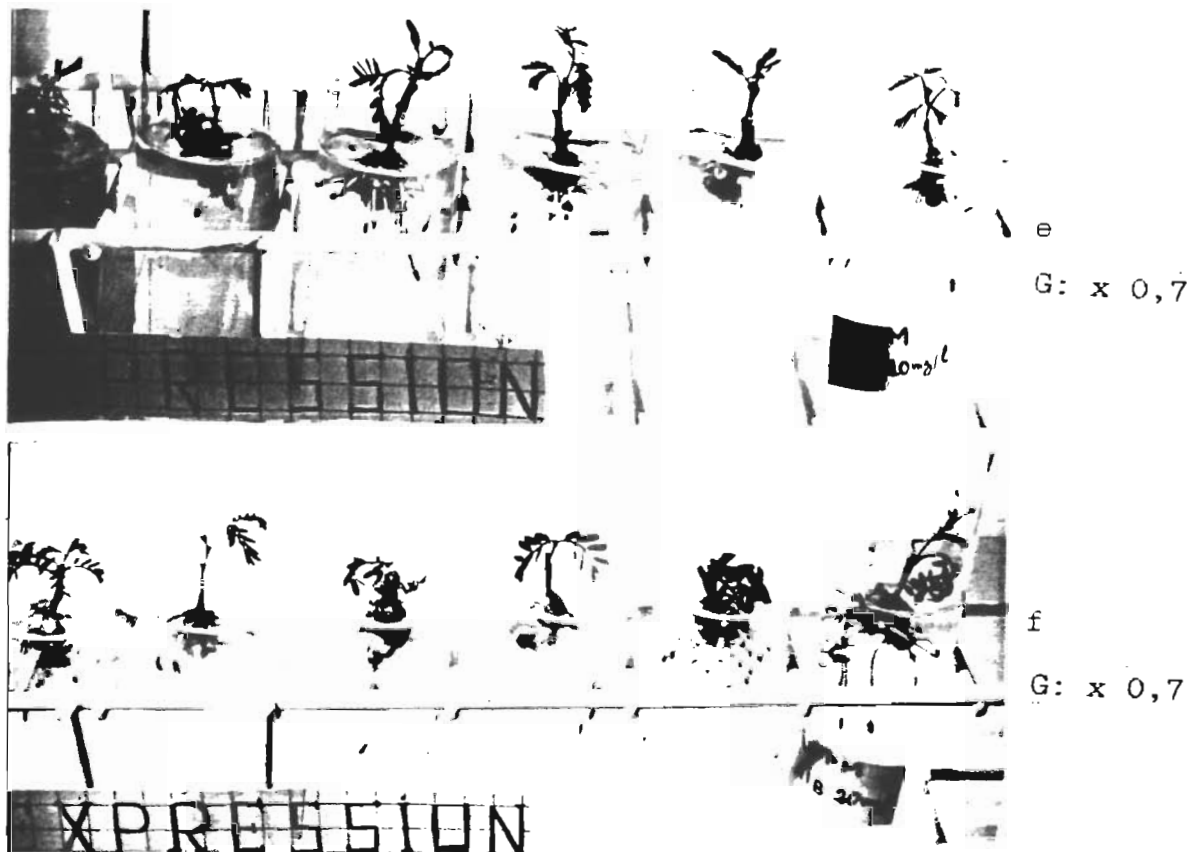


photo e et f: phase d'expression racinaire (une semaine d'expression) après induction dans un milieu contenant de l'AIB. Remarquez la présence de touffes de racines. On peut quelques fois en dénombrer 40 ou 50 par microbouture.

En ce qui concerne l'effet de l'origine des explants, la reprise de croissance des apex, dans les milieux d'expression, a été plus rapide que celle des noeuds. Ces observations ont été confirmées par les résultats de l'analyse de variance, qui révèlent une interaction significative sur l'élongation des tiges, entre la nature de l'explant de départ et les solutions minérales utilisées ($F=3,02$; $P=0,02$).

En effet, les résultats présentés sur la figure 8, montrent que la croissance des tiges issues d'apex est plus importante dans les milieux JRD et WPM, que celle des tiges issues de noeuds. Il n'y a pas de différence réellement significatives entre les milieux WPM, WPM/2, JRD et JRD/2 sur l'élongation des tiges issus de noeuds, d'une part, ni même entre JRD/2 et WPM/2 sur la croissance des tiges issues d'apex et de noeuds, d'autre part.

Cette différence de réactivité entre apex et noeuds sur milieux non dilués, pourrait être le fait de la dominance apicale qui serait probablement très forte chez les jeunes plants d'*Acacia raddiana*. Elle maintiendrait les bourgeons axillaires dans un état latent, d'où le retard de croissance constaté, par rapport aux bourgeons apicaux en perpétuelle activité.

c. Influence de la callogénèse sur la rhizogénèse et la caulogénèse.

L'organogénèse *in vitro* et en particulier la rhizogénèse nécessite chez beaucoup d'espèces végétales, surtout ligneuses, l'utilisation d'un milieu inducteur contenant une forte dose d'auxine. Mais avec l'induction, il se forme, le plus souvent, à la base des microboutures, un cal basal (ou cal rhizogène) à partir duquel émergent des ébauches racinaires. Des modifications histocytologiques s'opèrent à la base des microboutures et aboutissent à la formation de ces cals.

Sur les microboutures de deuxième génération d'*Acacia raddiana*, après l'induction rhizogène de 10 ou 20 jours, les ébauches racinaires sont apparues, le plus souvent, à partir d'un cal formé à la base des explants (61,7% des explants mis en culture), mais quelque fois aussi, sans qu'aucune manifestation callogène ne soit visible à la base des microboutures (38,3%).

Ces ébauches ne sont pas allongées et leur longueur ne dépasse pas 3 mm, en moyenne dans le milieu d'induction. De plus le développement des bourgeons est bloqué. Les racines poussent et les bourgeons démarrent uniquement après repiquage sur des milieux sans hormones. Donc les concentrations d'hormones et en particulier d'auxines stimulant la rhizogénèse, sont inhibitrices de la croissance. Un passage des explants sur un milieu sans hormones permet de lever cette inhibition.

Selon leur diamètre, les cals, observés à l'oeil nu au bout de 30 jours de culture, de couleur généralement blanchâtre, ont été séparés en quatre classes. En fonction de la nature et surtout des doses des phytohormones employées et de la durée de l'induction rhizogène, les cals apparus ont un diamètre très petit (classe 1), petit (classe 2), moyen (classe 3) ou un gros diamètre (classe 4). En effet, les résultats de l'analyse de variance révèlent une influence très significative de la durée d'induction ($F = 48,55$; $P = 0,000$) et des hormones utilisées dans les milieux inducteurs ($F = 28,44$; $P = 0,000$) sur la grosseur des cals.

En revanche leur croissance a été importante et égale dans tous les milieux testés ($F = 1,7$; $P = 0,165$ non significatif). De même les potentialités callogènes des explants mis en culture (apex et noeuds) sont sensiblement identiques ($F = 0,29$; $P = 0,596$ non significatif).

Les cals des classes 1 (64%) et 2 (18%) sont les plus fréquents. Ils représentent 82% du total des explants portant un cal basal. Les cals des classes 3 et 4 correspondent respectivement à 16% et 2% de l'ensemble des microboutures.

Pour apprécier l'importance de l'influence des cals sur l'enracinement et l'élongation des microboutures d'*Acacia raddiana*, nous nous sommes proposés d'établir une corrélation entre les phénomènes d'organogénèse observés et l'interaction d'un facteur exogène: hormones, pour une induction de 10 jours (tableau n°11).

Dans nos conditions expérimentales, l'expression des cals à la base des microboutures ainsi que le nombre de racines apparues sur ces cals et le développement caulinaire varient selon la nature et les concentrations des phytohormones utilisées (tableau n°11).

Les pourcentages des cals obtenus sont plus importants avec l'AIB qu'avec l'ANA (presque 3 fois plus élevés à dose égale). Les

microboutures d'*Acacia raddiana* sont donc plus sensibles à l'AIB. Ces résultats viennent en appui des observations déjà faites (cf. § 2.1.1.). Les valeurs maximales des pourcentages de cals correspondent aux balances hormonales ayant fourni non seulement l'essentiel des cals des classes 3 et 4 (88%) mais également le plus grand nombre de racines par microbouture (entre 10,4 et 14,8). En revanche ces balances hormonales ont fourni les tiges les moins longues (entre 8,8 et 10,4 mm).

