

**UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES**



THESE DE DOCTORAT D'ETAT ès SCIENCES NATURELLES

TITRE

**ETUDE DES VOIES D'AMELIORATION GENETIQUE PAR LA BIOLOGIE DE LA
REPRODUCTION, LES POTENTIALITES DE CLONAGE *IN VITRO* ET LA
SYMBIOSE FIXATRICE D'AZOTE CHEZ *ACACIA ALBIDA* (DEL.) A. CHEV.**

Présentée et soutenue publiquement le 14 février 1996 par
Mme Gassama-Dia Yaye Kène

MAITRE –ASSISTANTE A LA FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

Pour obtenir le grade de Docteur d'état ès Sciences Naturelles

Membres du jury :

Président :	Dr Amadou Tidiane BA	Professeur Titulaire
Rapporteur	Dr Mékinto Batcho	Maître de conférences
Rapporteur	Dr Bernard DREYFUS	Directeur de Recherches
Rapporteur	Dr Emile DUHOUIX	Professeur Titulaire
Examineur	Dr Antoine Nongonierma	Professeur Titulaire
Examineur	Dr Mouhamadou L. THIAM	Professeur Titulaire

Titre :

ETUDE DES VOIES D'AMELIORATION GENETIQUE PAR LA BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION, LES POTENTIALITES DE CLONAGE *IN VITRO* ET LA SYMBIOSE FIXATRICE D'AZOTE CHEZ *ACACIA ALBIDA* (DEL.) A. CHEV.

Nom : GASSAMA-DIA

Prénoms : Yaye Kène

Nature du Mémoire : THESE DE DOCTORAT D'ETAT ès SCIENCES NATURELLES de l' UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

Résumé

L'objectif principal de ce travail est axé sur l'exploration des voies d'amélioration génétique chez *Acacia albida*. Trois pistes de recherche ont été identifiées.

- 1) En étudiant la biologie de la reproduction, nous nous sommes intéressés à la phénologie et au système de pollinisation : l'ouverture asynchrone et acropète des fleurs, l'agrégation des monades en une polyade unique, le nombre élevé de polyades émis au cours d'un seul événement pollinatoire, le rapport monade sur ovule (1.5) excédentaire en faveur des grains de pollen, la possibilité pour un stigmate de recevoir simultanément 2 à 3 polyades, démontrent l'effort fourni par la plante pour assurer une pollinisation et une fécondation optimales. Grâce aux marqueurs enzymatiques (estérase), nous avons déterminé l'optimum de réceptivité stigmatique et la durée de viabilité des grains de pollen chez *Acacia albida*. Par des essais de pollinisation contrôlée, nous avons réussi à estimer quantitativement le niveau d'auto-incompatibilité : l'index d'auto-incompatibilité (ISI) de 0.25, indique qu'*Acacia albida* est une espèce auto-incompatible bien qu'il existe au niveau individuel une auto-compatibilité partielle.
- 2) La multiplication végétative a été effectuée sur les arbres adultes et a montré que le potentiel morphogène est tributaire de la saison, de la nature du matériel végétal, de l'état de maturité du végétal et de paramètres physiologiques non encore identifiés. Cependant l'activité organogène des drageons issus de sujets adultes peut être améliorée par des repiquages fréquents à la suite de l'addition de Phloroglucinol (1g/l) dans le milieu de culture ou après un trempage dans une solution de BAP (20mg/l) pendant 15 heures. L'optimum d'enracinement obtenu à la suite du traitement au Phloroglucinol est de 50%. La culture d'explants racinaires est une méthode très efficace qui a permis chez *Acacia albida* de régénérer directement à partir du cortex racinaire des bourgeons adventifs. Nous avons montré que le milieu B5 additionné de Spermine 10^{-5} M stimule de façon optimale la néoformation des bourgeons.
- 3) L'étude de la symbiose fixatrice d'azote atmosphérique a montré que la richesse du substrat en éléments nutritifs constitue un facteur décisif dans la réponse à l'inoculation. *Acacia albida* est une espèce qui préfère assimiler les éléments nutritifs du sol plutôt que de recourir à la symbiose. Des études menées *in vitro* sur la nutrition minérale azotée ont montré cependant que la biomasse et la croissance sont améliorées en présence d'une source d'azote ammoniacquée (5mM).
Par ailleurs, *Acacia albida* est une espèce nodulée aussi bien par les souches de *Bradyrhizobium* que par les souches de *Rhizobium* : cependant l'association avec les souches de *Bradyrhizobium* est plus efficace. Les cotylédons, grâce à leur forte teneur en azote, jouent un rôle d'azote starter en stimulant la croissance et la nodulation. L'infection rhizobienne s'effectue via les poils absorbants.

Mots-clés : *Acacia albida*- phénologie- pollinisation- auto-incompatibilité – *in vitro* micropropagation – arbres adultes – racines excisées – symbiose – *Bradyrhizobium* – infection.

Summary

The main objective of this work is based on investigation of genetical ways to improve *Acacia albida*. Three research areas have been identified

- 1- When studying its reproductive biology, we examined the phenology and pollination; the flowers open asynchronously and acropetally; monads are aggregated to form a unique polyade; during one pollination event, a great number of polyades are ejected; the ratio monad/ovule (1.5) are in excess for pollen grains and one stigma can receive simultaneously 2 to 3 polyads. All these factors contribute to the reproductive effort and ensure an optimal pollination. Using biochemical markers (esterases), we determined the optimal period of stigma receptivity and the viability period of pollen grains. So we successfully determined the level of self-incompatibility (0.25) with an individual rate of variability from 0 to 0.5.
- 2- In vitro micropropagation has been achieved on mature trees; the results showed that the morphogenetic potential is influenced by the season, by the origin of the explant and by some tree physiological parameters not identified. Nevertheless, the organogenetic activity of the explants from stump sprouts can be improved with frequent subcultures or after addition of phloroglucinol (1g/l) in the culture medium or after deeping explants in a solution of BAP (20mg/l) during 15 hours. The optimal rooting rate (50%) is obtained after treatment with phloroglucinol. Root excised culture is a more efficient method; it allows to regenerate directly from cortical tissues numerous adventitious buds. B5 medium with BAP and spermin (10^{-5} M) is the best medium for stimulating adventitious budding.
- 3- The study of nitrogen fixation symbiosis reveals that soil fertility is a determinant factor in response to inoculation. *Acacia albida* prefers nitrogen assimilation rather than nitrogen fixation. Meanwhile, the study of in vitro nitrogen nutrition of shoot explants, shows that biomass and growth are improved in presence of 5mM Ammonium. Rhizobium as well as *Bradyrhizobium* are infective on roots of *A. albida* and produce nodules. But the association with *Bradyrhizobium* is more efficient. The cotyledons, containing a great amount of nitrogen, play the role of "nitrogen stater" stimulating growth and nodulation. The infection process via root hairs.

Key-words: *Acacia albida* – phenology – pollination – self-incompatibility – in vitro micropropagation – mature tree – root culture – symbiosis – *Bradyrhizobium* – infection.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au département de biologie végétale, de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar. J'exprime ma profonde reconnaissance à toutes les personnes qui m'ont permis de mener à bien ce travail.

A Monsieur le Professeur Libasse Diop Doyen de la Faculté des Sciences et Techniques qui m'a toujours témoigné de son soutien. Vous m'avez offert, Monsieur le Doyen, la possibilité de terminer ce travail dans d'excellentes conditions. Je vous remercie pour votre appui moral et financier.

A Monsieur le Professeur Amadou Tidjane Ba, vous m'avez montré la voie, Monsieur le Professeur, en me faisant partager vos remarquables qualités d'enseignant; j'ai appris avec vous que l'enseignement est un art qu'il faut savoir aimer et partager. Je vous serai toujours reconnaissante de m'avoir manifesté votre entière disponibilité, d'avoir toujours répondu favorablement à mes nombreuses sollicitations malgré les lourdes et innombrables charges qui pèsent sur vous; vos critiques, suggestions et observations m'ont permis d'améliorer la qualité de ce document. Je tiens à vous exprimer ma profonde gratitude pour avoir accepté de présider ce jury de thèse.

A Monsieur le Professeur Emile Duhoux, vous avez dirigé ma thèse ici à Dakar et au BSFT de Nogent sur Marne (France). Je vous serai toujours reconnaissante pour vos ~~avis~~ **avis** indispensables et vos conseils éclairés et pour votre disponibilité. Vous m'avez fait bénéficier de vos connaissances et de votre immense expérience scientifique, de votre sens pédagogique et de votre rigueur dans le travail. Vos critiques, suggestions et conseils m'ont accompagnée durant toute la longue période d'élaboration de ce document ; vous avez toujours répondu à mes nombreuses sollicitations malgré vos nombreuses responsabilités administratives et scientifiques au BSFT et à l'Université Paris VII. Je voudrai vous dire aussi que j'ai eu grand plaisir à travailler sous votre direction et je souhaite vivement avoir de nombreuses et fructueuses collaborations dans le futur.

A Monsieur le Professeur Antoine Nongonierma, je vous remercie de m'avoir fait bénéficier de votre profonde sagesse et de votre immense expérience. En acceptant de juger ce travail, veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance et mon profond respect. Soyez assuré de ma profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur Mouhamadou Lamine Thiam pour sa confiance et sa sympathie. Je vous serai toujours reconnaissante de vos témoignages de confiance qui nous ont été d'un grand réconfort. Veuillez trouver ici l'expression de notre profond respect, de notre grande estime et de nos remerciements sincères pour avoir accepté de juger ce travail.

A Monsieur Bernard Dreyfus Directeur de Recherches à l'ORSTOM, je tiens à vous témoigner toute ma reconnaissance pour votre bienveillante générosité, votre confiance et votre soutien constants et infaillibles. Vos encouragements et votre disponibilité m'ont été d'un grand apport. Je me sens très honorée que vous ayez accepté de juger ce travail et d'en être le rapporteur.

A Monsieur Mékinto Batcho Maître de Conférences, je vous suis particulièrement reconnaissante de l'intérêt que vous avez toujours manifesté pour ce travail. Je tiens à vous témoigner toute ma gratitude pour l'aide inestimable que vous m'avez apportée lors de l'élaboration de ce document, pour vos conseils enrichissants, votre esprit critique et

pour les échanges scientifiques fructueux que nous avons pu avoir ensemble. Vous avez manifesté beaucoup d'enthousiasme dans la correction de ce document. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance pour avoir accepté d'être le rapporteur de cette thèse .

A Monsieur Ibra Niang Faye Secrétaire Général de la Faculté des Sciences et Techniques pour m'avoir assuré de son soutien moral de son amicale sympathie et pour toutes les facilités qu'il a bien voulu m'accorder dans le cadre de ce travail.

A tous mes amis et collègues du département de Biologie végétale

A tous mes amis et collègues de la Faculté des Sciences et Techniques

A tous mes amis et collègues de l'ISRA/DRPF et l'ISRA/CNRA de Bambey

A tous mes collègues du laboratoire de l'URCI et de Microbiologie de l'ORSTOM

A tous les étudiants que j'ai encadrés et envers qui, j'ai une pensée très affectueuse pour avoir partagé avec eux des moments intenses de travail acharné.

DEDICACES

A Allah , Dieu de clémence et de miséricorde, qui dans son infinie bonté m'a donné la force, la foi et le courage nécessaire pour achever ce travail.

A la mémoire de mon père Mamadou Gassama et de mon grand-père N'Gamedy N'Diaye, vous m'avez tant soutenu et encouragé, j'aurai tellement aimé que nous puissions partager ensemble ce moment d'aboutissement de tant d'efforts.

A mon maître spirituel, Cheikh Abdoulaye Dièye, vous m'avez guidé sur la voie du bien et de la foi en Dieu.