L'action rhizogène de l'AIB à 20 mg.l⁻¹ est sensiblement équivalente à celle de 10 mg.l⁻¹ d'AIB additionné de Kinétine à 0,01 mg.l⁻¹.

L'effet bénéfique de cette cytokinine sur l'enracinement de l'*Acacia raddiana*, résulterait de son importante action callogène lorsqu'elle agit en synergie avec une auxine utilisée à forte concentration. Ces résultats permettent d'expliquer les valeurs maximales des coefficients de multiplication racinaire obtenues avec une période d'induction rhizogène de 10 jours (cf. tableau n°8).

Les valeurs minimales des pourcentages de cals correspondent aux balances hormonales (avec ANA) ayant fourni l'essentiel des cals des classes 1 et 2 (82%) et parallèlement une production de racines moins importante (entre 3 et 4 racines par microbouture). En revanche, les tiges les plus longues ont été obtenues avec ces mêmes concentrations et l'ANA à 20 mg.l⁻¹ fournit le meilleur développement caulinaire (19,7 mm).

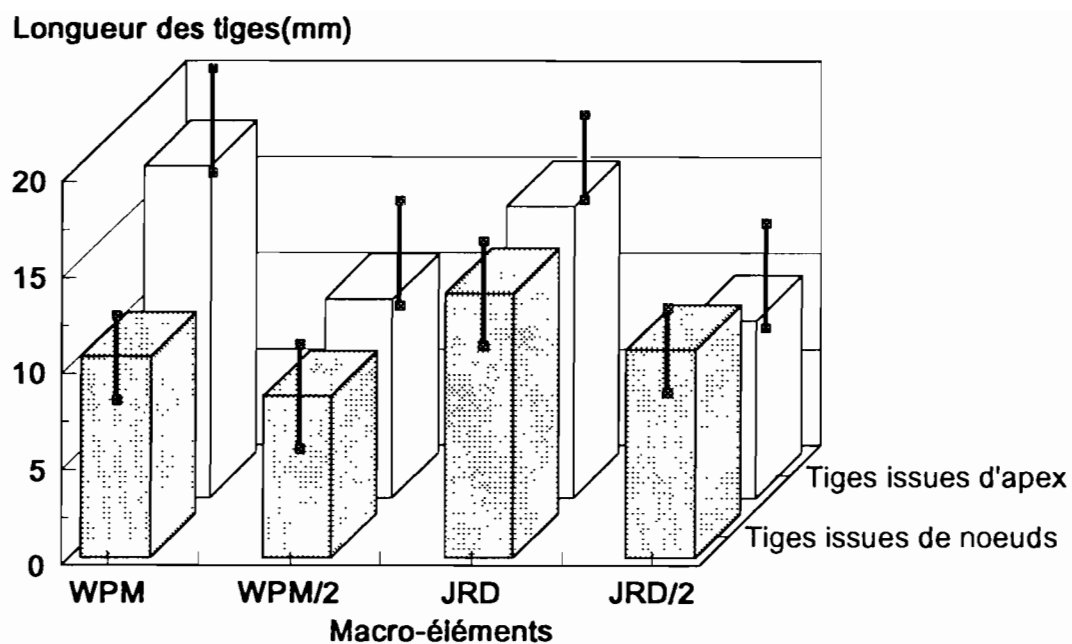


Figure n°8: Croissance des tiges après 30 j d'expression
Effet du type d'explant et de la nature des macroéléments
barre = intervalle de confiance à 95%

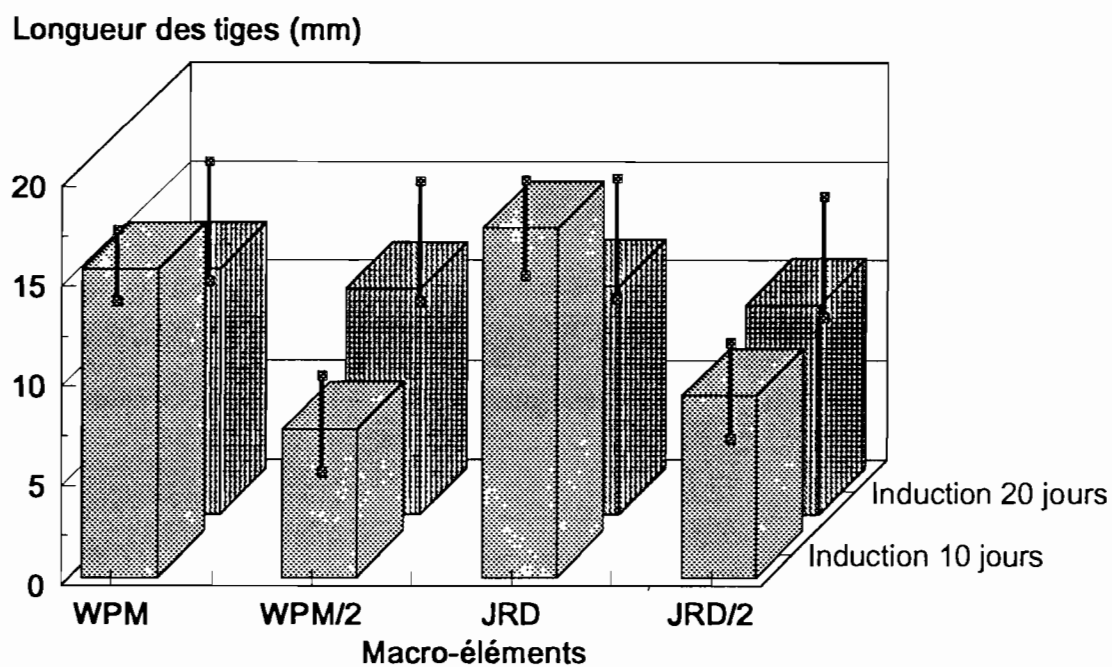


Figure n°9: Croissance des tiges après 30 jours d'expression
Effet de la durée d'induction et de la nature des macroéléments
barre = intervalle de confiance à 95%

3. Acclimatation et sortie en champ.

Aucune condition particulière (nutrition minérale, besoin en eau, substrat) n'a été étudiée au cours de l'acclimatation.

Dans les conditions de multiplication et de culture que nous avons déterminés, nous avons obtenu, après sevrage des plants les résultats suivants:

- un taux de reprise de croissance de 100% pour les plants d'*Acacia albida*. L'acclimatation de cette espèce n'a posé aucun problème particulier. Les plants sont mobilisés en pots en conditions ambiante en vue de leur lignification pour leur sortie en champ;
- un taux de survie de 100% pour les plants d'*Acacia raddiana* au bout de 30 jours de sevrage. 60% des plants présentent une très bonne reprise de croissance et se développent normalement. Les autres plants (40%) sont moins vigoureux et ont une croissance lente.

Il semble qu'ils ne soient pas bien adaptés aux différentes contraintes appliquées au cours de l'acclimatation.

Tableau n°11:

Influence des hormones des milieux inducteurs sur le développement des vitroplants après 30 jours de culture sur milieux d'expression (sans phytohormone).

Induction = 10 jours

Balance hormonale (mg/l)	Effectif développé*	Nbr.moy.de rac./expl	Long. moy. des tiges mm	Callogenèse **	Callogenèse %***
ANA10	48/96	2,8 (a)	16,4 (a)	0,19 (a)	19
ANA10/Kin0,01	64/96	3,7 (a)	17,3 (a)	0,48 (a)	39
AIB20	59/93	10,4 (b)	8,8 (b)	1,40 (b)	90
ANA20	48/94	2,3 (a)	19,7 (a)	0,39 (a)	29
AIB10	78/96	14,0 (b)	10,2 (b)	1,48 (b)	83
AIB10/Kin0,01	69/91	13,3 (b)	10,4 (b)	1,39 (b)	87
P (test F)	N= 366	P= 0,000	P= 0,000	P= 0,000	

*: nbre de racines>0 OU long. tige>10mm

** : variable qualitative scalaire de 0 à 4

%***: pourcentage de plants développés et avec cal basal

Intervalle de confiance P= 0,95; test Newman-Keuls au seuil de 5%

D - DISCUSSION

D. DISCUSSION.

I. REGENERATION DE BOURGEONS.

Les capacités de régénération de bourgeons (14 à 15 bourgeons sur certains explants) sans phase de callogénèse à partir d'explants racinaires cultivés sur milieux N₃₀NH₄ et B5 sont importantes pour les racines d'*Acacia albida*. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Gassama et Duhoux (1992) sur la même espèce et par Allieux (1990) sur l'*Allocasuarina verticillata*. L'absence de cals est très intéressante car elle suggère une absence de variation somaclonale chez les bourgeons néoformés. Ceci permet d'envisager une voie alternative de multiplication de sujets sélectionnés d'*Acacia albida*.

La mise sur pied des conditions favorables à la croissance des racines isolées en culture continue pourrait permettre de disposer, en permanence, d'un nombre suffisant d'explants racinaires pour la régénération.

Les travaux de Mukhopadhyay et M'ram (1981) sur le *Dalbergia sissoo* tout comme ceux de Gassama et Duhoux (1992) sur l'*Acacia albida* étaient principalement orientés vers la recherche de conditions minérales et organiques favorables à la régénération de bourgeons sur racines.

Nos résultats montrent clairement que la recherche des conditions environnementales ou physiques, en particulier d'éclairement, est tout aussi importante pour ce type de culture. L'effet de la lumière sur les racines d'*Acacia albida* est similaire à celui observé par Allieux (1990) sur les racines normales (i.e. non transformées par *Agrobacterium rhizogenes*) d'*Allocasuarina verticillata*. Il montre que la lumière est un facteur qui stimule la néoformation des bourgeons.

L'étude de l'influence des conditions d'éclairement pourrait être, également envisagée, sur la croissance racinaire ou la régénération après transformation génétique des racines par *Agrobacterium*.

Quelque soit la condition d'éclairement appliquée, la néoformation des bourgeons augmente avec l'âge des explants racinaires d'*Acacia albida*. Ces observations sont similaires à celles de Kefford et Caso (1972) sur *Chondrilla juncea* et à celles de Lazzeri et Dunwell (1984)

sur *Brassica sp.* Ceci s'expliquerait par la maturité des tissus mis en culture et en particulier par l'activité du péricycle, laquelle activité augmenterait avec l'âge des explants racinaires (Lazzeri, 1983).

Les capacités de régénération diminuent des segments proximaux vers les segments distaux. Néanmoins le pourcentage de régénération (32%) ainsi que le nombre de bourgeons obtenus (3 par explant) à partir des segments distaux ne sont pas des moindres et confirment les observations précédentes sur l'effet stimulateur de la lumière. Nos observations sur la variation de la réponse morphogénétique en fonction de la position des segments racinaires vont dans le même sens que celle de Lazzeri et Dunwell (1984) sur *Brassica sp* et celles de Gassama et Duhoux (1992) sur l'*Acacia albida*.

Cette variation s'expliquerait par la présence des sites organogènes dont le nombre augmenterait des segments distaux vers les segments proximaux (Gassama, 1993; communication personnelle).

Pour optimiser la régénération des bourgeons sur fragments de racines de *Dalbergia sissoo*, Mukhopadhyay et M'Ram (1981) utilisent une auxine: l'ANA à $10^{-7}M$.

Chez *Brassica sp*, Lazzeri et Dunwell (1984) montrent qu'une cytokinine, Kinétine, permet d'obtenir les meilleurs résultats, alors que chez *Allocasuarina verticillata* (Allioux, 1990) et *Acacia albida* (Gassama et Duhoux, 1992), la BAP est la meilleure phytohormone.

Les effets de la BAP et de la spermidine (polyamine), sur la régénération, ont été comparés. Nos résultats montrent que pour les explants de 15 jours l'effet stimulateur de la BAP est plus importante que celle de la spermidine. En revanche pour des explants plus âgés (30 jours) l'action stimulatrice de la spermidine devient plus importante.

L'étude du comportement de racines plus jeunes (ayant moins de 15 jours) ou plus âgées (plus de 30 jours) permettrait de mieux comprendre le mode d'action de ces deux phytohormones sur la néoformation de bourgeons à partir des racines d'*Acacia albida*.

La régénération de bourgeons néoformés n'a pas pu aboutir pour *Acacia raddiana*. Aucune régénération spontanée n'a pu être observée. L'utilisation de polyamines ou de combinaison d'une cytokinine avec une auxine et une polyamine se sont révélées infructueuses.

Toutefois, il semble que le passage des explants à l'obscurité, en présence de spermidine ou de spermine, présente un intérêt particulier. En effet, tous les segments ayant présenté des cals chlorophylliens à l'une de leur extrémité, sont ceux qui ont d'abord séjourné à l'obscurité puis ont été transférés à la lumière.

L'étude du comportement, vis-à-vis des conditions d'éclairement, des racines d'*Acacia raddiana* issues d'une transformation génétique par *Agrobacterium*, pourrait être également envisagée.

II. MICROPROPAGATION D'EXPLANTS PRIMAIRES.

La recherche de conditions minérales et organiques est essentielle pour déterminer les besoins nutritionnels et/ou physiologiques spécifiques à chaque espèce végétale.

L'étude de l'influence de 4 équilibres minéraux sans hormones a été réalisée sur des explants primaires d'*Acacia raddiana*. Les observations faites, après 60 jours de culture, montrent que la solution minérale MS est plus favorable, à la croissance des vitroplants, que les milieux JRD ou WPM entiers ou dilués de moitié. Les plants obtenus sont plus vigoureux. Ces observations sont tout à fait similaires à celles qui ont été faites sur des microboutures du même âge, d'*Acacia raddiana* (Kparé, 1992) et d'*Acacia senegal* (Badji, 1991).

Les taux de croissance obtenus sur cette espèce restent relativement faibles au cours des subcultures (Borgel et Diouf, 1992; communication personnelle). La recherche de facteurs minéraux adaptés à chaque subculture de vitroplants devrait permettre d'améliorer leur croissance et d'établir, à terme, les conditions optimales pour l'obtention et le maintien *in vitro* des lignées clonales.

L'incorporation de régulateurs de croissance dans le milieu MS a donné des résultats sensiblement supérieurs aux traitements sans hormone. Le développement d'une seule tige a été obtenu dans nos conditions expérimentales.

Une étude comparative du mode d'action de la BAP, de la Zéa et du GA₃ combinés à l'AIB (dans les proportions 10^{-7} - 6.10^{-7} M) a été réalisée.

Les résultats obtenus montrent l'intérêt de la Zéa pour stimuler

la croissance des entre-nœuds des vitroplants d'*Acacia raddiana*. De plus les plants sont plus vigoureux. Ceci représente un intérêt supplémentaire par rapport à l'utilisation de la BAP qui produit des entre-nœuds courts difficiles à manier et à multiplier au cours des subcultures.

Contrairement aux résultats rapportés sur *Sequoia sempervirens* (Boulay, 1977) et *Sequoiadendron giganteum* (Monteuuis et Bon, 1985) qui montrent l'intérêt de la BAP pour la micropropagation des Gymnospermes, l'effet de la Zéa sur les microboutures d'*Acacia raddiana* est similaire à celui obtenu sur l'*Acacia senegal* (Badji, 1991). L'utilisation du GA₃ n'a pas donné les effets escomptés sur la croissance des vitroplants en raison des résultats similaires à ceux obtenus sur les témoins. Ces données concordent avec les observations de Connault (1988) sur *Jasminum sp* et celles de Dufour et Dublin (1985) sur *Theobroma cacao* et confirment le manque d'intérêt à accorder à cette phytohormone pour ce type de culture.

La production de tiges néoformées à partir de la multiplication de bourgeons cotylédonnaires chez *Acacia albida* (Duhoux et Davis, 1985) ou chez *Pinus rigida x taeda* (Gassama, 1984) pourrait être envisagée chez l'*Acacia raddiana* grâce à la maîtrise de balances hormonales optimales.

III. MICROPROPAGATION D'EXPLANTS SECONDAIRES.

Notre étude de la rhizogène chez l'*Acacia raddiana* (Savi.) a principalement été menée sur des explants de deuxième génération pour les deux raisons suivantes:

- difficultés éprouvées pour enraciner ce type de microboutures (Kparé, 1992)
- l'étude servira pour la recherche des conditions d'enracinement de clones matures rajeunis.

L'étude *in vitro* nous a permis d'analyser l'effet de quelques facteurs exogènes et de certaines manifestations histocytologiques sur la rhizogénèse d'abord et ensuite sur la caulogénèse.

Le milieu de multiplication avec généralement des doses faibles à moyennes d'auxines, peut chez certaines légumineuses arborescentes, comme *Dalbergia sissoo* (Mukhopaddy et M'ram, 1981); *Robinia pseudoacacia* (Chalupa, 1981 à 1983) ; *Acacia albida* (Duhoux et Davis, 1985) ou *Cerotonia siliqua* (Sébastien et McComb, 1986), permettre un important développement rhizogène et caulinaire.