A ma mère pour tous les sacrifices consentis pour mon éducation

A mon mari qui m'a beaucoup soutenue

A mon fils adoré

A mes frères et sœurs

A toute ma famille

PLAN de l'ETUDE

	Pages
Chap. I) INTRODUCTION	8
Chap II) Objectifs de l'étude	12
A) Biologie de la reproduction chez <i>Acacia albida</i>	13
B) Micropropagation végétative chez <i>Acacia albida</i>	13
C) Symbiose fixatrice d'azote chez <i>Acacia albida</i>	15
Chap. III) ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	18
<u>A) Présentation de l'espèce</u>	19
1- Écologie	20
2- Position systématique	21
3- Variabilité	22
4- Importance de l'espèce	22
5- Phénologie	23
B) <u>Biologie de la reproduction</u>	
1- Variabilité taxonomique des Acaciae	25
2 -Organisation de la fleur des Mimosacées	25
3 -L'androcée	26
4 -Le gynécée	27
5 -Reproduction	28
6- Auto-incompatibilité	30
C) <u>Micropropagation végétative des arbres</u>	31
1- Micropropagation à partir de tissus adultes	33
2- Embryogénèse somatique	37
3- Régénération par culture de racines excisées	41
D) <u>-Symbiose fixatrice d'azote</u>	43
1- Fixation biologique de l'azote chez les ligneux	43
2 -Aptitude à fixer l'azote chez les ligneux	44
3 -Facteurs limitants susceptibles d'affecter le pouvoir fixateur d'azote chez les ligneux	45
4- Problèmes liés aux ligneux sahéliens	47
5- Influence du génotype de la plante	49
6- Infection bactérienne	50
6-1) Evénements à la surface de la cellule	50
6-2) Pénétration	51
a-1) Infection par poil absorbant	51
a-2) Infection par "crack entry"	52
a-3) Infection par poches inter-cellulaires	52
6-3) Développement du nodule	52
a-1) Nodule à croissance déterminée	53

a-2) Nodule à croissance indéterminée	53
7- Diversité taxonomique et spécificité des Rhizobium (s.l.)	53
7-1) Diversité taxonomique	54
7-2) Spécificité des souches de Rhizobium (s.l.)	55

Chap IV) Matériels et Méthodes

A) <u>Biologie de la reproduction chez <i>Acacia albida</i></u>	59
1- Situation géoclimatique de la région étudiée	
2- Localisation des arbres étudiés	
3- Etude phénologique et morphologique des organes floraux	
4- Etude de la stratégie reproductive chez <i>Acacia albida</i>	
4-1) Receptivité stigmatique	
4-2) Viabilité du pollen d' <i>Acacia albida</i>	
4-3) Pollinisation contrôlée	
B) <u>Micropropagation végétative chez <i>Acacia albida</i></u>	
1- Micropropagation par bourgeonnement axillaire	63
2- Embryogénèse somatique	65
3- Culture de racines excisées	66
C) <u>ETUDE DE LA SYMBIOSE <i>Rhizobium</i>/ <i>Acacia albida</i></u>	67
1- Etude des paramètres de la fixation biologique de l'azote atmosphérique	68
1-1) Matériel végétal	68
1-2) Influence du substrat de culture	68
1-3) Influence de la nature de la souche	68
1-3-1) Dispositif en serre	68
1-3-2) Dispositif en tube de culture	69
1-4) Influence de l'ablation de l'apex racinaire	
1-5) Influence des réserves azotées cotylédonaire sur la croissance initiale et la fixation biologique de l'azote	
2) Paramètres mesurés	
2-1) Infectivité des souches	71
2-2) Effectivité des souches	71
3) Etude des premiers stades de l'infection par Bradyrhizobium	72

Chap.V RÉSULTATS

A) <u>Biologie de la reproduction</u>	74
1-Phénologie	75
2- Cartographie du rameau inflorescentiel	75
3- Dynamique de la floraison	75
4- Morphologie florale	76
5- Etude de la reproduction chez <i>A. albida</i>	78
5-1) Fructification	78

5-2) Réceptivité stigmatique	79
5-3) Qualité et viabilité du pollen	80
A) Test FCR	80
B) Germination "in vitro"	80
B-1) Optimisation des conditions de germination "in vitro"	
B-1-1)- Développement des tubes polliniques	81
B-1-2)- Influence de la composition minérale du milieu de culture	81
B-1-3)- Influence du saccharose	81
B-1-4)- Influence du pH	82
B-2) Test de viabilité par la capacité de germination "in vitro"	82
5-4) Pollinisation contrôlée	83
6-Discussions	
6-1) Phénologie et dynamique de la floraison	85
6-2) Structures reproductrices et stratégies reproductives	85
a)- Rapport monade /ovule	85
b)- Détermination du système de reproduction (autogamie ou allogamie) par les tests de pollinisation contrôlée	86
6-3) Effort reproductif et qualité du pollen	88
a) Effort reproductif	88
b) Réceptivité stigmatique	88
c) Qualité du pollen	89
B) <u>MULTIPLICATION VÉGÉTATIVE</u>	92
1- <u>Micropropagation par culture de nœuds axillaires</u>	92
1-1) Influence de la saison sur l'expression morphogène des explants	92
1-2) Influence de divers facteurs susceptibles d'améliorer la reprise de croissance du matériel végétal	92
1-2-1) Réduction de l'oxydation des polyphénols	92
1-2-2) Influence de la nature du matériel végétal	94
1-2-3) Influence du mode d'obturation des tubes	94
1-2-4) Influence du charbon actif	95
1-3) Influence de la composition des différents milieux de culture	95
1-3-1) comparaison de quatre milieux minéraux	95
- bourgeonnement axillaire	95
- Elongation et morphologie des pousses feuillées	96
1-3-2) Influence de la dilution du milieu de base M-S	97
1-3-3) Influence de la source azotée	97
1-4) Etude de facteurs susceptibles de prévenir l'abscission foliaire	100
1-4-1) Fréquence des transferts sur milieux neufs	100
1-4-2) Addition de substances organiques	101
1-5-) Multiplication	101
1-6) Enracinement	102
1-6-1) Influence du milieu de base	102
1-6-2) Influence de la nature et de la concentration en auxine	103
1-6-3) Influence de la pré-culture sur milieu enrichi en phloroglucinol	103

1-7) Conclusions et Discussions	105
A) Saison	105
B) Origine du matériel végétal	105
C) Réduction de l'oxydation des polyphénols par pré-trempage	106
D) Fréquence de repiquage	106
E) Milieux minéraux de base	107
F) Nutrition minérale et organique azotée	107
G) Abscission foliaire	109
H) Taux de multiplication	110
I) Enracinement	110
J) Phénomène de croissance épisodique	110
2- <u>Embryogénèse somatique</u>	113
2-1) Production de cal	113
2-1-1) Influence de l'AIA	113
2-1-2) Influence du 2-4D	113
2-1-3) Induction de l'embryogénèse somatique par addition de BAP	114
2-1-4) Influence de l'addition de l'hydrolysate de caséine et d'un mélange d'acides aminés	114
2-2) Histologie des cals obtenus	115
2-3) Discussions	116
3- <u>Culture de racines excisées</u>	118
3-1) Description de l'apparition des bourgeons végétatifs adventifs	118
3-2) Influence de la longueur ou de l'âge des explants	118
3-4) Influence du diamètre des explants	119
3-5) Influence du génotype	119
3-6) Influence de la composition du milieu de culture	119
3-7) Influence de diverses substances hormonales	120
3-7-1) Cytokinines et caulogénèse	120
3-7-2) Cytokinines et formation de racines latérales	121
3-8) Influence de substances à action cytokinique	121
3-8-1) Phényl-urée	121
3-8-2) Polyamines	121
3-9) Efficacité relative des diverses substances à action cytokinique	122
3-10) Maintien du pouvoir caulogène	123
3-11) Enracinement des pousses obtenues par culture de racines excisées	123
3-12) Histologie des bourgeons adventifs	123
3-13) Acclimatation	124
3-14) Discussions	125
a) Age et origine des tissus racinaires	125
b) Milieux et conditions de culture	125
c) Plasticité et conformité morphogénétique	127
D) <u>Etude de la symbiose fixatrice d'azote atmosphérique</u>	130
1- <u>Influence du substrat</u>	130
(A- Croissance et morphogénèse	130
(B- Nodulation	130
(C- Teneur en éléments nutritifs du substrat	130
(D- Discussions	131

2- <u>Influence de l'inoculation avec différentes souches de Rhizobium (s.l.)</u>	133
2-1) Expérience menée en serre	133
A) Croissance et biomasse	133
B) ARA et SARA	133
C) Azote total de la plante	134
D) Corrélation entre les différents paramètres mesurés	134
2-2) Etude de l'effectivité des souches en tubes de culture	134
A) Efficacité des souches	135
B) Cinétique de la nodulation en présence de différentes souches	136
2-3) Influence de la date de l'inoculation	136
2-4) Discussions	136
A) Spécificité de l'association Rhizobium(s.l.) / <i>A. albidia</i>	136
B) Activité fixatrice d'azote	139
C) Date de l'inoculation	139
3- <u>Influence de la morphologie du système racinaire</u>	140
3-1) Expérience menée en serre	141
3-2) Expérience menée en tube de culture	141
a-1- Efficacité nodulaire	141
a-2) Cinétique de la formation des nodules "in vitro"	141
3-3) Discussions	142
4- <u>Influence des réserves cotylédonaire sur la croissance et la fixation d'azote</u>	143
4-1) Paramètres de croissance	143
4-2) Quantité d'azote fixée	144
4-3) Azote total des plantes	144
4-4) Discussions	145
5) <u>Observation des premiers stades de l'infection racinaire et formation du nodule</u>	148
5-1) Infection racinaire et évolution du nodule	
5-2) Discussions	
Chap VI) CONSIDERATIONS GENERALES	152
Chap VII) BIBLIOGRAPHIE	158
Chap VIII) ANNEXES	178

INTRODUCTION

Acacia albida encore appelée *Faidherbia albida* est une espèce de légumineuse arborée bien connue par la plupart des acteurs du développement et des scientifiques de la zone sahélienne. Son impact sur la fertilité du sol et sur la nutrition du bétail ont été bien étudiés (Charreau et Vidal (1965), Dancette et Poulain (1968), Fall (1978), Cissé et Koné (1992)).

En dépit de son intérêt évident, les parcs à *A. albida* sont, depuis plus de 30 ans, en déclin croissant dans le bassin arachidier au Sénégal. Les peuplements d'*Acacia albida* sont très âgés, les houppiers sont très lâches à cause de l'émondage fréquent et des tailles intensives (Dancette et Niang, 1979) entraînant un appauvrissement des sols et une baisse de productivité (Mc Gahuey, 1992).

Au Burkina Faso également on a noté la disparition des parcs à *A. albida* entre les fleuves Nakambé et Nazinou à l'Ouest et au Nord de Bobo-Dioulasso (Hervouet, 1992); ce même phénomène a été rapporté au Niger (Torrekens et al., 1992), au Cameroun (Harmand et N'Djiti, 1992) ainsi que dans le Djebel Mara au Soudan (Miehe, 1986).

En fait, l'absence d'une politique de gestion appropriée de protection des jeunes arbres ou d'afforestation, a entraîné une raréfaction progressive des pieds; avec l'impact de la longue période de sécheresse, les seuls sujets que l'on rencontre sont des sujets très âgés qui ont été sévèrement émondés dont la taille de la cime se réduit au fil des ans.

Lorsqu'on observe les parcs à *A. albida*, on est frappé de constater que la régénération naturelle par les jeunes sujets est pratiquement absente; les prévisions pour les années à venir sont très alarmantes si aucune action n'est tentée en vue de remédier à cette situation, car la mort de ces sujets âgés laissera un sol complètement dénudé et totalement improductif.

Face à ce problème, et grâce à l'appui des projets nationaux de reboisement (ex au Sénégal : le PREVINOBA, le PRECOBA et le Projet agroforestier du Senegal) et des ONG, les paysans sont de plus en plus sensibilisés à la nécessité de mener des actions en vue de la reconstitution du couvert végétal. Par des systèmes d'incitation, ils sont encouragés à protéger les jeunes plants contre les feux de brousse, ou la dent du bétail et à favoriser leur régénération naturelle (Baumer, 1988).

De plus les paysans réalisent de façon plus aigüe la nécessité d'intensifier en quelque sorte les cultures ; cependant, la trilogie "variétés à haut rendement-engrais-pesticides " n'est plus une solution adaptée à nos agro-systèmes fragiles où les revenus sont excessivement faibles et où l'absence d'une politique de subvention rend l'achat des facteurs de production difficiles à supporter par les paysans eux-mêmes (Le Tacon, 1989).

Fort heureusement, depuis une quinzaine d'années, on note un intérêt grandissant et manifeste aussi bien des autorités, des ONG que des associations villageoises, pour la

réhabilitation des pratiques agro-forestières seules capables de promouvoir une agriculture durable en intégrant les espèces forestières à usages multiples qui constituent une ressource considérable et contribuent à maintenir et à restaurer la fertilité des sols.

La prise de conscience de la nécessité de mener des recherches en agroforesterie utilisant des espèces particulièrement adaptées aux conditions pédo-climatiques difficiles telles que *Acacia albida*, *A. senegal*, *A. raddiana*, *Prosopis juliflora*, *P. africana* etc..., a eu comme conséquence la mise en place de vastes programmes agroforestiers. Ces programmes, menés au sein de différents instituts de recherche de la plupart des pays africains, visent essentiellement à définir des systèmes arbres-cultures, compatibles et complémentaires susceptibles de stabiliser et d'améliorer l'environnement tout en favorisant une production alimentaire et en bois suffisante.

Parmi les différents systèmes identifiés, l'association *A. albida* - céréales, en raison de son impact à long terme sur la productivité du sol et l'alimentation du bétail, a été sérieusement envisagée comme une alternative pour promouvoir un développement agricole durable.

Il demeure incontestable que cette espèce joue un rôle socio-économique important pour nos populations rurales et pour la communauté scientifique, un défi à relever. Les chercheurs s'intéressent de plus en plus à l'étude des conditions d'amélioration génétique des potentialités de cette espèce ainsi que l'adaptation des pratiques sylvicoles dans un environnement sahélien particulièrement difficile, pour arriver à maintenir et à étendre l'arbre dans son écosystème naturel.

C'est ce qui justifie l'intérêt de nombreux organismes tels que la FAO (Palmborg, 1986), la CEE (Joly, 1988) qui ont initié et encouragé des programmes d'évaluation de conservation et d'amélioration des ressources génétiques chez *A. albida*, de même que des instituts de recherche nationaux et internationaux (ORSTOM, CTFT-CIRAD, ICRISAT, IITA, ICRAF, ILCA) travaillant activement sur la physiologie, la génétique, l'écologie, la sylviculture de cette espèce.

En matière d'amélioration des espèces forestières la stratégie repose sur trois principes fondamentaux (Libby, 1973; Haines,1992):

1) la base génétique : identification des populations et des individus et détermination de la variabilité génétique de l'espèce.

2) la biologie de la reproduction : la connaissance complète d'une espèce requiert des données sur son système de reproduction (allogamie ou autogamie), la pollinisation (écologie de la pollinisation) et du mode de dispersion des graines ; ainsi la structure génétique de la population en question est étroitement dépendante de ces trois facteurs qui sont liés et évoluent ensemble (Nikles,1992).

3) les méthodes de production : les méthodes adoptées sont étroitement liées aux objectifs de production que s'est assignés l'améliorateur, aux limites de son environnement naturel et aux contraintes de nature socio-économique.

A partir de ces données, on tend à prendre en considération dans les stratégies d'amélioration, trois niveaux hiérarchiques au sein des populations forestières :

1) la population de base qui constitue la base des ressources génétiques d'une espèce. Cette population doit être gérée de façon idéale pour conserver sa diversité; c'est à ce niveau qu'interviennent les études génétiques sur la structure des populations, sa diversité, les méthodes de conservation au niveau de banques de gènes

2) la population de croisements : qui est gérée de manière extensive à long terme au niveau de verger à graines

3) la population de propagation qui est sélectionnée et gérée de manière intensive de façon à produire dans un délai relativement court des clones à haute performance .

Le matériel forestier est un matériel encore sauvage différant beaucoup des espèces agricoles progressivement transformées par plusieurs générations de sélections; ainsi l'étendue de la variabilité génétique n'est que partiellement connue et les potentialités recèle l'espèce ne sont pas encore totalement explorées .

Nos travaux s'intègrent dans un schéma global d'amélioration forestière tel qu'il est défini ci-dessus, et nous nous sommes ainsi attachés à intervenir sous trois aspects essentiels:

1) En étudiant la biologie de la reproduction chez *Acacia albida*, nous avons cherché comprendre la stratégie développée par l'espèce pour se reproduire, en déterminer les modes de floraison et de fécondation de manière à pouvoir mettre l'accent sur les facteurs limitants de la production de semences au niveau des peuplements naturels.

2) D'autre part, le matériel forestier est caractérisé par une maturité sexuelle tardive (10 à 20 ans selon les espèces) ce qui allonge les cycles de sélection, dans un milieu naturel présentant une grande variabilité. Par conséquent les voies d'approche que nous avons à choisir devront être rapides, évolutives et souples permettant d'obtenir des gains maximum en un temps relativement court (1 à 2 générations). La propagation végétative

constitue une alternative intéressante pour capturer rapidement un gain génétique à partir d'une population sélectionnée ; c'est ainsi que dans le cadre de ce travail, nous avons utilisé l'outil "biotechnologie" pour définir les conditions optimales et les limites de la régénération "in vitro" de sujets adultes et d'individus juvéniles chez *Acacia albida* .

3) L'association avec des souches de *Rhizobium* fixatrices d'azote constitue un élément important pour augmenter les performances individuelles et pour une meilleure adaptation aux conditions pédo-climatiques défavorables du Sahel.

Notre objectif à l'issue de ce travail de recherche est de pouvoir définir des voies d'approche méthodologiques pouvant d'une part contribuer à la conservation et à l'amélioration des ressources génétiques et d'autre part, conduire à une meilleure maîtrise du potentiel génétique d'*Acacia albida*.

OBJECTIFS

A) BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION

Il apparait que de nombreuses études ont été menées sur les systèmes de reproduction d'espèces africaines, asiatiques et australiennes d'*Acacia*. Cependant chez *Acacia albida* hormis l'étude effectuée par Guinet (1969), Wickens, (1969) et Tybirk et Jorgensen (1991), il existe peu d'informations détaillées relatives à la biologie de sa reproduction.

Les stratégies d'amélioration développées au Sénégal sur les espèces d'*Acacia*, en dehors de la propagation végétative, sont essentiellement basées sur des tests de provenances et des tests de descendance (plein frères, demi-frères) en vue de la mise en place de vergers à graines pour la production de semences de qualité.

Il nous est apparu nécessaire de mieux cerner la stratégie mise en oeuvre par l'espèce pour se propager dans son environnement; en étudiant le type de comportement vis à vis des insectes pollinisateurs et le système de reproduction (allogamie ou autogamie), nous nous proposons d'apporter des éclaircissements sur la biologie de la reproduction chez *A. albida*.

En effet, au sein des populations naturelles, la plupart des espèces d'*Acacia* sont auto-incompatibles ce qui favorise un niveau élevé d'hétérozygotie. Ce type de reproduction à prédominance allogame dans un système panmictique est favorisé en raison de la supériorité des combinaisons hétérozygotes ou des hybrides dans un environnement naturel très sélectif. Mais il existe divers degrés d'auto-incompatibilité ; *A. albida* est suspectée d'avoir un mécanisme d'auto-incompatibilité, nous nous proposons au cours de ce travail de déterminer le niveau d'allogamie chez cette espèce.

'estimation quantitative du niveau d'auto-incompatibilité reposant sur la possibilité de mettre en place un protocole de fécondation contrôlée, nécessite au préalable des informations relatives d'une part à la période de réceptivité stigmatique et d'autre part à la qualité du pollen utilisé.

En effet, en l'absence de traitement conservateur, le pollen d'*Acacia* présente une viabilité limitée dans le temps. Il apparait dès lors indispensable de pouvoir définir, grâce à des tests de viabilité rapides et fiables, les limites de la viabilité du pollen d'*A. albida* de façon à éviter une perte de temps qui résulterait de l'utilisation de pollen non viable au cours des croisements contrôlés.

Par conséquent il apparait vital de réunir des informations nécessaires et adéquates sur la biologie de la reproduction chez *A. albida* afin d'une part, choisir et de développer la stratégie d'amélioration la mieux adaptée et d'autre part d'identifier les facteurs susceptibles de limiter la production de semences au niveau des peuplements naturels.

B) MICROPROPAGATION VÉGÉTATIVE CHEZ ACACIA ALBIDA

Chez les ligneux forestiers les voies les plus utilisées en vue de la propagation en masse, concernent la régénération par bourgeons terminaux et axillaires (par culture de

nœuds, d'apex et de méristèmes) par induction de bourgeons adventifs sur des organes différenciés et destinés vers un autre type de morphogénèse ou par formation d'embryons somatiques. Les deux premières voies (caulogénèse à partir d'organes pré-existants et caulogénèse adventive) sont les plus fréquemment suivies puisqu'elles sont très fructueuses. La 3^{ème} voie par embryogénèse somatique, si elle réussit, permet de maximiser le taux de multiplication ; elle est cependant la moins utilisée car de nombreuses espèces sont récalcitrantes à cette technique.

Le développement d'un système de propagation clonale chez *A. albida* doit être considéré sous l'angle global de l'amélioration des techniques de macro-propagation ; en effet chez *A. albida*, le bouturage classique de sujets adultes pose encore de nombreuses difficultés liées au choix du matériel à bouturer, à l'époque de prélèvement, et au faible taux d'enracinement obtenu (21%) (Danthu, 1992). Cette méthode est lente et nécessite beaucoup de temps (120 jours en moyenne pour obtenir des boutures racinées).

Le but principal de notre travail est d'établir un système reproductible et efficace de régénération de génotypes d'*A. albida*. Au cours de notre étude nous avons cherché à définir un protocole permettant :

- d'induire rapidement une organogénèse à partir de tissus partiellement rajeunis prélevés sur des arbres matures et de déterminer les limites de la micropropagation
- d'étudier les conditions optimales de régénération "in vitro" d'embryons somatiques à partir de jeunes tissus
- d'examiner les facteurs responsables de la réponse organogène des explants d'*Acacia albida* prélevés sur de jeunes racines et de définir les conditions nécessaires à une bonne reproductibilité de la régénération "in vitro".

Ces clones obtenus devront constituer le point de départ d'une propagation par voie traditionnelle et classique de génotypes sélectionnés.

La mise au point de ces techniques permettra d'établir des programmes d'amélioration génétique qui combinent la sélection classique par croisements contrôlés au sein de populations sélectionnées et la propagation par voie végétative de génotypes performants issus de ces croisements. Ces individus pourront être sélectionnés sur la base de critères bien définis (ex : production fourragère, aptitude à produire un système racinaire à forte croissance (Ahée et Duhoux, 1993) ; aptitude à fixer de l'azote (Dreyfus et Dommergues, 1988a)) .

C) SYMBIOSE FIXATRICE D'AZOTE ATMOSPHERIQUE

L'importance des ligneux à usages multiples est largement reconnue. En zone aride et semi-aride, les ligneux fixateurs d'azote indigènes qui sont bien adaptés aux conditions défavorables de leur milieu naturel, sont de plus en plus utilisés pour l'afforestation de ces régions dégradées et improductives, afin de restaurer la fertilité des sols et rétablir un bon équilibre écologique; ces espèces perennes, en plus de leur parfaite adaptation aux conditions climatiques sahéliennes, présentent l'énorme avantage de pouvoir fixer l'azote atmosphérique et de se développer sur des sols carencés en azote. Parmi les espèces les mieux étudiées, on peut citer les espèces du genre *Acacia* (Duhoux et Dommergues, 1986; Dreyfus et Dommergues, 1988a), *Casuarina* (Dreyfus et al., 1988; Sougoufara et al., 1989; 1990; Marriotti et al., 1991;), *Leucaena* (Sanginga et al., 1988; 1989; 1990), *Prosopis* (Jordan et al., 1990; Diagne et Baker, 1992). Toutes ces espèces végétales sont connues pour leurs potentialités multiples en matière de production de fourrage, d'amélioration de la fertilité des sols et d'utilisation du bois de feu.

L'étude que nous avons menée en matière de symbiose fixatrice d'azote atmosphérique comporte différents volets :

1- *A. albida* est connu pour son rôle améliorant de la fertilité du sol. L'accumulation d'éléments nutritifs en vue d'augmenter le niveau de fertilité des sols peut s'effectuer par l'intermédiaire soit de la fixation biologique de l'azote soit par recyclage de la matière organique à partir de feuilles ou à partir de déjections du bétail soit enfin par remobilisation des nitrates à partir des couches les plus profondes.

Récemment, il est apparu que cet effet améliorant sur les propriétés biologiques et physico-chimiques du sol appelé "effet "albida " serait dû à la pré-existence de micro-sites favorables, des îlots de fertilité, liés à la présence d'anciennes termitières sur lesquelles l'arbre se développe de préférence (Geiger et Van den Belt, 1992).

Notre objectif est de comparer le développement de jeunes plants d'*A. albida* inoculés sur deux types de sols : un sol riche en matière organique et en éléments minéraux et un sol squelettique et pauvre en ces éléments, et de suivre la dynamique des éléments nutritifs avant la culture et après la culture.

2- *A. albida* est nodulé généralement par des souches de Bradyrhizobium ; mais il est apparu que des souches de Rhizobium (ss) à croissance rapide peuvent noduler cette espèce. Nous avons cherché à déterminer l'efficacité de deux groupes d'espèces de Rhizobium à croissance rapide et de Bradyrhizobium (à croissance lente) en association avec *A. albida*.

L'étude de l'efficacité des souches a été menée à la fois en serre et en tubes de culture.

Le dispositif de culture "in vitro" de plantules en conditions axéniques où on apporte une quantité déterminée d'éléments nutritifs, de rhizobium où on définit les paramètres de température, de luminosité, d'hygrométrie est un dispositif standard permettant d'étudier de façon détaillée la nodulation et les paramètres pouvant influencer le mécanisme biologique de la fixation d'azote.

Nous nous sommes inspirés d'un dispositif mis au point sur *Acacia mangium* (Galiana et al., 1991) pour étudier "in vitro" les facteurs pouvant affecter ou stimuler la fixation en particulier la souche de rhizobium, la date de l'inoculation le nombre de sites potentiels de formation des nodules . Ce dispositif permet aussi de suivre visuellement la cinétique et la localisation des sites de formation des nodules sur les racines plantule par plantule. En doublant les expériences, en serre et en tubes, nous avons voulu tester la similarité des réponses obtenues dans les deux conditions, de façon à mener ultérieurement nos expériences d'inoculation en tube avec un dispositif de choix favorisant l'observation des nodules.

3- l'influence de la morphologie racinaire (traçant et superficiel ou pivotant et profond) sur la fixation biologique de l'azote.

L'apex racinaire comme tout méristème principal exerce une forte dominance sur les racines secondaires et par conséquent sa croissance s'effectue au détriment des racines secondaires qui sont inhibées. Si on supprime cette dominance du méristème apical, on peut favoriser l'augmentation de la ramification latérale et par là augmenter le nombre de sites de nodulation.

L'étude de la morphologie du système racinaire sur le potentiel de fixation d'azote atmosphérique a aussi été menée en dispositif "in vitro".

4- Chez *A. albida* la graine contient un embryon possédant des cotylédons; ces cotylédons contiennent une importante quantité de substances de réserves ; parmi celles -ci, l'azote contenu dans les tissus cotylédonaire se trouve en proportion appréciable (4,5% du poids sec chez *A. albida* contre 3.0% chez *A. nilotica* et 3.2% chez *A. tortilis*) (Reed et al., 1992).

De précédentes études sur les provenances Nord (avec un enracinement pivotant et très profond) et Sud (poussant les pieds dans l'eau avec un enracinement traçant), avaient montré que la provenance Sud avec un système racinaire traçant avait la particularité de présenter des gousses d'une taille supérieure à la moyenne et des graines plus volumineuses et plus lourdes que les autres provenances du Nord (Dianda, 1993; Chevallier et al., 1992).

Or, il a été constaté que les plants inoculés de la provenance Sud étaient plus vigoureux, et contenaient une plus grande quantité d'azote totale au cours des premiers stades de développement que la provenance Nord (Dianda, 1993).

Ce sont ces considérations qui nous ont amenés à étudier :

- la part respective des réserves azotées cotylédonaires et de la fixation biologique de l'azote dans l'estimation de l'azote total d'une plante.

En enlevant partiellement ou entièrement les cotylédons, nous avons cherché à déterminer l'influence des cotylédons sur la croissance et la fixation biologique de l'azote.