Des essais similaires n'ont pas été concluants avec des microboutures de deuxième subculture d'*Acacia raddiana* (Kparé, 1992). Les résultats présentés montrent que la rhizogénèse de l'*Acacia raddiana* nécessite deux étapes avec notamment une phase d'induction et une phase d'expression racinaires. Les deux techniques utilisées n'ont pas abouti aux mêmes résultats.

L'induction rhizogène courte telle que décrite, ne nous a pas permis d'enraciner les microboutures après 30 jours de mise en culture, contrairement à Bekkaouis *et al.*, (1983) et Monteuis et Bon (1985) qui ont réussi, avec la même méthode, à obtenir plus de 50% d'explants enracinés au bout de 45 jours de culture, respectivement chez *Sequoia sempervirens* et *Sequoiadendron giganteum*. En revanche les réactions de phytotoxicité observées (vitrification et noircissement de la base des explants), similaires à celles décrites sur les deux gymnospermes, montrent que les microboutures d'*Acacia raddiana* sont plus sensibles à l'AIB qu'à l'ANA.

La vitrification selon Bornamn et Vogelmann (1984), serait conditionnée par la nature du milieu de culture en fonction de l'état physiologique de l'explant au moment de son introduction. Un milieu à forte salinité et particulièrement riche en ions NH_4^+ et K^+ accentuerait le phénomène. Dans le cas de l'*Acacia raddiana*, l'état vitreux des microboutures pourrait être dû au temps de trempage (24 heures) des explants dans les solutions fortement concentrées en auxines.

En ce qui concerne l'induction rhizogène prolongée, les résultats obtenus, montrent que l'enracinement de l'*Acacia raddiana* est largement dépendant du temps d'induction et des compositions minérale et organique des milieux de culture.

Les travaux de Favre (1970, 1973) et de Moncousin (1987) concernent la vigne, pour laquelle l'induction racinaire ne nécessite pas la présence d'auxine. Par contre, chez *Pinus radiata* (Smith et

Thorpe, 1975 b) tout comme chez *Leucaena leucocephala* (Goya et al., 1985) ; *Acacia koa* (Skolmen et Mapes, 1976) ou *Acacia senegal* (Badji, 1991), la présence d'auxine est obligatoire.

Smith et Thorpe (1975 b), considèrent que la présence d'auxine est essentielle pour deux processus distincts de la rhizogénèse:

- la formation de locus méristématiques
- la formation de méristémoïdes.

Chez l'*Acacia raddiana*, la présence d'auxine est, également, obligatoire durant la phase appelée induction, pendant laquelle un apport auxinique est nécessaire à la formation d'une racine.

Le temps optimum nécessaire pour induire la formation des racines est variable selon les espèces. Il est de 3 jours pour *Jasminum officinale* et *Jasminum grandiflorum* (Connault, 1988) ; 13 jours pour le *Sequoia giganteum* (Berthon, 1990) ou 12 jours pour *Acacia senegal* (Badji, 1991).

Chez l'*Acacia raddiana*, les résultats montrent qu'une induction rhizogène de 10 jours est largement suffisante pour initier la formation des locus méristématiques puis celle des méristémoïdes. Maan et al. (1985) ont montré chez le tabac, qu'un apport de forte concentration auxinique pendant une longue période pourrait perturber la cascade d'événements conduisant à la rhizogénèse. Ceci correspond parfaitement à nos observations sur l'*Acacia raddiana*, car en doublant la période d'induction de 10 à 20 jours, nous avons noté une chute importante aussi bien du pourcentage d'enracinement que du nombre de racines néoformées par microboutures. Selon ces auteurs l'inhibition du développement racinaire pourrait être due à un métabolisme de l'auxine dont certains métabolites inhiberaient la croissance des primordiums.

L'utilisation dans le milieu d'expression d'un composé de type rutine (antioxydant diphénolique), qui modifie le processus d'oxydation en protégeant l'auxine (Berthon, 1990) et en formant un complexe actif avec cette auxine endogène (Stonier et al., 1979 b), pourrait permettre d'améliorer sensiblement l'enracinement des acacias.

Chez l'*Acacia raddiana*, l'auxine la plus rhizogène est l'AIB utilisé à la concentration de 10 mg/l et la substitution de cette auxine par l'ANA ne paraît pas avantageuse quant au pourcentage final

d'enracinement, contrairement au séquoia géant (Berthon, 1990) ou l'*Acacia senegal* (Badji, 1991), pour lesquels l'ANA, à la même concentration, est plus favorable à la rhizogénèse.

En ce qui concerne l'effet des auxines sur la croissance des racines, nos résultats mettent en lumière l'existence d'une action spécifique de l'ANA et de l'AIB sur l'enracinement de l'*Acacia raddiana*.

En effet, l'ANA favorise chez cette espèce la production de grosses racines pivotantes (5,5 cm de long en moyenne à un mois), alors que l'AIB induit la formation d'un système racinaire très dense (14 à 16 racines en moyenne par microbouture) mais peu allongées (3 cm après un mois de culture).

Signalons qu'à notre connaissance, il n'y a pas encore eu de résultat faisant état de cette action spécifique de l'ANA et de l'AIB sur les processus de l'enracinement chez les ligneux.

Ylmaz-Lentz (1984) constate un effet favorable des cytokinines (BAP) en association avec les auxines exogènes, sur l'enracinement de plantules de *Sequoiadendron giganteum* néoformées à partir de sections d'hypocotyles. En 1985, Monteuis et Bon, font des observations similaires sur la même espèce, mais cette fois, à partir de microboutures de deuxième subculture.

Chez l'*Acacia raddiana*, les résultats montrent clairement qu'une combinaison cytokinine-auxine exogènes dans le milieu d'induction, en particulier de la Kinétine avec l'AIB ou l'ANA, dans les proportions définies, est très favorable à l'émergence des primordia racinaires.

Nos résultats permettent en outre de préciser que cette cytokinine a une action régulatrice sur l'enracinement lorsqu'elle agit en synergie avec une auxine. En effet les courbes d'apparition de racines et de croissance racinaire ont une pente constante pendant un mois d'expression quand Kin est combinée à ANA ou AIB. En l'absence de Kin ces courbes présentent une rupture de pente.

En 1990, Berthon montre chez le séquoia géant, par des dosages du taux d'hormones endogènes, que le rapport AIA/cytokinine subit des fluctuations au cours des diverses phases de la rhizogénèse. Le rapport diminue durant la phase d'induction racinaire et augmente durant la phase d'expression. On peut envisager, également, chez l'*Acacia raddiana* l'existence de telles fluctuations au moment de

l'enracinement. En effet, on peut imaginer que l'auxine exogène va se fixer sur son récepteur membranaire spécifique, induisant par oxydation une chute d'auxine endogène. Le taux de cytokinine endogène augmente jusqu'à un niveau favorable à l'induction racinaire. Un apport de kinétine dans le cas du *raddiana* renforcerait le taux de cytokinine endogène.

Chez la plupart des espèces ligneuses, le passage des explants dans les milieux d'induction racinaire, s'accompagne de modifications histocytologiques qui s'opèrent à la base des microboutures et aboutissent à la formation de cals rhizogènes.

Favre (1970, 1973 et 1977) a décrit ce cal comme l'une des premières étapes conduisant à la formation des racines chez la vigne. Ces cals ont été observés, également, chez le caroubier (Thomas et Mehta, 1983); l'*Acacia albida* (Duhoux et Davis, 1985); les jasmins officinal et à grandes fleurs (Connault, 1988); le séquoia géant (Berthon, 1990) ou l'*Acacia senegal* (Badji, 1991).

Chez l'*Acacia raddiana*, plus de la moitié des explants mis en culture dans les milieux inducteurs ont, également, développé un cal avant l'apparition des racines (61,7 %). La corrélation entre l'épaisseur de ces cals et la rhizogénèse puis la caulogénèse montre clairement que ces phénomènes sont intimement liés. Les gros cals induisent la formation de plus de racines que les petits cals. Ce qui est en accord avec les observations précédentes. En revanche la présence d'un gros cal à la base de la microbouture ralentit le développement caulinaire (tableau n°11). Ces résultats confirment les observations de Martin *et al.* (1983), pour lesquelles la présence de ce cal rhizogène créerait un filtre gênant le passage de l'eau et des éléments nutritifs des racines vers la plante ce qui ralentirait la croissance des tiges.