-De même en ajoutant une faible quantité d'azote sous forme d'azote starter 7 jours après l'inoculation, nous avons cherché à déterminer dans quelle mesure l'azote exogène peut affecter l'efficience de la fixation d'azote.

5- Etude anatomique de l'infection

L'utilisation d'une méthode efficace d'observation de racines infectées (Truchet et al., 1989), nous a permis de déterminer les premiers stades de l'infection par le Bradyrhizobium chez *A. albida*.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

PIANCHE N° 1

Acacia albida : Phénologie inversée

Fig. A : *Acacia albida* en pleine feuillaison au mois de Janvier en saison sèche . Noter la forme du houppier en parasol.

Fig.B: Peuplements d'*A. albida* dans la zone de Bambey; les arbres sont très âgés et la régénération naturelle est pratiquement absente; nous sommes en saison des pluies et l'arbre se trouve en association avec le mil ; noter la différence de croissance du mil sous le houppier et en dehors du houppier.

1

A



B



A) PRESENTATION DE L'ESPECE

Acacia albida encore appelée *Faidherbia albida* est une Mimosacée typique de l'Afrique aride et sub-aride, caractérisée par une phénologie inversée par rapport aux autres caducifoliées tropicales (feuillaison en saison sèche, défeuillaison en saison des pluies) (Pl. 1 fig A et B). *Acacia albida* est un arbre de grande taille (15 à 20 m) pouvant atteindre 30 m de hauteur ; il est caractérisé par la forme de son houppier hémisphérique en pyramide inversée. L'écorce est de couleur brune, fissurée et écaillée chez les arbres âgés. La feuille est composée bi-pennée ; les foliolules sont glabres à pubescentes, oblongues et dans certains cas mucronées. L'espèce présente des épines stipulaires droites et épaissies à leur base (fig. 1).

Le nombre chromosomique de base est $2n=26$ (Atchinson, 1948) mais il n'est pas rare de rencontrer des individus tétraploïdes ($2n=4x=52$) (Halevy, 1971).

Son aire de répartition couvre une étendue très importante, allant du Cap-Vert à la Somalie dans le sens Est-Ouest puis descendant vers la côte australe jusqu'au Nord de la frontière Sud-Africaine (Brenan, 1983). Son aire est limitée par la forte humidité permanente qui interdit sa présence en zone forestière dense (Fig. 2).

En dehors de l'Afrique on peut rencontrer de façon sporadique des peuplements d'*Acacia albida* au Yémen, en Israël en Jordanie et au Liban (Karshon, 1961).

L'origine probable de cette espèce serait vraisemblablement l'Afrique de l'Est par où la plupart des espèces d'*Acacia* auraient divergé (Ross, 1981); cette hypothèse est étayée par l'analyse génétique par électrophorèse des isoenzymes qui a montré que les allèles les plus fréquents au sein des populations d'Afrique de l'Est sont généralement les plus rares en Afrique de l'Ouest (Joly et Faggs C. comm pers.) et que l'espèce aurait considérablement évolué en intégrant de nouveaux allèles pour s'adapter à des écotypes très divers et en perdant d'autres par dérive génétique.

On distingue chez cette espèce deux races géographiques caractérisées par leur morphologie basée sur la pubescence et sur la longueur des foliolules :

- la race A à feuilles et tiges glabres et des foliolules de petite taille (6mm)
- la race B à feuilles et tiges pubescentes et foliolules plus larges (12 mm)

Cependant , il existe de nombreuses formes intermédiaires entre ces 2 races. La race A se retrouve essentiellement en Afrique australe et orientale alors que la race B est prédominante au Soudan et en Afrique de l'Ouest (Fig.2). Nongonierma (1978) a distingué quatre taxons dans la population de l'Afrique de l'Ouest .

Au Kenya, en Somalie, en Tanzanie, et en Ouganda, la race A n'est pas grégaire; on la retrouve dispersée le long des cours d'eau alors que la race B se retrouve à partir du sud de la Tanzanie vers le Sud de l'Afrique formant d'importants peuplements monospécifiques (Faggs,

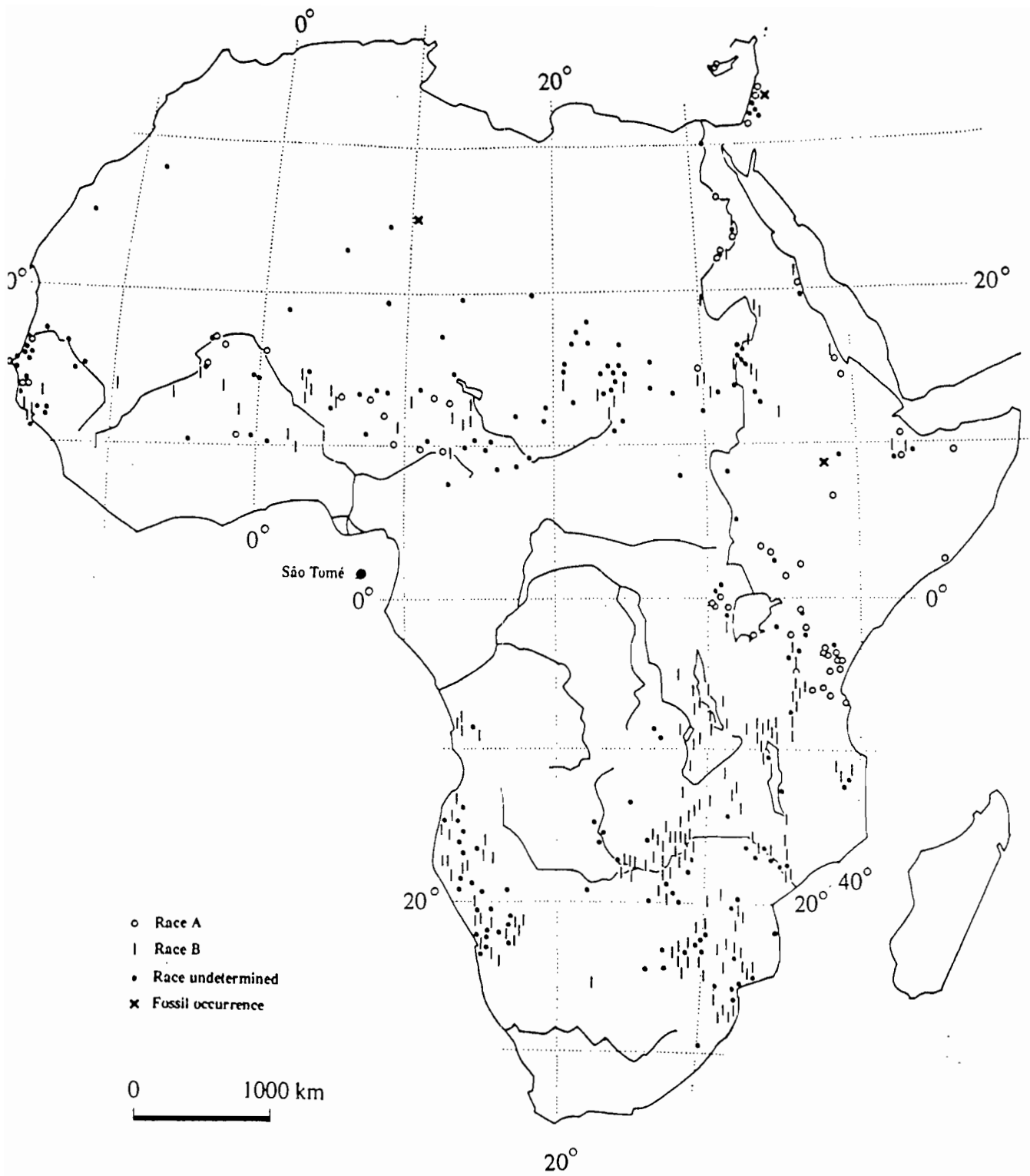


Fig 2: Carte de distribution géographique d'*Acacia albida* (CTFT, 1989)

1992) dans des zones généralement très peuplées et où l'extension des arbres est en partie due à l'influence de l'homme et du bétail.

1- ECOLOGIE

Espèce très plastique (Nongonierma, 1978), on la retrouve dans divers biotopes à différentes altitudes (-270 m à 2700 m) aux abords des cours d'eau, sur des sables dunaires profonds où son système racinaire pivotant peut atteindre la nappe phréatique à 40 m de profondeur, sur des sols sablo-argileux ou limoneux ou légèrement hydromorphes (Nongonierma, 1978; CTFT, 1988). En Afrique australe, l'espèce se développe sur des sols alluviaux calcimorphes, sur sols ferrugineux ou ferralitiques, sur vertisols et sur sols argileux.

Dans le Djebel Mara au Soudan, l'espèce se développe à des altitudes variables de 300 à 1000 m caractérisées par une pluviométrie allant de 50 à 1165 mm étalée entre 0 et 5 mois sur des sols profonds très poreux constitués de cendres volcaniques relativement pauvres en matière organique et légèrement acides (Miehe, 1986).

Au Malawi (Faggs, 1992) on la retrouve se développant sur des bancs de sable où elle résiste bien à l'inondation, en Namibie et en Zambie, l'espèce croît plus fréquemment autour des lacs, le long des cours d'eau et sur les zones de plateaux.

En Ethiopie, *A. albida* se trouve éparpillée au niveau des zones régulièrement inondées le long des cours d'eau dans les zones de savannes ; l'espèce croît en peuplements purs dans les zones habitées où les paysans la maintiennent de préférence par rapport aux autres espèces (Laike ,1992).

Le système racinaire pivotant allant chercher l'eau à de très grandes profondeurs, est considéré comme une forme d'adaptation à la sécheresse; par ailleurs, le type de racine pivotante est caractéristique de sols profonds sableux et tres poreux ; par contre dans les zones inondées régulièrement comme les zones de rizières et sur sols argileux, les individus qui s'y développent présentent un système racinaire non pas pivotant mais superficiel et très traçant (Dreyfus B. comm personnelle), (Alexandre et Ouedraogo, 1992) .

Tres récemment une nouvelle approche a été envisagée par Geiger et al., (1992) qui suggèrent que l'"effet albida" se caractérisant par une augmentation des rendements à l'approche de la canopée ne serait pas totalement liée à l'arbre mais plutôt au fait que l'arbre choisit et s'implante préférentiellement sur des micro-sites favorables ; ces micro-sites favorables sont à relier avec la présence de termitières qui apportent une quantité importante d'argiles (Brouwer et al., 1992).

2 - POSITION SYSTEMATIQUE

L'espèce a été pour la première fois identifiée par Delille en 1813 (cité par Wood, 1992) sous le nom d'*Acacia albida* Del. puis Bentham (1875) reconnut l'espèce comme appartenant aux Mimosoidae, sous -famille des Leguminosae dans la série des Gummiferae. Le genre *Acacia* comprend près de 1200 espèces.

Acacia albida est une espèce qui présente de nombreux caractères qui la distinguent des autres espèces du genre *Acacia* :

- La soudure des filets staminaux à leur base pour former un anneau entourant le gynécée (Baillon, 1863)

- la phénologie inversée : l'espèce perd ses feuilles en saison des pluies et les garde en saison sèche

- au cours des premiers stades du développement de la plantule, les feuilles primordiales formées sont bi-pennées alors que tous les autres *Acacia* présentent des feuilles primordiales avec un seul pennis (Vassal, 1979)

- Les cotylédons sont sessiles alors que les autres membres de la tribu des Gummiferae présentent des cotylédons pétiolés (Robbertse, 1974).

- Les grains de pollen sont dépourvus de crêtes, sont tri-colporés et possèdent une exine réticulée comparable à celle des Ingeae (Guinet, 1969).

- L'anatomie du bois est différente de celle des autres *Acacia* (Robbertse et al., 1980) par sa structure en couche et par ses rayons droits.

Ces caractères sont spécifiques et propres à *Acacia albida* et ne se rencontrent même pas chez des espèces proches parentes. C'est pour cette raison que Chevallier (1934) préféra exclure cette espèce du genre *Acacia* et la situer dans le genre monospécifique *Faidherbia albida*. Cette modification dans la nomenclature botanique établit en même temps la liaison entre la tribu des Acaciae et celle des Ingeae ; cette nomenclature n'a pas été totalement adoptée et la position systématique n'est pas à ce jour clarifiée.

3 - VARIABILITE GENETIQUE

En cherchant à déterminer l'étendue de la base génétique, des travaux ont montré une très grande dispersion de l'espèce dans le continent africain.

Des efforts considérables ont été menés dans la collecte et l'identification des provenances en Afrique de l'Ouest et en Afrique de l'Est (FAO 1980 ; Faggs, 1992).

Des études menées sur la variabilité morphologique des gousses (forme, taille, couleur et enroulement) ont montré une très grande variabilité entre les provenances et au sein des provenances (Ross, 1966) sans que l'on puisse mettre en relation ces variations de la gousse avec les différents types morphologiques observés et leur origine géographique (Chevallier et al., 1992).

Du point de vue phénologique des études menées en Afrique Australe ont montré là aussi une grande variabilité dans les stades phénologiques au niveau d'une même localité et entre localités différentes (Faggs, 1992) ; le cycle phénologique est très étalé et il a été observé des spécimens dans le désert namibien qui, en dehors d'une période de deux semaines où ils sont totalement défeuillés, conservent leurs feuilles toute l'année.

De nombreux essais de provenances ont été réalisés au Sénégal, (Cazet, 1987) au Burkina Faso (Billand et de Framont, 1986) et au Zimbabwe (Sniezko et Stewart, 1989), au Cameroun (Harmand et N'Djiti, 1992) à Dosso au Niger (Torrekens et al., 1992).

La plupart de ces essais ont montré que les provenances locales sont généralement les plus performantes et que les provenances d'Afrique Australe en particulier celles du Burundi ne sont pas du tout adaptées aux conditions sahéliennes.

Une comparaison entre les provenances de l'Afrique de l'Ouest et de l'Afrique de l'Est a montré des différences très nettes au point de vue des caractères de poids et taille des graines (en particulier les graines originaires de l'Afrique de l'Est sont en moyenne deux à trois fois plus volumineuses que celles de l'Afrique occidentale), la croissance juvénile et la nodulation.

Par ailleurs, pour différencier les paramètres purement génétiques des paramètres liés à l'environnement, des études en électrophorèse sur la variabilité génétique ont été menées (Danthu et Pratt, 1991), (Joly et al., 1992), (Faggs et al., 1992) qui confirment ce qui avait été déjà constaté au niveau de la diversité géographique. Les populations africaines d'*Acacia albida* ($H=0,454$) sont de loin beaucoup plus diversifiées que les populations d'*Acacia* originaires d'Australie; il semble que cette diversification doive être mise en relation avec sa distribution discontinue elle-même à relier à un certain niveau de différenciation en vue de s'adapter aux différents types d'habitats et /ou à une dérive génétique. Ces études ont aussi montré qu'il existe une nette démarcation entre les provenances d'Afrique Australe et Orientale et celles d'Afrique de l'Ouest.

4- IMPORTANCE DE L'ESPECE

En Afrique occidentale, la présence de l'*Acacia albida* est essentiellement liée à l'exercice d'une activité humaine locale qui est dans ces zones, de nature agro-sylvo-pastorale.

En étudiant les systèmes traditionnels, on se rend compte de la place prépondérante occupée par cette espèce (Pelissier, 1966 et 1980).

Sa feuillaison majestueuse pendant la saison sèche dans des régions presque désertiques est considérée comme un défi à la nature ; c'est pour cela que le "kad" est presque partout entouré de mythes socio-culturels et occupe une place prépondérante dans les croyances religieuses.

En effet, au Niger, il y'a plus de 100 ans, les sultans du Zinder punissaient toute personne qui abattait un *Acacia albida* .

Acacia albida chez les Dogons est considéré comme un arbre qui prolonge la vie (Bonkougou, 1992) .

En plus de ces mythes, les populations rurales connaissent l'importance agronomique de cette espèce ; en effet, l'arbre fournit ombrage et fourrage au bétail durant la saison sèche. Au Sénégal *Acacia albida* est une espèce depuis longtemps intégrée aux systèmes agraires traditionnels.

L'expérience paysanne sèrère a montré "que le parc à *Acacia albida* autorise une culture intensive sans jachère : c'est sous cet arbre que les cultures, notamment les céréales donnent les plus forts rendements et les meilleures qualités de récolte " (Bonkougou ,1987).

Des recherches menées à Bambey (Charreau et Vidal, 1965), (Dancette et Poulain, 1968) (Jung, 1970), sur le rôle de l'*Acacia albida* dans l'amélioration de la fertilité du sol, ont pu démontrer une augmentation de la teneur en matière carbonée et en eau du sol ainsi qu'une activité biologique intense sous le couvert de l'arbre. Au Cameroun des essais agroforestiers ont été effectués et ont permis de déterminer l'impact positif de l'arbre sur le rendement des cultures associées de mil et Sorgho (Eyog-Matig et Peltier, 1988).

Les différentes hypothèses émises concernant l'action de recyclage de la litière ou l'apport de fumure par le bétail qui stationne sous la canopée ou la fixation biologique de l'azote atmosphérique, sont sans nul doute appréciables, et chacun des facteurs contribuant pour sa part à l'amélioration de la fertilité du sol.

Outre l'action améliorante d'*Acacia albida* sur le rendement des cultures, cette espèce constitue par ses feuilles et ses gousses une excellente source de fourrage en saison sèche. Les premières gousses apparaissent à l'âge de 8 ans (Nongonierma, 1978). La production de fruits varie entre 125 -135 Kg par arbre de 230 m² de surface de la cime (Jung 1967; Wickens 1969).

La biomasse foliaire à l'optimum de végétation (mois de janvier) est estimée à 300 kg de matière sèche par Hectare ; les feuilles contiennent 200 g de matière azotée par kg de matière sèche alors que les gousses en renferment 150 g et les graines 240 à 280 g (Wickens, 1969).

Le rythme phénologique inversé a beaucoup intrigué de nombreux chercheurs qui ont à leur manière tenté d'émettre des hypothèses pour expliquer ce phénomène.

Selon Capon (1947), la présence de l'*Acacia albida* dans les zones de bas-fonds très humides favoriserait le maintien de son feuillage au cours de la saison sèche.

Trochain (1969) pense que l'arbre aurait migré vers le Nord méditerranéen lors d'une période humide ; il aurait ainsi acquis le rythme méditerranéen des pluies hivernales ; à la suite d'une phase de sécheresse, son aire se serait à nouveau déplacée vers le sud mais l'espèce aurait malgré tout conservé ce rythme phénologique.

Selon Giffard, 1964 l'arbre est originaire de l'hémisphère Sud ; il aurait gardé dans l'hémisphère Nord où il s'est adapté le rythme biologique de l'hémisphère Sud.

Selon Lebrun (1968) et Halevy (1971), le rythme phénologique inversé est essentiellement lié à l'engorgement des racines qui en créant des conditions d'anaérobiose perturbe la synthèse des hormones et le métabolisme en général et provoque par conséquent l'abscission foliaire.

Nongonierma (1978), en cherchant à démontrer l'hypothèse de Lebrun a constaté que dès la deuxième année de culture en conditions asphyxiantes, l'arbre reprend son rythme normal par rapport aux témoins placés en conditions non asphyxiantes.

Il en a par conséquent conclu que la défeuillaison au cours de la saison des pluies est un phénomène lié non pas aux conditions du sol mais à "des stimuli endogènes et rythmiques".

En effet, il a été souvent observé une très grande variabilité dans la périodicité du rythme phénologique entre différents individus d'une population sur un même site ; il nous est arrivé de constater quelques pieds agés qui ont conservé leurs feuilles sur une ou deux branches du houppier en saison des pluies ; et dans le désert de Namibie (Faggs et Barnes 1992), il existe des pieds d'*A. albida* qui gardent leurs feuilles pratiquement toute l'année.

B) BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION

De nombreuses études ont été menées sur la biologie de la reproduction chez les Acaciae. Notre revue bibliographique en rappelle les points essentiels et ne concerne que le groupe des Acacia australiens, africains et asiatiques.

1) VARIABILITÉ TAXONOMIQUE DES ACACIA

Les Mimosacées constituent un groupe largement représenté dans les zones tropicales africaines et australiennes. Au sein de ce groupe, le genre *Acacia* représenté par plus de 1200 espèces dont 700 endémiques en Australie est le plus important. C'est un groupe relativement homogène et où les subdivisions et les limites taxonomiques sont souvent imprécises en raison d'une variation continue des caractères (Guinet, 1969).

Cependant, il a été noté des niveaux inégaux de variation et des degrés divers d'évolution des caractères au niveau des différents taxa observés (Guinet et Vassal, 1978).

En effet dans le but de clarifier la classification et les subdivisions dans le genre *Acacia*, les critères de cytologie, de caractères du pollen, de la graine, de l'inflorescence, de la gousse, de l'appareil végétatif ont été utilisés pour démontrer que la plupart des caractères ne varient pas ensemble; cependant, en combinant ces différents caractères, il a été possible d'identifier des voies de spécialisation en relation avec la répartition géographique des espèces.

Le genre *Acacia* constitue un groupe très évolué au point de vue des caractères cytologiques (nombre chromosomique et caryotype) par rapport aux autres genres de la famille des Mimosacées et il se distingue des autres genres par un niveau élevé de spécialisation et ses caractères cytologiques sont d'une grande diversité (Guinet et Vassal, 1978). En effet, dans le genre *Acacia*, le noyau est de petite taille et le caryotype présente une très grande hétérogénéité ; d'autre part, le nombre chromosomique de base est $2n= 26$ mais on y distingue une grande variété de diploïdes, tétraploïdes, octoploïdes et 16-ploïdes avec certaines espèces telles que *A. tortilis* (Forssk.) Haynes subsp *raddiana* (Savi.) Brenan qui possède un nombre intermédiaire de 78.

2) ORGANISATION DE LA FLEUR

Le rameau inflorescentiel considéré comme la pousse florifère est soit un racème soit un panicule. En raison de la synchronicité des phases protogynes de l'ensemble des fleurs au

niveau d'une même inflorescence, on tend à considérer que chez les Mimosacées, l'unité de reproduction n'est pas la fleur mais l'ensemble des fleurs groupées en inflorescence (Arroyo, 1981 Kenrick et Knox, 1985). L'inflorescence est constituée d'un ensemble de fleurs groupées en glomérule ou en épi (Robbertse, 1974) .

Chez les Acacia africains on distingue deux grands groupes en fonction du type d'inflorescence :

- le groupe d'espèces à inflorescence en épi : *A. albida* , *A. ataxacantha* , *A. dudgeoni*, *A. laeta* , *A. macrostachya* , *A. polyacantha* et *A. senegal*

- le groupe d'espèces à inflorescence glomérulaire
 - réunie en faisceau : *A. ehrenbergiana*, *A. farnesiana*, *A. gerrardii*, *A. hockii*, *A. kirkii*, *A. nilotica*, *A. seyal*, *A. sieberiana*, *A. tortilis subsp raddiana*
 - réunie en grappe : *A. macrothyrsa* , *A. pennata*

La présence d'épines stipulaires est très souvent associée à la forme en glomérule de l'inflorescence; de la même manière la présence d'aiguillons recourbés s'accompagne d'une inflorescence en forme d'épi. Cependant il existe des exceptions; c'est le cas notamment de l'espèce *Acacia albida* qui présente des épines stipulaires et une inflorescence en forme d'épi et d'*Acacia pennata* qui possède des aiguillons alors que l'inflorescence est en forme de glomérule (Nongonierma, 1978).

Le genre *Acacia* offre une grande variabilité dans la morphologie et la coloration des pièces florales (sépalés, pétales, anthères, bractées), du nombre de fleurs produites par inflorescence, de la longueur du style, du nombre d'anthères et d'ovules (Kenrick et Knox, 1985).

3) L'ANDROCEE

Les anthères sont situées à l'extrémité d'un filament et sont constituées de deux lobes contenant quatre loculi situés deux par deux et l'une au dessus de l'autre.

La présence d'une glande à l'extrémité de l'anthère est très fréquente chez les différentes espèces d'*Acacia* à l'exception de quelques espèces dont *A. albida* alors que chez les espèces australiennes cette glande est pratiquement absente sauf chez *A. auriculiformis* (Dnyansagar, 1958) et *A. bidwii* (Kenrick et Knox, 1982) .

Le nombre d'anthères est un caractère important dans la stratégie reproductive de l'espèce ; en effet il est apparu (Kenrick et Knox, 1989) que si le nombre de fleurs formées au cours d'une saison reproductive est génétiquement déterminé, le nombre d'anthères est

variable pour une espèce donnée et ce nombre rend compte de l'investissement mâle consenti par la plante afin d'assurer sa reproduction.

Un autre facteur indicateur de l'effort mâle fourni par la plante est le nombre de grains de pollen.

Chez les Acacia les grains de pollen appelés monades sont agrégés pour former une polyade unique qui constitue l'unité de pollinisation. Le polyade est considéré comme l'analogie de la pollinie des Orchidées épidendroïdes -vandroïdes et de la polyade de certaines Asclépiadacées dans la mesure où le pollen est émis sous la forme d'une unité composée de grains de pollen pour faciliter le transport par les insectes vecteurs (Knox et Kenrick, 1982 ; Bernhardt et al., 1984). La présence de polyades est ainsi considérée comme un avantage sélectif au moment de la reproduction puisqu'elle confère à l'espèce un moyen de transport très efficace. La polyade constitue le produit final de la sporogénèse élaborée au sein de la loge pollinique ; la position respective des monades au niveau de la polyade renseigne sur sa filiation au moment de la méiose.

Chez les Acacia, le nombre de monades par polyade varie de 8, 12, 16 ; chez *A. cacia albida*, Guinet (1969) a dénombré 30 monades bien que Pedley (1978-1979) dans sa classification citée par Kenrick et Knox, (1989) dénombre 32 monades.

Dans le souci de clarifier la position taxonomique et phylétique des différents taxa, Guinet (1969) a établi une classification des différentes espèces d'Acacia en trois grands groupes selon leur type pollinique :

- 1) les espèces présentant 4 rarement 3 pores distaux soit les Filicinées et les Vulgares dont *A. albida* se rapproche le plus ; mais *A. albida* en est exclue à cause de son éxine aréolée et rugulée comme chez la tribu des Ingeae, de la présence de polyades de grande taille composées de 16 à 30 monades avec une éxine à columelle. Parmi les espèces de ce groupe on distingue *A. lenticularis*, *A. coulteri*, *A. cathariniensis* et *A. boliviana*.

2) Les espèces d'Acacia à 4 pores et 4 sillons distaux soit les A. d'Australie, Botryocephalae, Pulchellae et Phyllodinae ; notons que les sillons sont de profondes dépressions à la surface des monades empreintes des cellules de la paroi de l'anthere.

3) Les Acacia à trois pores distaux et le plus souvent à 3 sillons soit les Gummiferae (*A. seyal*, *A. raddiana*, *A. nilotica*, *A. giraffae* et *A. hindsii*).