Le nombre et la qualité du système racinaire ainsi que la croissance des tiges dépendent de la solution minérale utilisée.

Pour enracer le *Sequoia sempervirens*, Bekhaoui *et al.*, (1983) utilisent le milieu MS dilué 3 fois, alors que pour le pommier (Hartman et Kester, 1983) comme pour le camélia (Samartin *et al.*, 1986), le milieu MS est dilué de moitié. De même Badji (1991) parvient à obtenir un bon enracinement de l'*Acacia senegal* (presque 100%) avec la solution minérale de Jordan (milieu MS dilué de moitié).

Chez l'*Acacia raddiana*, parmi les 4 macro-éléments testés (WPM, WPM/2, JRD et JRD/2), la solution minérale WPM s'est révélée plus favorable à la rhizogénèse (plus de 80% de plants enracinés). Les résultats montrent que les racines produites sont plus longues et plus nombreuses. En revanche, la croissance des tiges est plus importante dans le milieu JRD. La dilution de moitié de ces deux solutions minérales n'est avantageuse ni pour l'enracinement, ni même pour la croissance des tiges, contrairement au *Kalmia latifolia* (Gaspar *et al.*, 1990), pour lequel la solution WPM/2 fournit le meilleur taux d'enracinement (100%).

Des expérimentations relatives à un rééquilibrage de certains sels minéraux, en particulier des ions NH_4^+ , dans les milieux WPM et JRD, pourraient permettre d'améliorer sensiblement l'enracinement et la croissance caulinaires des acacias, et sont actuellement en cours d'observation.

IV. ACCLIMATATION.

Si pour l'*Acacia albida*, il ne se pose aucun problème particulier à l'acclimatation en revanche celle de l'*Acacia raddiana* comme celles d'autres espèces tel que l'*Acacia seyal* a connu quelques difficultés.

Ces difficultés sont surtout inhérentes à une reprise de croissance difficile observée chez certains plants (40% de plants d'*Acacia raddiana*).

L'on pourrait envisager, pour uniformiser la croissance des plants de ces essences, l'étude de certains facteurs exogènes, relatifs notamment à la photopériode et à la nutrition minérale et organique au moment de l'acclimatation.

E - CONCLUSION

E. CONCLUSION.

Les résultats qui précèdent montre qu'il a été possible d'obtenir, à partir de fragments de tiges d'*Acacia raddiana* et de racines d'*Acacia albida* cultivés *in vitro*, des microboutures enracinées qui, après transfert en conditions ordinaires de culture, produisent des plantules bien développées, aptes à la mise en plein champ.

On ne saurait, pour autant, prétendre que la reproduction végétative *in vitro* des acacias est au point; bien au contraire, le problème de micropropagation de ces essences, demeurent pratiquement entier. L'étape principale, la multiplication *in vitro* de plusieurs générations successives de tiges à partir d'un même explant, n'a pas été franchie à ce jour.

Les données expérimentales précédentes ont permis de préciser plusieurs points et de dégager de nouvelles orientations de recherche qui devraient faire progresser la micropropagation des acacias.

La mise au point de techniques de reproduction végétative *in vitro* des acacias sahéliens est urgente. Outre la micropropagation à partir d'individus juvéniles, les recherches devraient être de plus en plus orientées vers l'amélioration des conditions de multiplication d'individus adultes aux potentialités organogénétiques et agronomiques connues.

La recherche des conditions de rhizogénèse des acacias devra être poursuivie pour aboutir à une meilleure connaissance de la physiologie de l'enracinement de ces essences. A cet effet, l'utilisation de certaines techniques de dosage telle que la méthode de dosage immunologique par test ELISA pourrait permettre de quantifier avec précision certaines phytohormones impliquées dans les différents processus de la rhizogénèse. Cette approche devrait, à terme, faciliter la maîtrise des facteurs de l'enracinement des acacias.

Enfin les résultats obtenus en embryogenèse somatique avec notamment la production de plantules viables par Borgel *et al.* (1993), à partir d'embryons somatiques d'*Acacia nilotica* ouvre de nouvelles perspectives pour la production *in vitro* de clones d'acacias déjà enracinés.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

ALLIOUX, B.

Culture de Racines d'*Allocauarina verticillata* (Lam) et de *Casuarina equisetifolia* (Forst & Forst), transformées ou non par *Agrobacterium rhizogenes* et applications potentielles.

Mémoire de fin d'étude(Ecole Nationale Supérieure d'Horticulture)
Octobre 1990.
page(s) 1-48

ALVARO, S. AND FAUSTO, R.

Effects of Some Antioxydants on in Vitro Rooting of Apple Shoots.

HortScience 25(11)
november 1990
page(s) 1435-1436

AUBRÉVILLE, A.

Ecological notes on the geographical distribution of some species of *Acacia* in West Africa

Revue de Botanique Appliquée et d'Agriculture Tropicale, série 17
(193), 1937
page(s) 796-804

BADJI, S.

La symbiose *Acacia senegal* (L.) Willd.- *Rhizobium* sp.: Etude des partenaires et optimisation du fonctionnement de la symbiose.

Thèse de doctorat, Université de Droit, d'Economie et des Sciences d'Aix-Marseille III, 1991
page(s)

BADJI, S.; MAIRONE, Y.; NDIAYE, I.; MERLIN, G.; DANTHU, P.; NEVILLE P. AND COLONNA, J.P.

In vitro propagation of the gum arabic tree (*Acacia senegal* (L.) Willd). Developing a rapid method for producing plants

Plant Cell Reports, vol.12, n°11
1993
page(s) 629-633

BALLADE

La convertibilité des méristèmes de tige et de racine chez le cresson (*Nasturtium officinale*). In: Bases de la multiplication végétative: Les méristèmes et l'organogénèse. J. Margara, INRA, 1982

page(s)

BANERJEE S. AND GUPTA S.

Morphogenesis in tissue cultures of different organs of *Nigella sativa*. In: Plant Culture Media: Formulations and Uses. E.F. George, D.J.M. Puttock and H.J. George, Vol. 1, 1987

Physiol. Plant., 33
1975 a
page(s) 185-187

BASU R.N., ROY B.N., BOSE T.K.

Interaction of abscissic acid and auxins in rooting of cuttings.

Plant Cell Physiol., 11
1970
page(s) 681-684

BERHAUT, J.

Acacia raddiana (Savi.).

Flore illustrée du Sénégal. Tome IV. Dakar, Sénégal; Direction des Eaux et Forêts, 1975
page(s) 474-476

BERTHON, J.Y.

Régulation de la rhizogénèse: Cas d'une espèce ligneuse le *Sequoiadendron giganteum* (Lindl.) Buchholz.

Thèse de doctorat, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand II
1990
page(s) 1-142

BERTHON, J.Y.; BOYER, N. AND GASPAR, TH.

Phenols as regulators and markers of root formation by shoots of *Sequoiadendron giganteum* raised in vitro.

Soc.de Physiologie Végétale-Gembloux,1
juin 1990
page(s) 28

BERTHON, J.Y.; TAHAR S.B.; GASPAR, T. AND BOYER, N.

Rooting phases of shoots of *Sequoiadendron giganteum* in vitro and their requirements .

Plant Physiol. Biochem., 28 (5)
1990
page(s) 631-638

BIRAN I., HALEVY A.H.

Endogenous levels of growth regulators and their relationship to mechanical injury and ethylene

Plant Physiol., 28
1973
page(s) 436-442

BLAKESLEY D., WESTON G., ALDERSON P., HAL J., ELLIOT M.C.,

The effect of time of year and the induction on etiolation on rooting and the concentration AIA and cytokinin in cuttings of *Cotinus coggygira* royal purple.

New Bull. British Plant Growth Regulator Group, 7
1985
page(s) 51-52

BONGA J.M.

Vegetative propagation in relation to juvenility and maturation and rejuvenation. In : tissue culture in forestry Eds. J. Bonga and Durzan. Martinus Nijhoff.

Publishers NV The Hague, Netherlands.
1982
page(s)

BONNER J.

On the growth factor requirements of isolated root. In: Plant Culture Media: Formulation and Uses. E.F. George, D.J.M. Puttock and H.J. George, Vol. 1, 1987

Am. J. Bot., 27
1940 b
page(s) 692-701

BONNER J. AND DEVIRIAN P.S.

Growth factor requirements of four species of isolated roots. In: Plant Culture Media: Formulations and Uses . E.F. George, D.J.M. Puttock and H.J. George, Vol. 1, 1987

Am. J. Bot., 26
1939
page(s) 661-665

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

Obtention de cals embryogènes et d'embryons somatiques d'acacias sahéliens: études histologique comparée avec l'embryogénèse zygotique.