Le tableau 1 montre qu'il existe une étroite corrélation entre le nombre de polyades et le maximum de graines obtenues à l'intérieur d'une gousse. Le maximum de graines n'excède pas le nombre de monades par polyade.

4) Le GYNECEE

Le nombre d'ovules est très variable se situant entre 8 et 16 pour la plupart des espèces du genre et culminant à 22 chez *A. albida* (Guinet 1969, Kenrick et Knox, 1982 a).

Tabl. N° 1: Relations entre le nombre de monades par polyade et la formation des graines chez quelques espèces d'Acacia selon la classification de Pedley (1978-1979)

Tiré de Kenrick et Knox 1989

Nom d'espèce	Nbre monade/ polyade	(1)	Nbre maxim graines/ gousse (2)	Ratio (1)/(2)
<i>A. albida</i>	32		21	1.5
<i>A. ataxacantha</i>	16		8	2.0
<i>A. borleae</i>	16		8	2.0
<i>A. burkeii</i>	16		5	3.2
<i>A. caffra</i>	16		10	1.6
<i>A. davyi</i>	16		12	1.3
<i>A. erioloba</i>	32		24	1.3
<i>A. exuvialis</i>	16		7	2.3
<i>A. famesiana</i>	8	16 32	11	0.7 -2.9
<i>A. gerrardii</i>	16		10	1.6
<i>A. grandicomuta</i>	16		12	1.3
<i>A. haematoxylon</i>	16		14	1.1
<i>A. hebeclada</i>	16		15	1.1
<i>A. hereroensis</i>	16		8	2.0
<i>A. mellifera</i>	16		5	3.2
<i>A. nebrownii</i>	16		6	2.7
<i>A. nigrescens</i>	16		6	2,7
<i>A. nilotica</i>	16		15	1.1
<i>A. pennata</i>	16		16	1.0
<i>A. permixta</i>	16		6	2.7
<i>A. rehmanniana</i>	16		11	1.5
<i>A. senegal</i>	16		6	2.7
<i>A. swazica</i>	16		10	1.6
<i>A. tortilis</i>	16		14	1.3
<i>A. xanthophloea</i>	16		9	1.7

La longueur du style est aussi variable d'une espèce à l'autre et dépend de la nature du récepteur pollinique (Nongonierma, 1978 ; Kenrick et Knox, 1989) .

Selon Heslop-Harrison (1975), les stigmates des Mimosacées sont classés dans le groupe des stigmates humides et non papillées.

5) REPRODUCTION

@Phases mâle et femelle

Si la plupart des espèces d'Acacia sahéliens présentent des fleurs hermaphrodites, (Tybirk, 1989) par contre, chez la grande majorité des espèces australiennes d'Acacia, il existe deux phases mâle et femelle bien séparées dans le temps, la phase femelle survenant après la phase mâle.

Il a aussi été observé une spécialisation des fleurs différemment situées au niveau de l'inflorescence certaines sont spécifiquement mâles alors que les autres sont femelles; c'est le cas chez *A. suaveolens* (Morrison, 1986) où 17 à 50 % sont mâles ; chez *A. karoo* les fleurs hermaphrodites sont distales (Gordon- Gray et Ward, 1975) .

Chez *A. retinodes*, les différentes phases mâle et femelle ont été particulièrement bien étudiées, en particulier, au moment de la pollinisation, la réceptivité du stigmate caractéristique d'une phase femelle est remarquable par l'exsudation d'un liquide constitué d'un mélange de protéines, sucres, lipides et composés phénoliques (Knox et al., 1989) et par une intense activité estérasique (Kenrick et Knox, 1981 a) . Cette exsudation observée chez les espèces australiennes d'Acacia (*retinodes* et *genistifolia*) a lieu lors des croisements inter-spécifiques et inter-génériques ; elle est considérée comme un signal de pollinisation qui assure un milieu adéquat d'hydratation puis de germination (Kenrick et Knox, 1981).

En dehors de l'exsudation stigmatique caractéristique de la phase femelle, la réceptivité des pistils déterminée par le taux de formation de graines, est maximale au cours de cette période femelle.

Chez *A. retinodes*, d'autres critères cytologiques ont été observés au cours de la succession des phases femelle et mâle. La paroi des cellules stigmatiques est très indentée ; ces indentations sont supposées jouer un rôle dans le transport des composés exsudés ou bien permettraient d'accroître la surface de sécrétion (Kenrick et Knox, 1989); par contre, au cours de la phase mâle subséquente, les cellules stigmatiques perdent l'intégrité de leur membrane qui était bien nette lors de la précédente phase femelle (Knox et al., 1989), ce qui suggère une absence totale de viabilité de ces cellules.

Chez les Acacia africains, il n'a pas été observé de phases mâle et femelle bien différenciées ; l'ouverture des fleurs est pratiquement synchrone chez les espèces à

glomérule avec un certain taux de stérilité femelle alors que chez les espèces à épi inflorescenciel, l'ouverture s'étale sur 2 à 3 jours (Tybirk, 1989) ; on retrouve la même séparation entre espèces à inflorescences en épi et à glomérule au niveau de la séquence d'ouverture des fleurs : les espèces à inflorescence en épi (*albida*, *senegal*, *ataxacantha*, *polyacantha*) ont une ouverture étalée sur 2 à 3 jours alors que les espèces à glomérule (*tortilis*, *seyal* et *nilotica*) présentent une ouverture synchrone durant la nuit (Tybirk, 1989).

Chez *A. tortilis* qui présente une inflorescence en glomérule, l'expression mâle est accrûe au niveau des fleurs proximales où les ovaires sont absents alors que les fleurs distales sont totalement hermaphrodites (Tybirk 1989).

La position et le pourcentage de fleurs hermaphrodites au niveau des inflorescences glomérulaires ou en épi sont caractéristiques de l'investissement femelle consenti par la plante au cours d'une phase reproductive donnée (Bawa et Webb, 1985). Il est apparu clairement que pour des raisons d'économie d'énergie, la plante réduit l'investissement femelle au niveau des zones de l'inflorescence qui sont inaccessibles par les insectes vecteurs (Tybirk, 1990).

Le nombre d'ovules par ovaire est fortement corrélé au nombre de monades par polyade. Le ratio polyade sur ovule varie pour les Acacia australiens entre 0,8 pour *A. paradoxa* et 4 chez *A. baueri* et entre 0,7 (*A. farnesiana*) et 3,2 (*A. burkeii*) pour les espèces africaines et asiatiques (Coetzee, 1955; Guinet 1969; Naraschimhasar, 1948).

@ Vecteurs de pollinisation

Les principaux vecteurs de pollinisation chez les Acaciae, sont les insectes Hyménoptères Diptères et Coléoptères (Sedgley et al., 1992 ; Tybirk, 1989); cependant la pollinisation peut s'effectuer par l'intermédiaire des oiseaux (Kenrick et al., 1987; Vanstone et Paton, 1988) et des chauve-souris (Arroyo 1981; Knox et Kenrick, 1983).

@ Qualité et viabilité du pollen

La qualité et la viabilité du pollen d'Acacia varient considérablement (Kenrick et Knox, 1989). Chez *A. retinodes* une fois que le pollen se trouve hors des loges de l'anthere sa viabilité est très courte. Au moment de l'anthere, la viabilité déterminée par le taux de germination, est de 70% mais peut atteindre 90 % (Kenrick et Knox, 1989), par la suite, le taux de germination chute brutalement à 49% puis à 9% à la suite de traitement à la chaleur (données non publiées).

Chez *A. mangium*, le pollen perd rapidement son pouvoir germinatif au bout de 3 jours lorsqu'il est maintenu desséché et à 20°C. Il peut être conservé à 5°C pendant 24 heures seulement. Chez *A. auriculiformis*, le pollen n'ayant pas subi de traitement perd tout pouvoir de germer au bout de 6 jours alors que conservé au froid, sa capacité de germer est maintenue pratiquement inaltérée pendant 11 mois (Sedgley et al., 1992).

5) AUTO-INCOMPATIBILITE

- Déterminisme

L'auto-incompatibilité constitue un système de reconnaissance entre plantes puisque l'auto-pollen est rejeté alors que l'allo-pollen est accepté. Cette reconnaissance est sous le contrôle d'un complexe génique situé à différents loci et présentant de nombreux allèles (De Nettancourt, 1977).

On distingue deux systèmes d'auto-incompatibilité :

- le système d'auto-incompatibilité sporophytique (SSI) : il est déterminé par le génotype diploïde du sporophyte ; il intervient très tôt à la surface du stigmate et inhibe l'émission du tube pollinique. A ce niveau, les protéines impliquées dans la reconnaissance des partenaires sont localisées dans le manteau pollinique d'origine tapétale et à la surface du stigmate (Heslop-Harrison, 1975).

La paroi de la portion terminale du tube pollinique présente une accumulation d'une substance, la callose formant un bouchon ; de même au niveau de la paroi des cellules du stigmate et du style, il se forme des masses de callose.

Ce type a été décrit actuellement au niveau de 6 familles (Charlesworth, 1988)

- le système d'auto-incompatibilité gamétophytique (GSI) : il est sous contrôle génotypique haploïde du pollen. C'est le système le plus fréquent. Le mécanisme de rejet se produit au niveau du style et à différentes profondeurs de pénétration en direction de l'ovule. Dans les deux systèmes (SSI et GSI), le pistil produit des glycoprotéines.

- Auto-incompatibilité chez les Acacia

La plupart des espèces africaines et australiennes d'Acacia possèdent ou sont suspectées d'avoir un système d'auto-incompatibilité qui favorise l'allogamie (Ibrahim 1991). Chez les espèces australiennes 3 espèces présentent une allogamie stricte (*A. mearnsii*, *A. picnacantha* et *A. retinodes*) ; 3 autres espèces présentent un système d'auto-incompatibilité partiel (*A. myrtifolia*, *A. paradoxa* et *A. terminalis*) alors que *A. ulicifolia* est auto-compatible (Kenrick et Knox, 1989).

Chez *A. tortilis*, Tybirk en 1993 a démontré qu'il existe une auto-incompatibilité partielle puisque seul 0,3% des épis autopollinisés ont fructifié.

Les études cytologiques pour déterminer la zone où s'arrête le tube pollinique dans le cas d'une auto-fécondation chez *A. retinodes* espèce auto-incompatible, ont montré que le tube pollinique pénètre les tissus stylaires et migre jusqu'au niveau du nucelle où il s'arrête (Kenrick et Knox, 1985) ; il apparaît ainsi que le modèle d'auto-incompatibilité observé chez cette espèce est de type "gamétophytique associé à un système génique post-zygotique léthal ou sub-léthal" (Kenrick et Knox, 1989).

C) MICROPROPAGATION VÉGÉTATIVE DES ARBRES

La multiplication végétative est basée sur la possibilité pour un végétal donné, à partir de fragments d'individus (tige feuille ou racine, tissu ou cellule...), de reconstituer un ou plusieurs individus sans intervention d'un processus sexué.

Le terme multiplication englobe non seulement la notion d'arithmétique qui permet de passer du simple au multiple mais aussi une notion de maintien du patrimoine génétique qui est copié de façon plus ou moins exacte au niveau des clones obtenus.

L'aptitude à la multiplication est considérée comme une potentialité fondamentale des végétaux et elle a été largement utilisée en arboriculture fruitière et en horticulture.

En amélioration génétique, la propagation végétative constitue un des piliers des programmes de recherche pour une production en masse de plants forestiers ; en effet elle présente de nombreux avantages par rapport à la propagation par voie sexuée.

Les principaux avantages sont les suivants :

1) les arbres possèdent des cycles de reproduction particulièrement longs ; en effet, pour passer d'une génération à une autre il faut attendre en moyenne 10 ans pour pouvoir observer le résultat des croisements effectués ; alors qu'avec le clonage, l'effet des schémas d'amélioration est observable dans un délai relativement court.

2) l'uniformité génétique des clones produits est aussi un des avantages non moins importants. L'homogénéité est un facteur recherché lorsqu'on veut fixer un caractère ; mais elle présente aussi des inconvénients puisqu'elle diminue la base génétique.

Bien que cette uniformité soit discutable en raison des variations liées à la position de l'explant de départ sur l'arbre (topophyse) (Boulay, 1979 ; Cornu et Chaix, 1981 ; Francllet et al., 1987) et à l'environnement nutritionnel prévalant au moment de l'excision de l'explant primaire (Leakey et al., 1992), la variabilité intraclonale observée est généralement beaucoup moindre que celle des clones issus d'individus différents.

3) Il a été démontré chez certaines espèces dont le peuplier (Shields et Bockheim, 1981), le séquoia (Francllet, 1989) et le cryptomère (Isikawa, 1987) que la croissance initiale des clones issus de propagation végétative, est améliorée par rapport à celle d'un semis.

4) En clonant des arbres adultes pour des caractères qui s'expriment à l'âge de maturité (ex fruits graines), il est possible d'occulter le stade juvénile et obtenir au bout d'une durée relativement courte, des arbres arrivés à maturité et qui sont productifs (Hackett et Murray, 1992).

5) en clonant des arbres-élites, des hybrides interspécifiques ou bien des individus sélectionnés au sein d'une population naturelle, on favorise la transmission des caractères génétiques désirables aux clones pratiquement sans altération. Ceci permet de conserver les combinaisons génétiques exceptionnelles qui auraient été perdues dans le cas d'une reproduction sexuée.

6) certains hybrides issus de croisements entre parents très éloignés sont généralement stériles seule la propagation végétative permet de capturer le gain génétique obtenu en conservant les hybrides et en les multipliant (ex: *Pinus rigida x taeda* (Gassama, 1984); (*Eucalyptus urophylla x grandis* (Viera et al., 1992).

La multiplication végétative présente des avantages mais aussi des inconvénients .

Les problèmes liés au clonage sont exacerbés du fait de la multiplication à grande échelle.

1) il s'est avéré nécessaire d'effectuer des tests multilocaux sous différents types de climats en vue de définir leur limites d'adaptation. Certains clones sont très sensibles aux pathogènes et aux ravageurs.

2) Chez certains clones, au fil des générations de clonage, il arrive de constater un phénomène de "dégénérescence clonale"; ce phénomène a été attribué à l'accumulation de pathogènes et de virus en particulier ; par exemple un clone extrêmement productif de pommier a été propagé pendant 500 à 600 ans en Europe de l'Est ; ce clone a progressivement disparu en raison d'une succession de facteurs dégénérescents (Bonga, 1981).

Pour contourner le problème lié à l'étroitesse de la base génétique, et pour obtenir une plus grande stabilité écologique, il a été recommandé pour le reboisement, de mettre en place des stratégies de mélanges de clones plutôt qu'un seul clone, même s'il est très performant.

En dehors des problèmes liés à la dégénérescence clonale, il subsiste d'autres problèmes liés aux méthodes traditionnelles de propagation végétative, en particulier lorsqu'on utilise du matériel adulte.

Le greffage est une méthode traditionnelle largement utilisée mais il nécessite une importante main d'oeuvre et est onéreux; de plus l'incompatibilité de greffage constitue un sérieux problème surtout lorsque le rejet ne survient que plusieurs années plus tard. Le bouturage est une méthode plus efficace et moins onéreuse ; il a été utilisé pour cloner et reboiser de très grandes superficies (ex les hybrides d'Eucalyptus ont été bouturés et utilisés pour un reboisement à grande échelle au Congo (Martin et Quillet, 1974) ; des boutures de *Casuarina equisetifolia* ont servi de matériel de base pour reboiser plusieurs hectares de dunes maritimes (Sougoufara et al., 1989).

Cependant le faible taux d'enracinement des ortets adultes, le phénomène de plagiotropisme persistant ainsi que la faiblesse de la croissance des boutures limitent son utilisation.

La culture de tissus "in vitro" constitue une nouvelle approche développée depuis une trentaine d'années permettant de surmonter ou à la limite de réduire les problèmes liés à l'utilisation de ces techniques traditionnelles.

La culture "in vitro" a déjà trouvé un large champ d'application chez les plantes annuelles et horticoles présentant une valeur ajoutée certaine. Par contre chez les arbres forestiers, les méthodes "in vitro" n'ont pas trouvé un champ d'application aussi large parce que les espèces forestières utilisées ne sont pas toujours commercialisables d'une part et d'autre part parce qu'elles sont beaucoup plus récalcitrantes à la régénération "in vitro".

1- MICROPROPAGATION À PARTIR DE TISSUS ADULTES

L'utilisation chez les essences forestières de jeunes semis pourrait constituer un matériel idéal s'il était possible de prédire par des marqueurs biochimiques, génétiques et moléculaires, les performances à l'âge adulte des individus . En l'absence de ces critères, seules les données de base sur la juvénilité la maturation le rajeunissement peuvent être utilisées.

1-1) Concept de juvénilité et de maturation

Les potentialités de clonage d'un individu donné sont étroitement associées aux facteurs génétiques et physiologiques qui contrôlent le passage de la phase juvénile à la phase adulte (Bonga 1982, Franclét 1982, Hackett 1985).

Si on ne peut pas nier le phénomène du vieillissement ontogénétique irréversible et génétiquement programmé pour rendre compte de la perte progressive des potentialités organogènes, il est apparu tout aussi clair que les méristèmes d'un arbre ne sont pas tous au

même stade de maturation. En effet, il a été constaté que certains méristèmes prélevés à la base du tronc sont plus "jeunes" que ceux prélevés au niveau de la cime de l'arbre.

L'état de juvénilité ou de maturation chez un arbre donné dépend de plusieurs facteurs :

-A) Le nombre de divisions mitotiques intervenues depuis la formation du méristème ; plus les divisions sont nombreuses et plus le méristème accumule des signaux de corrélations qui stabilisent l'information génétique pour l'orienter vers un type organisationnel correspondant à l'âge réel (Francllet 1982; Demarly 1985).

Les méristèmes quiescents d'attente se trouvent poussés en avant des initiales actives sans subir pratiquement de divisions mitotiques ; ce sont ces méristèmes qui sont mis à contribution au moment de la formation des fleurs. En effet on a souvent souligné (Holliday et Pugh, 1975) le fait qu'au niveau des arbres adultes seules les lignées cellulaires entrant en méiose sont capables de conserver leur pouvoir organogène.

C'est ainsi que des inflorescences immatures ont été utilisées pour produire des bourgeons végétatifs "in vitro" chez le palmier, (Reynolds 1982), chez *Casuarina equisetifolia* (Duhoux et al., 1986). De même, les pédoncules de cônes femelles immatures de *Larix decidua* sont capables de produire de multiples pousses adventives lorsqu'ils sont prélevés à une époque proche de la méiose (Chalupa, 1987).

Il existe aussi d'autres parties de la fleur ayant un potentiel élevé de régénération chez les arbres adultes : il s'agit du nucelle de l'ovaire et de l'ovule des Citrus, le nucelle du manguier du pommier et du raisin (Mullins et Srinivasan, 1976). En dehors des tissus diploïdes sporophytiques, des cellules gamétophytiques haploïdes (Bonga 1982) et des cellules de l'endosperme (Lakshmi Sita et al., 1980) se sont révélées capables de morphogénèse "in vitro". Il faut cependant noter que ces méthodes ne sont envisageables dans le cadre d'une micropropagation que si le taux de variation observé est acceptable.

D'après ces constatations, il s'avère qu'il est possible de rajeunir des tissus végétaux à condition de pouvoir trier au sein du végétal les territoires cellules ou tissus ayant conservé leur potentiel juvénile.

-B) L'environnement immédiat hormonal et nutritionnel des cellules méristématiques : il a été démontré que des substances hormonales (acide abscissique, cytokinine) et la nutrition minérale peuvent influencer l'état de juvénilité ou de maturation des territoires organogènes ; en effet, ces substances sont capables de mettre en place des circuits de corrélations activatrices ou inhibitrices induisant au niveau cellulaire un phénomène d'anergie. La conséquence est qu'une bouture issue d'un matériel ayant subi des manipulations (ex : recépages, pulvérisations de cytokinine, apport en quantité suffisante d'éléments minéraux nutritifs), présentera une croissance de type juvénile par rapport à une bouture n'ayant pas subi de manipulation.

Les drageons prélevés à proximité du système racinaire, bénéficient d'un environnement favorable caractérisé par une teneur des tissus en cytokinine plus élevée, une alimentation minérale et hydrique plus importante que dans la cime ; il a été constaté que ces drageons conservent des potentialités organogènes plus importantes que les autres parties de l'arbre.

Chez *Pinus pinaster* (Francllet et al., 1987) âgé de 11 ans, la régénération a été effectuée à partir de brachyblastes ; cependant l'effet rejuvénissant n'a été maintenu qu'au prix d'un traitement nutritionnel et environnemental optimal pour éviter le retour à un stade physiologique mature.

L'importance du réseau de corrélations inhibitrices sur les territoires méristématiques âgés a été démontré par Tran than Van (1980) ; en effet il a montré que les potentialités morphogènes sont souvent stimulées ou inhibées par les tissus voisins. Par conséquent il n'est pas seulement nécessaire de localiser les cellules ou tissus susceptibles de répondre à la stimulation organogène, mais il faut les isoler des tissus inhibiteurs voisins.

La miniaturisation de l'explant prend ainsi toute son importance dans la mesure où si on prend le cas extrême d'une cellule méristématique qui a conservé toutes ses potentialités morphogènes, il est plus facile à partir de cette cellule de reconstituer intégralement des individus que lorsqu'il s'agit d'un groupe de tissus ou d'organes différenciés et spécifiques dans leur fonctionnement. C'est ainsi qu'on arrive à former des embryons somatiques à partir de cellules simples ou à fusionner des cellules issues d'espèces ou de genre différents ; le seul inconvénient est que lorsqu'on aboutit à une régénération, les individus obtenus ne sont pas toujours conformes à l'individu d'origine.

1-2) Changements métaboliques liés à la maturation

Lorsqu'on veut régénérer des plantules à partir d'un explant primaire, on cherche à engager le processus métabolique vers une nouvelle direction en changeant par exemple les rapports cytokinine/auxine, acide abscissique/auxine, nitrate/ammonium, ainsi que de nombreux éléments minéraux tels que le K^+ le Ca^{2+} le Mg^{2+} . Cependant il existe d'autres moyens de modifier le processus métabolique au niveau tissulaire susceptibles de conduire à une morphogénèse.

Des travaux ont été effectués sur les principales voies métaboliques au moment de l'embryogénèse (Durzan, 1992) et sur le rajeunissement (Holliday et al., 1975 ; Meins et Binns, 1978). Les voies métaboliques de la respiration, un phénomène étroitement lié à la morphogénèse, ont été souvent utilisées pour orienter la réponse morphogène in vitro.

L'utilisation de stimulateurs et d'inhibiteurs métaboliques spécifiques permet d'orienter le métabolisme de certaines lignées cellulaires récalcitrantes vers la voie que l'on a choisie.

Il a été constaté que lors de la régénération de pousses à partir de cals, la voie pentose-phosphate est privilégiée par rapport à la voie glycolytique. La stimulation de la voie pentose-phosphate par utilisation de l'acide malonique (Bonga, 1981) et l'inhibition de la voie glycolytique par l'acide hydroxamique salicylique (SHAM) (Siedow et Girvin, 1980) aboutissent à une exacerbation de la morphogénèse.

Les substances de croissance jouent aussi un rôle dans le métabolisme respiratoire. Le 2-4D est une auxine capable de détourner le glucose dégradé de la voie glycolytique vers la voie pentose-phosphate (Black et Humphrey, 1962). La cytokinine bloque la voie alternative, la benzyl adénine stimule la cytochrome-oxydase et inhibe les glycolytique-kinases. Il a aussi été démontré que l'éthylène qui est un puissant inhibiteur de la morphogénèse stimule les voies alternatives.

Avec l'âge ontogénétique, les potentialités morphogénétiques sont progressivement réprimées. La maturation est un processus complexe entraînant des modifications aussi bien au niveau du noyau, du cytoplasme et des organites cellulaires. Cependant, au moment de la méiose il se produit une réversion de l'âge ontogénétique impliquant le cytoplasme (mitochondries et plastes) et l'ADN nucléaire (Holliday et Pugh, 1975).

En effet, il a été constaté qu'au cours de la sporogénèse, et en particulier au moment de la méiose et de la formation de la tétrade, une grande quantité d'ARN messager et d'ARN ribosomal est détruit au niveau des cellules (Dickinson, 1982). D'autre part, les organites cellulaires (mitochondries et plastes) se dé-différencient et une importante quantité de ces organites cellulaires est éliminée.

Selon l'hypothèse émise par Dickinson (1982), ces phénomènes résulteraient sûrement de l'éradication d'une forte proportion de molécules porteuses d'une information "sporophytique". Ainsi avec "élimination de la surcharge de la cellule et de l'information génétique" (Franclét, 1981; Demarly, 1985), les cellules acquièrent de nouveau un état proche de l'état initial embryonnaire.

Il a aussi été constaté qu'au cours des divisions asymétriques, la répartition de population mitochondriale n'est pas la même dans les deux cellules-filles; cette inégalité de répartition de populations mitochondriales pourrait être à l'origine de différences de degré de juvénilité constaté au niveau des méristèmes d'un arbre (Dickinson, 1982).

Au niveau du noyau, il existe des mécanismes susceptibles d'induire des changements semi-permanents dans le développement de la cellule. Parmi ces mécanismes, le plus important est la méthylation de l'ADN (Holliday et Pugh, 1975); d'autres phénomènes

peuvent intervenir tels que les transposons, les inversions de séquence, des amplifications de séquences susceptibles d'être éliminés plus tard.

Ces différentes considérations montrent à quel point les mécanismes qui soutendent la maturation ont été activement recherchés et incomplètement élucidés.

Tout récemment et grâce aux progrès de la biologie moléculaire, l'état adulte chez *Hedera helix* a pu être caractérisé de façon très fine (Hackett et al., 1992); en effet les jeunes feuilles accumulent au niveau du mésophylle des pigments anthocyaniques, phénomène absent sur les feuilles âgées. En utilisant les banques d'ADNc, les auteurs ont pu caractériser l'état adulte par l'absence d'ARNm du gène codant pour un enzyme la DFR (Dihydroflavonol reductase) ; en isolant le gène codant pour l'enzyme, il sera possible par hybridation "in situ", de localiser les sites de changement de compétence pour la biosynthèse des anthocyanes et comprendre la dynamique du processus de maturation.

Le rajeunissement demeure à l'heure actuelle un sujet encore très controversé ; pour de nombreuses espèces d'Angiospermes, le phénomène du rajeunissement est bien réel, alors que chez les Gymnospermes à part quelques Taxodiacées, le rajeunissement est encore considéré comme un artéfact et très souvent à la suite de nombreuses sub-cultures qui font réapparaître des caractères juvéniles, les caractères matures ressurgissent au cours de la phase d'acclimatation (Franclet et Franclet-Mirvaux, 1992) .