XIIème Colloque de la section française de l'IAPTC Montpellier, 1993
"L'embryogénèse somatique: approches cellulaires et moléculaires"
page(s)

BRENAN, J.P.M.

Manual on taxonomy of Acacia species: present taxonomy of four species of Acacia (*A. albida*, *A. senegal*, *A. nilotica*, *A. tortilis*)

F.A.O, Rome,
1983
page(s) 1-47

BRENAN, J.P.M.

Acacia tortilis (Forsk.) Hayne. In notes on Mimosoideae: III

Kew Bulletin, n°1
1957
page(s) 86-89

BRENAN, J.P.M.

Present taxonomy of four species of Acacia (*A. albida*, *A. senegal*, *A. nilotica*, *A. tortilis*)

Manual on taxonomy of Acacia species,
1983
page(s) 1-45

CATTESSON A.M.

Les tissus végétaux: Ultrastructure, biogénèse.

In: Les polymères végétaux. B. Monties ed., Gauthier-Villars,
Paris, 1980
page(s) 1-29

CAUVIN, B. ET MASSOC, B.

Teneur en composés phénoliques et aptitude à l'enracinement de clones d'*Eucalyptus gunnii*

Annales Afocell,
1992
page(s) 409-415

CHOVEAUX N.A., VAN STADEN J.

The effect of 1-naphtalenacetic acid on the endogenous cytokinin content of aseptically cultured bark segments of *Salix Babylonica*

Plant Cell Physiol., 22 (7)
1981
page(s) 1207-1214

CHRIQUI D.

Induction de prolifération des cellules prérhizogènes: auxines et polyamines

Bull. Soc. Bot. Fr., 132, Actuel Bot.(1)
1985
page(s) 127-141

CONNAULT, C.

Micropropagation et microgreffage de deux espèces de jasmin cultivées à Grasse: *Jasminum officinale* L. et *Jasminum grandiflorum*

Convention Chanel,
1986
page(s) 1-134

DOMMERGUES, Y.; DUHOUX, E. ET DIEM H.G.

Les arbres fixateurs d'azote en foresterie et agroforesterie tropicales

Bull.Soc.bot.Fr.,135,Actual.bot.,(3)
1988
page(s) 49-64

DUFOUR, M. ET DUBLIN, P.

Quelques données sur la multiplication végétative in vitro des cacaoyers cultivés (*Theobroma cacao*)

Café Cacao Thé, vol. XXIX, n°4,
oct.-déc. 1985
page(s) 235-244

DUHOUX, E.

Organogénèse et multiplication in vitro chez les arbres: méthodes et applications

ZRYD, J.P., éd. Presses Polytechniques Romandes,
1986
page(s)

DUHOUX, E. & DAVIS, D.

Caulogénèse à partir de bourgeons cotylédonaire d'*Acacia albida* et influence du saccharose sur la rhizogénèse

J. Plant Physiol., 121,
1985
page(s) 175-180

EPSTEIN E. AND LAVEE S.

Conversion of indole -3- butyric acid to indole -3- acetic acid by cutting of grapevine (*Vitis vinifera*) and olive (*Olea europea*).

Plant Cell Physiol., 25 (5)
1984
page(s) 697-703

FAVRE J.M.

Effets corrélatifs de facteurs internes et externes sur la rhizogénèse d'un clone de Vigne (*Vitis riparia* x *Vitis rupestris*) cultivé in vitro.

Rev. Gén. Bot., 50
1973
page(s) 279-361

FAVRE J.M.

La rhizogénèse. Aspects divers d'un processus d'organogénèse végétale.

Ann. Univ. Abidjan Série C. Science.
1977
page(s)

FAVRE J.M. ET MÉDARD R.

Ontogénie des racines adventives chez la vigne. (*Vitis vinifera* L.) cultivé in vitro.

Rev. Gen. Bot., 76
1969
page(s) 455-667

FIGUEIRA, A.; WHIPKEY, A. AND JANICK, J.

Increased CO₂ and Light Promote in Vitro Shoot Growth and Development of *Theobroma cacao*.

J. Amer. Soc. Hort. Sci. 116 (3),
may 1991
page(s) 585-589

FUERNKRANZ, H.A.; NOWAK, C.A. AND MAYNARD, C.A.

Light effects on in vitro adventitious root formation in axillary shoots of mature *Prunus serotina*

Physiologia Plantarum 80, Copenhagen,
1990
page(s) 337-341

GASPAR, TH.; KEVERS, C.; HAUSMAN, J.F. AND BERTHON, J.Y.

Rooting in vitro: fundamental data for new strategies

Soc. de Physiologie Végétale-Gemboux,1
juin 1990
page(s) 39

GASPAR TH. AND COUMANS M.

Root formation. In : "Cell and Tissue culture in forestry". J.M.
Bonga and D.J. Durzan eds, Martinus Nijhoff

Publishers, Dordrecht, Vol. 2
1987
page(s) 202-217

GASSAMA, Y.K. ET DUHOUX, E.

Regénération de plantes par culture in vitro de racines d'Acacia
albida

Annales Afocell, 1992
page(s)

GENEVE, R.L. AND KESTER, S.T.

Polyamines and Adventitious Root Formation in the Juvenile and
Mature Phase of English Ivy.

Journal of Experimental Botaniny, Vol.42, n° 234,
January 1991
page(s) 71-75

GEORGE, E.F.; PUTTOCK, D.J.M. & GEORGE, H.J.

Plant Culture Media: Formulations and Uses
Plant Culture Media: Commentary and Annalysis

Volume 1 et 2,
1987-88
page(s)

GHARYAL P.K. AND MAHESHWARI S.C.

In vitro differentiation of somatic embryoids in a leguminous tree-
Albizia lebeck L. In: Plant Culture Media. E.F. George, D.J.M.
Puttock and H.J. George, Vol. 1, 1987

Naturwiss. 68
1981
page(s) 379-380

GOUET, J.P. ET PHILLIPEAU, G.

Comment interpréter les résultats d'une analyse de variance?

Service des Etudes Statistiques,
1989
page(s) 1-47

HAISSIG B.E.

Origins of adventitious roots.

NZ.J. For Sci., 4
1974
page(s) 299-310

HAUSMAN, J.F.; KEVERS, C. AND GASPAR, TH.

Rooting in vitro while multiplying.

Soc.de Physiologie Végétale-Gembloux, 1
juin 1990
page(s) 42

HEIDE O.M.

Stimulation of adventitious bud formation in Begonia leaves by abscisic acid

Nature, 219
1968
page(s) 960-961

HESS C.E.

Internal and external factors regulating root initiation. In : "Root Growth".

Whittington W.J. ed., Butterworths, London.
1969
page(s) 42-64

JAIN, A.K.; DANDIN, S.D. AND SENGUPTA, K.

In vitro Propagation Through Axillary Bud Multiplication in Different Mulberry Genotypes

Plant Cell Reports 8: 12
may 1990
page(s) 737-740

JARVIS B.C. AND SHAHEED A.I.

Adventitious root formation in relation to the uptake and distribution of supplied auxin.

New Phytol., 103
1986 a
page(s) 23-31

JAY-ALLEMAND, C.; DE PONS, V. ET DOUMAS, P.; CAPELLI, P.;
SOSSOUNTZOV, L. ET DANIEL, C.

Formation de Racines "in vitro" à partir de Cotylédons de Noix
(Juglans sp.): un modèle d'étude de la rhizogénèse chez les espèces
ligneuses.

C.R. Acad. Sci. Paris, t.312, Série III n°6, 14,
juin 1991
page(s) 369-375

JUNTILA, O.

Gibberellins and the Regulation of Shoot Elongation in Woody Plants

Plant Physiology

page(s) 199-209

KELLER, J.

Culture of Unpollinated Ovules, Ovaries, and Flower Buds in Some
Species of the Genus Allium and Haploid Induction via Gynogenesis
in Onion (Allium cepa L.)

Euphytica 47: 3
juin 1990
page(s) 241-247

KELLEY, H.W.

Garder la terre en vie: L'érosion des sols, ses causes et ses
remèdes

Bulletin Pédologique de la F.A.O., Rome,
1983
page(s) 1-43

KENNENNI, L. & VAN DER MAAREL, E.

Population ecology of Acacia tortilis in the semi-arid region of
the Sudan .

Journal of Vegetation Science, 1,
1990
page(s) 419-424 .

KEVERS, C.; MENARD, D.; MARCHAND, S.; HAUSMAN, J.F. & GASPAR, TH.

Enracinement in vitro et ex vitro et comportement à l'acclimatation de Kalmia et de Rhododendron multipliés in vitro

Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent, 55 (3b),
1990
page(s) 1267-1274

KPARÉ, Y.M.

Influence de l'expression de la variabilité génétique sur les potentialités de clonage d'Acacia raddiana (Savi.)

Mémoire de D.E.A., Université Cheikh Anta Diop de Dakar,
1992
page(s) 1-58

KULESCHA, Z.

Etude de la Dégradation, l'Absorption et la Fixation de l'Acide 3
3 Indolyl Acétique par les Tissus de Topinambour (Helianthus tube-
rosus L.var.violet)

La Culture des Tissus Végétaux, Résultats Généraux et Réalisations
Pratiques. Travaux dédiés à Georges Morel réunis par R.J.Gautheret.
page(s) 59-60

KUMAR, A.; TANDON, P. AND SHARMA, A.

Morphogenetic responses of cultured cells of cambial origin of a
mature tree: Dalbergia sissoo Roxb.

Plant Cell Reports, 9,
1991
page(s) 703-706

LAZZERI, P.A. AND DUNWELL, J.M.

In Vitro Shoot Regeneration from Seedling Root Segments of Brassica
oleracea and Brassica napus Cultivars.

Annals of Botany 54,
1984
page(s) 341-350

LEFEBVRE, R. ET SADKI, I.

L'éthylène et la néoformation de bourgeons par des fragments de
racines d'endive (Cichorium intibus L., cv Witloof) cultivés in vitro

C.R. Acad. Sci. Paris, t.309, Série III n°2, 15,
juin 1989
page(s) 63-68

LEVINE M.

Response of fibrous roots of sunflower and tobacco tissue cultures to plant growth substances. In: Plant Culture Media: Formulations and Uses . E.F. George, D.J.M. Puttock and H.J. George, Vol. 1, 1987

Bot. Gaz., 112
1951
page(s) 281-289

LOWEL H.L. AND WHITE J.

Anatomical changes during adventitious root formation. In : "New root formation in plants in cuttings".

Edited by M.B. Jackson Martinus Nijhoff Publishers Dordrecht
1986
page(s) 111-140

MACRAE, S. AND VAN STADEN, J.

In Vitro Culture of Eucalyptus grandis: Effect of Gelling Agents on Propagation.

J. Plant Physiol. Vol. 137,
1990
page(s) 249-251

MALDINEY R., PELESE F., PILOTE G., SOTTO B., SOSSOUNTZOV L. MUGINIAC E.

Endogenous levels of abscissic acid, indole-3-acetic, zeatin riboside during the course of adventitious root formation in cuttings of Craigellia lateral suppressor tomatoes.

Physiol. Plant, 68
1986
page(s) 426-430

MARGARA, J.

Bases de la multiplication végétative: Les méristèmes et l'organogénèse

INRA
1982
page(s)

MARIGO G.

Polyphénols et croissance végétale. Essai d'évaluation du rôle joué in vivo par les composés phénoliques chez Lycopersicum esculentum.

Thèse de doctorat d'état, Physiologie Végétale, Toulouse
1979
page(s) 161

MARIOTTI D., ARCIONI S. AND PEZZOTTI M.

Regeneration of *Medicago arborea* L. plants from tissue and protoplast cultures of different organ origin. In: Plant Culture Media: Formulation and Uses. E.F. George, D.J.M. Puttock and H.J. George, Vol. 1, 1987
Plant Sci. Lett., 37
1984
page(s) 149-156

MARTIN C., CARRE M. ET DUC G.

Note sur les cultures de tissus de fève (Vicia faba L.). Bouturage, culture de cals, cultures de méritèmes. In : Plant Culture Media : Formulations and Uses . E.F. George, D.J.M. Puttock and H.J. George, Vol. 1, 1987
Ann. Amélior. Plantes, 29
1979
page(s) 277-287

MAYDELL, H.J. VON

Arbres et Arbustes du Sahel: Leurs caractéristiques et leurs utilisations

GTZ, version française, 1990

page(s) 120-123

MCCLELLAND, M.T.; SMITH, M.A.L. & CAROTHERS, Z.B.

The effects of in vitro and ex vitro root initiation on subsequent microcutting root quality in three woody plants

Plant Cell, Tissue and Organ Culture 23,
1990
page(s) 115-123

MISSION, J.P.; BOXUS, PH.; COUMANS, M.; GIOT_WIRGOT, P. & GASPAR, TH.

Rôle du charbon de bois dans les milieux de culture de tissus végétaux

Med. Fac. Landboum. Rijksuniv. Cent 48/4,
1983
page(s) 1151-1157

MOHAMMED, G.H. AND VIDAVER, W.D.

The Influence of Acclimatization Treatment and Plantlet Morphology on Early Greenhouse-Performance of Tissue- Cultured Douglas Fir <*Pseudotsuga-Menziesii* (Mirb) Franco>

Plant Cell Tissue and Organ Culture 21: 2
may 1990
page(s) 111-117

MONCOUSIN C.

Contribution à la caractérisation biochimique et physiologique de la phase juvénile de l'artichaut (*Cynara scolymus* L.) au cours de sa multiplication végétative conforme et accélérée en culture in vitro

Thèse Université Paris-Sud ORSAY
1982
page(s) 202

MONCOUSIN C., GASPAR TH.

Peroxydase as a Markers for rooting improvement of *Cynara scolymus* L., cultured in vitro

Biochem. Physiol. Pflanzen, 178
1983
page(s) 263-271

MONTEUUIS, O. ET BON, M.C.

Microbouturage du séquoia géant

Annales Afocell,
1985
page(s) 50-87

MUKHOPADHYAY, A. & MOHAN, R.H.Y.

Regeneration of Plantlets from Excised Root of *Dalbergia sissoo*.

Indian Journal of Experimental Biology, vol.19,
december 1981
page(s) 1113-1115

MURASHIGE T. ET SKOOG F.

A revised medium of rapid growth and essays within tobacco tissue culture.

Physiol. Plant, 15
1962
page(s) 473-497

NAKANO M., YUDA E., NAKAGAMA S.

Studies on rooting of the hardwood cuttings of grapevine cultivar. Delaware II. Hormonal changes in the cuttings.

J. Jap. Soc. Hortic. Sci., 48
1980
page(s) 385-394

NITSCH J.P. ET NITSCH C.

Néoformation de fleurs in vitro chez une espèce de jours courts :
Plumbago indica.

Ann. Physiol. Vég., 7
1965
page(s) 251-256

NONGONIERMA, A.

Contribution to a biosystematic study of the genus *Acacia* Miller in
West Africa. II. Features of the inflorescences and flowers stems

Bulletin de l'IFAN Série A, 38 (3)
1976
page(s) 487-657

OSSOR, A. ET BOXUS, PH.

Des agglomérats de dômes méritématiques: une nouvelle alternative
dans la multiplication clonale d'*Eucalyptus camaldulensis*

Annales Afocel (Association Forêt Cellulose),
1992
page(s) 203-207

PATTABHI, V.

Plant growth regulators, their structure and interactions.

Current Science, Vol.59, n°23 10
décembre 1990
page(s) 1228-1235

PHUKAN, M.K. AND MITRA, G.C.

Nutrient Requirements for Growth and Multiplication of Tea Plants
In vitro

Bangladesh Journal of Botany 19: 1
jun 1990
page(s) 65-71

QUOIRIN M., BOXUS P., GASPARD TH.

Root initiation and isoperoxidases of stem tip cuttings from mature
Prunus plants

Physiol. Veg., 12 (2)
1980
page(s) 165-174

REKOSLAVSKAYA N.I. AND GAMBURG K.Z.

On the biological activity of AIA conjugates.

Biochem. Physiol. Pflanz., 169
1976
page(s) 299-303

ROBBINS W.J. AND MANEVAL W.E.

Further experiments on growth of excised root tips under sterile conditions

In: Plant Culture Media: Formulations and uses. E.F. George, D.J.M. Puttock and H.J. George, Vol. 1, 1987
page(s) 274-287

SALLANON, H. AND COUDRET, A.

Water Fluxes Between In vitro Plants and Atmosphere in Micropropagation

Comptes Rendus de l Academie Des Sciences Serie III-Sciences de la Vie 310: 12 (JUN 7 1990)
page(s) 607-613

SALLANON, H. ET COUDRET, A.

Flux d'eau entre vitroplants et atmosphère en micropropagation

C.R. Acad. Sci. Paris, t.310, Série III,
1990
page(s) 607-613

SAVAVITZ, C.H.; BLAZICH, F.A. AND AMERSON, H.V.

In Vitro Rooting of Hypocotyl Cuttings of Fraser Fir .

HortScience 25 (12),
1990
page(s) 1650-1651

SCANDALIOS J.G.

Isozymes in development and differentiation

Ann. Rev. Plant. Physiol., 25
1974
page(s) 225-258

SKOLMEN R.G. ET MAPES M.O.

Acacia Koa gray plantlets from somatic callus tissue.

The journal of heredity, 67
1976
page(s) 114-115

SKOOG F. AND MILLER C.O.

Chemical regulation of growth and organic formation in plant tissues
cultured in vitro

J. Exp. Bot., 11
1957
page(s) 118-131

SMITH, M.A.L. AND MCCLELLAND, M.T.

Gauging the Influence of in vitro Conditions on in vivo Quality and
Performance of Woody Plants.

In Vitro Cell. Dev. Biol. 27 P:
april 1991
page(s) 52-56

SMITH, M.A.L.; SPOMER, L.A. & MCCLELLAND

Direct analysis of root zone data in a microculture system

Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 23,
april 1990
page(s) 21-26

SMITH D.R., THORPE T.A.

Root initiation in cuttings of Pinus raddiata seedlings. I. Develop
mental sequence.

J. Exp. Bot., 26 (91)
1975 a
page(s) 184-192

SMITH D.R. AND THORPE T.A.

Root initiation in cuttings of Pinus raddiata seedlings. II. Growth
regulator interaction.

J. Exp. Bot., 26 (91)
1975 b
page(s) 193-202

SKOLMEN R.G. ET MAPES M.O.

Acacia Koa gray plantlets from somatic callus tissue.

The journal of heredity, 67
1976
page(s) 114-115

SKOOG F. AND MILLER C.O.

Chemical regulation of growth and organic formation in plant tissues
cultured in vitro

J. Exp. Bot., 11
1957
page(s) 118-131

SMITH, M.A.L. AND MCCLELLAND, M.T.

Gauging the Influence of in vitro Conditions on in vivo Quality and
Performance of Woody Plants.

In Vitro Cell. Dev. Biol. 27 P:
april 1991
page(s) 52-56

SMITH, M.A.L.; SPOMER, L.A. & MCCLELLAND

Direct analysis of root zone data in a microculture system

Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 23,
april 1990
page(s) 21-26

SMITH D.R., THORPE T.A.

Root initiation in cuttings of Pinus raddiata seedlings. I. Develop
mental sequence.

J. Exp. Bot., 26 (91)
1975 a
page(s) 184-192

SMITH D.R. AND THORPE T.A.

Root initiation in cuttings of Pinus raddiata seedlings. II. Growth
regulator interaction.

J. Exp. Bot., 26 (91)
1975 b
page(s) 193-202

SRISKANDARAJAH, S.; SKIRVIN, R.M.AND ABUQAUD, H.

The Effect of Some Macronutrients on Adventitious Root Development
on Scion Apple Cultivars In vitro

Plant Cell Tissue and Organ Culture 21: 2
may 1990
page(s) 185-189

STROOBANTS, C.; SOSSOUNTZOV, L. ET MIGINIAC, E.

Immunocyto-localisation du riboside de la Zéatine dans des feuilles
de Tabac isolées et buturées, au cours des phases initiales de la
Rhizogénèse.

C.R. Acad. Sci. Paris, t.312, SérieIII n°6, 14
mars 1991
page(s) 261-267

THOMASZESWSKI M., THIMANN K.V.

Interaction of phenolic acids, metallic ions and chelating agents
on auxin induced growth

Plant Physiol, 41
1966
page(s) 1443-1454

THORPE, T. A. AND HARRY, I. S.

Special problems and prospects in the propagation of woody species

Plant Aging :Basic and Applied Approaches.Edited by R. Rodriguez
et al. Plenum, New York, 1990
page(s) 67-74

THORPE, T.A.; HARRY, I.S. AND KUMAR, P.P.

Application of micropropagation to forestry

P.C. Debergh and R.H. Zimmerman(eds), Micropropagation,
1991
page(s) 311-336

VIETEZ E. AND VIETEZ A.M.

Juvenility factors related to the rootability of chestnut cuttings

Acta Hortic, 56
1976
page(s) 269-274

WANG, Q.

Factors affecting rooting of microcuttings of the pear rootstock
BP 10030

Scientia Horticulturae, 45,
1991
page(s) 209-213

WEIGEL U. AND HORN B.

Endogenous auxin levels in terminal stem cuttings of Chrysanthemum
morifolium during adventitious rooting.

Physiol. Plant., 61
1984
page(s) 422-428

WHITE P.R.

Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid
medium. In: Plant Culture Media: Formulations and Uses. E.F. George
D.J.M. Puttock and H.J. George, Vol. 1, 1987

PLant Physiol., 9
1934 a
page(s) 585-600

ZOK, S.

La multiplication végétative in vitro des caféiers cultivés par
culture de méristèmes et d'apex

ASIC, 11ème Colloque, Lomé,
1985
page(s) 461-473

RESUME

TITRE : Clonage d'*Acacia raddiana* (SAVI.) :
Régénération à partir de jeunes racines excisées.
Etude des facteurs de l'enracinement *in vitro*.

Nom du candidat : Djibril SANE

Nature du mémoire : Diplôme d'Etudes Approfondies de Biologie Végétale.

Composition du jury :
- M. Amadou Tidiane BA, Professeur titulaire
- M. Alain BORGEL, Chargé de Recherche ORSTOM
- M. Jean-Marc LEBLANC, Chargé de Recherche ORSTOM
- Mme Yaye Kene GASSAMA-DIA, Maître - assistante
- M. Nicolas DIALLO, Maître - assistant

Soutenu le 10 juin 1994 à 9 heures au Département de Biologie Végétale (UCAD).

La lutte contre la dégradation progressive des systèmes agro-sylvo-pastoraux, en zones arides et semis-arides, doit passer par la réussite de vastes programmes de reforestation. Il apparaît donc urgent de disposer de plantes ligneuses adaptées aux conditions écologiques de ces zones. Parmi celles-ci figurent en première place les légumineuses arborescentes et en particulier les acacias sahéliens. *Acacia raddiana* (Savi.) est une espèce à fonction multiple qui répond parfaitement à ces critères et de ce fait doit occuper une place de choix dans les programmes de sélection et d'amélioration génétique de ces végétaux. Le travail présenté est une recherche de conditions optimales pour produire de clones de cette espèce par la multiplication végétative conforme *in vitro*. Il comprend deux volets : 1) Tentative de néoformation de tiges *in vitro* à partir des segments de racines, (cette espèce ne drageonne pas naturellement). *Acacia albida* (Del.) a été utilisé comme témoin. Les traitements appliqués, sur un total de 6480 explants, n'ont pas fait drageonner *Acacia raddiana*. Cependant des boursouflures chlorophylliennes, montrant une certaine organisation des tissus racinaires, ont été obtenues à l'obscurité en présence de spermidine. En revanche chez *Acacia albida*, les résultats analysés mettent en évidence deux faits essentiels: d'un côté, une influence très significative, sur la néoformation des bourgeons, de l'âge des explants racinaires; de l'autre, un effet également très significatif des conditions de l'environnement physique, montrant l'importance de la lumière sur la régénération. 2) Détermination des meilleures conditions d'enracinement des vitroplants de deuxième subculture d'*Acacia raddiana*. L'analyse des résultats a permis de dégager les points suivants: a) l'enracinement *in vitro* de l'*Acacia raddiana* nécessite d'abord un milieu contenant une auxine ou une combinaison auxine-cytokinine puis un milieu sans auxine ; b) le milieu WPM est le meilleur milieu minéral pour l'enracinement des microboutures ; c) l'ANA et l'AIB ont une action spécifique sur la rhizogénèse ; d) la grosseur du cal basal favorise la prolifération des racines mais inhibe la caulogénèse.

Mots clés: Zones arides; Reforestation; Légumineuses arborescentes; *Acacia raddiana*; Microboutures; Explants racinaires; Subculture; Multiplication végétative conforme; *In vitro*; Clone; Néoformation; Drageons; Auxine; Cytokinine; Spermidine; Cal basal; Acclimatation.