Ainsi certains auteurs (Roberts, 1979) attribuent ces changements à un effet "revigorant" ponctuel plutôt qu' à un changement profond affectant le contrôle génétique du développement des méristèmes .

Cependant, compte tenu de la difficulté de trouver des marqueurs fiables de juvénilité, de la complexité du phénomène de la maturation et de la difficulté de dissocier la cause de l'effet observé sur la plante, peu de progrès ont été réalisés dans ce domaine. De plus en plus les chercheurs tendent à utiliser l'outil de la biologie moléculaire (Durzan, 1992 ; Greenwood, 1992; Hackett, 1992) en espérant arriver à comprendre de manière précise la succession des événements aboutissant à la maturation.

2- EMBRYOGÈNESE SOMATIQUE

Les faibles taux de multiplication et les coûts élevés de production des vitroplants constituent de sérieux problèmes lorsqu'on veut micropropager à grande échelle.

Il existe généralement deux méthodes de micropropagation : la première utilise la voie de la caulogénèse suivie d'une rhizogénèse, la deuxième utilise la voie de l'embryogénèse somatique avec la formation d'embryons organisés à l'intérieur d'un tissu callogène (Vasil et Vasil 1972).

La micropropagation par la voie de l'embryogénèse somatique demeure un des moyens les plus intéressants pour accroître le potentiel de multiplication clonale.

L'embryogénèse somatique offre un avantage significatif pour une production intensive rapide et à grande échelle de plants forestiers (un cal d'*Hevea brasiliensis* de 3 cm de diamètre peut contenir environ 3000 à 4000 embryoïdes (Carron et al., 1984)). L'embryogénèse somatique est d'autre part considérée par de nombreux chercheurs comme une méthode peu onéreuse pour produire des micropropagules en raison du nombre infini d'embryons produits mais aussi de la possibilité d'automatiser les différentes étapes de la formation des embryons somatiques.

Elle a été décrite chez de nombreuses espèces herbacées (le soja) et surtout chez des espèces céréalières telles que le maïs, le triticales, le riz etc... mais peu d'études ont été effectuées sur les ligneux forestiers (Garyal et Maheswari, 1981)). La production de différentes espèces telles que l'hévea (Carron et al., 1984), le palmier à huile (Hanower et Hanower, 1984), le palmier dattier (Tisserat et de Mason, 1980), le cocotier (Abraham et Thomas, 1962 ; Panetier et Buffard- Morel, 1982), le caféier (Starisky, 1970 ; Dublin 1984 ; Sondhal et al.,1978; Yasuda et al.,1985); le cacaoyer (Janick, 1986; Kononowicz et Janick, 1984a ; Kononowicz et Janick,1984b) ; *Sismondia chinensis* (Wang et Janick, 1986), qui sont des espèces à intérêt économique est actuellement basée sur l'embryogénèse somatique.

Ce procédé en plus des avantages inhérents à la réduction des coûts de production, devrait permettre d'obtenir des propagules totalement rajeunis ; en effet, la différenciation des cellules matures qui permet l'expression des potentialités embryogènes donc un retour à la totipotence, a pour conséquence un rajeunissement complet des cellules.

Au cours de l'embryogénèse une structure embryoïde bipolaire (possédant simultanément un pôle de tige et un pôle de racine) est formée et est prête à germer.

La procédure habituelle exige l'induction d'un cal à partir d'un explant adéquat. Les tissus de l'embryon immature ont été très souvent utilisés (nucelle de citrus (Ranganwan, 1981); embryons zygotiques immatures, (Weng et Janick, 1986 ; Heyser et al., 1983; Vasil et Vasil, 1981; ovule (Starisky,1970 ; Kamo et al., 1985). De jeunes inflorescences et des fragments de racines de *Bambusa sp.* (Yeh et Chang, 1986) ont été utilisés comme explants initiaux pour induire une embryogénèse "in vitro". Des sections d'hypocotyles (Arriligia et al., 1986 ; Miroslava et al., 1984) ainsi que des feuilles (A. Pal et al., 1985 ; Wernicke et al., 1981 ; Sondhal et al.,1977 ; Dublin, 1981 ; Yasuda et al., 1985) se sont révélés être un matériel de choix pour une optimisation de l'induction et le développement embryogène.

Il est souvent apparu que même pour des lignées difficiles à régénérer, on peut obtenir des cellules embryogènes rapidement en choisissant les tissus appropriés correspondant à une étape particulière du développement. Chez *Brassica campestris* (Maheswaran et Williams, 1986) et *Trifolium repens* (Maheswaran et Williams, 1985), la réponse embryogène dépend du stade de développement de l'embryon zygotique dont il dérive et est limité aux cellules superficielles basales de l'hypocotyle de l'embryon. Le milieu et les conditions de culture n'ont aucun effet sur l'induction embryogène. Il apparaît ainsi que le niveau interne de détermination des cellules, lié à leur position au sein des tissus et à leur stade ontogénétique, constitue un facteur critique dans l'expression de l'embryogénèse somatique dès lors que les cellules sont libérées du contrôle exercé par les tissus environnants.

Ces explants sont soumis à un traitement auxinique en général du 2-4 D sur un milieu semi-solide. Le cal obtenu est sub-cultivé soit sur un milieu semi-solide (bambou, jojoba, *Aesculus*, *Dactylis glomerata*) ou transféré en milieu liquide pour obtenir des suspensions cellulaires (jojoba).

Le cal ou la suspension cellulaire continue sa croissance en présence des régulateurs de croissance qui favorisent une abondante callogénèse et une initiation de massifs méristématiques.

Lorsque la teneur en auxine et en nitrate est réduite ou supprimée du milieu de culture, les embryoides se différencient.

Les cals embryogènes se distinguent des cals non embryogènes par leurs aspects morphologiques. En effet, les cals embryogènes sont reconnaissables à la couleur qui est blanc-crème à jaune pâle, à la surface du cal qui est lisse un peu luisante et surtout à l'aspect compact du cal contenant des structures ressemblant à des nodules (Yeh et Cheng, 1986).

Ce cal compact et organisé en structures nodulaires, peut maintenir son potentiel embryogénétique durant plusieurs mois.

Des coupes histologiques ont permis de déterminer les zones de formation des cellules embryogènes. Chez *Coffea arabica* les embryons sont initiés au niveau des zones superficielles (Michaux-Ferrière et al., 1987) au niveau des cellules périphériques du mésophylle (Sondhal et al., 1978) au niveau des cellules épidermiques ou sub-épidermiques chez le maïs (Vasil et Vasil, 1985) ou au niveau de l'épiderme hypocotylaïre chez *Trifolium repens* (Maheswaran et Williams, 1985).

Les cellules embryogènes sont reconnaissables par leur petite taille, leur cytoplasme dense et très riche en grains d'amidon et une paroi épaisse ; elles présentent l'aspect de cellules méristématiques avec un rapport nucléoplasmique élevé, un nucléole volumineux et intensément coloré. À côté, les cellules non embryogènes sont généralement de grande taille

trés vacuolisées et possèdent une paroi fine et sont pratiquement dépourvues de grains d'amidon.

Gupta et al., 1986 ont mis au point une méthode de coloration permettant de distinguer les cellules embryogènes des cellules non embryogènes chez le genre *Pinus*.

L'étude histologique de la formation des embryons somatiques chez *Coffea arabica* a montré (Michaux-Ferrière et al., 1987) que l'embryon somatique dérive d'une seule cellule mais ce phénomène n'est pas généralisable puisqu'il a été montré que les embryons somatiques peuvent dériver d'un amas constitué de 3 à 4 cellules (Williams et Maheswaran, 1986).

L'AIA s'est révélé être un bon inducteur de l'embryogénèse chez *Dactylis glomerata* (Hanning et Conger, 1985) alors que chez Triticale (Stolarz et Lorz, 1986), la kinétine est l'hormone responsable de l'induction de l'embryogénèse.

Un stress osmotique s'est révélé favorable sur la formation d'embryons somatiques chez *Carica papaya* (Litz, 1986), chez le maïs l'addition de proline s'est avérée déterminante dans la réponse à la stimulation embryogène.

L'addition d'acide nicotinique et de thiamine intensifie l'embryogénèse chez *Glycine max* (Barwale et al., 1986).

L'irradiation par les rayons gamma stimule l'embryogénèse chez *Daucus carota* (Sangwan et Sangwan, 1985) mais les embryons formés sont incapables de germer pour donner une plantule.

Les polyamines en particulier la putrescine favorisent l'embryogénèse somatique de cals de *Daucus carota* (Frier et al., 1984 ; Montagüe et al., 1978).

Le nitrate d'argent stimule l'embryogénèse somatique à partir de tissus de carotte grâce à une action inhibitrice sur la production d'éthylène (Roustan et al., 1990).

La régénération par voie de l'embryogénèse somatique a montré une grande variabilité cytogénétique au niveau des embryons formés (Mc Coy et al., 1982 ; Karp et Maddock, 1984) alors que par ailleurs, on note une relative uniformité (Chen et al., 1981 ; Heyser et Nabors, 1982 ; Mc Coy et Philipps, 1982 ; Hanna et al., 1984 ; Swedley et Vasil, 1984). Ces études cytogénétiques et la caractérisation par électrophorèse des protéines totales (Swedlung et Vasil, 1984), ont révélé l'existence d'une forte pression de sélection en faveur d'une régénération à partir de cellules cytogénétiquement normales.

La suppression progressive des hormones aboutit à la maturation des embryons ; les embryoides passent en effet par les différentes étapes ontogénétiques qui mènent vers la formation d'un embryon normalement constitué ; ce schéma a été mis en évidence chez de nombreuses espèces céréalières mais aussi chez le caféier (Michaux-Ferrière (1987) ;

Dublin, (1981) ; Moens 1984) ; il existe cependant des exceptions (Lowe et al.,1985 ; Barwale et al., 1986) où les différentes étapes n'ont pas été observées.

Chez *Acacia koa* (Skomen,1986), la formation des embryoides n'est pas suivie de leur germination ; en effet en l'absence de stimuli cotylédonnaires indispensables à la germination, et malgré les différentes modifications de la composition du milieu de culture, les structures embryoides sont restées bloquées.

Les embryons somatiques de *Picea abies* peuvent conserver leur pouvoir de régénération pendant deux mois lorsqu'ils sont déshydratés ; la dessiccation permet de réduire la teneur en eau de 85 à 90% ; cette réduction est comparable à celle observée dans les conditions naturelles sur la graine (Berteche et Reymond,1992).

3- RÉGÉNÉRATION PAR CULTURE DE RACINES EXCISÉES

Les premières études effectuées sur la culture de racines avaient pour objectif essentiel de comprendre la physiologie racinaire, la nutrition la croissance et le développement.

De nombreux travaux ont permis de définir les conditions de la nutrition et de l'absorption minérale des racines (Bonner et Devirian,(1939), White, (1943).

Torrey, (1951, 1965) a mis en évidence les potentialités organogènes des tissus racinaires qu'il assimile à celles observées sur les tiges.

Des auteurs se seront par la suite intéressés à la culture de racines excisées en vue de la régénération de plantes entières (Danckwardt-Lillestrom 1957). Ces travaux sont relativement peu abondants. Généralement, les capacités de régénération des plantes sont largement étudiées mais peu d'auteurs examinent le comportement des racines "in vitro" ; cependant il a été démontré (Chaturvedi, Sinha, 1979) que les racines de nombreuses espèces végétales sont extrêmement morphogènes "in vitro" et qu'il est plus rapide de régénérer des plantes entières à partir de tissus racinaires qu'à partir de tissus aériens.

En 1965, Bonnet et Torrey cultivent des racines de *Convolvulus arvensis* et déterminent l'importance des éléments minéraux dans l'expression de la morphogénèse "in vitro". Charlton (1965) réussit à initier des bourgeons sur des racines excisées de *Linaria vulgaris* .

Kato et Takeuchi (1963) induisent une réponse morphogène à partir de fragments de racines de carotte.

Kefford et Caso (1972) sur *Chondrella juncea* ont réussi à régénérer des plantes entières à partir de racines et ont montré l'importance de l'âge de la racine sur les potentialités organogènes .

Sur *Brassica sp.* (Lustinec et Horak, 1970 ; Bajaj et Nitsch 1975 ; Lazzeri et Dunwell 1984) ont réussi à cultiver des racines appartenant à différentes espèces et cultivars et à régénérer des pousses adventives.

Chez les arbustes en particulier chez *Citrus sinensis* (Burger et Hackett 1986) , *Citrus mitis* (Sim et al., 1989) et *Citrus aurantifolia* (Bhat et al., 1992) les racines ont montré qu'elles possèdent d'importantes aptitudes à la régénération "in vitro".

Chez *Comptonia peregrina* (Gofford et Torrey, 1977), une méthode de propagation a été mise au point en induisant la formation de bourgeons adventifs à partir des tissus du cortex racinaire.

Les travaux relatifs à la régénération de bourgeons à partir de racines excisées d'espèces ligneuses sont très rares. On peut néanmoins citer les travaux de Brown et Mc Alpine, 1964 sur le liquidambar, ceux de Mukhopadyay et Mohan Ram, 1981 sur *Dalbergia sissoo* et ceux de Allieux 1990 et Phelep et al., 1992 sur *Allocasuarina verticillata* . Ces travaux ont permis de mettre au point une méthode de multiplication de ces espèces en utilisant les racines.

La régénération de tiges à partir de racines latérales appelée drageonnage est un phénomène naturel qu'on retrouve chez de nombreuses espèces et constitue une des formes de propagation dans leur environnement par multiplication végétative asexuée.

La plupart des espèces qui répondent favorablement à la culture de racines excisées , sont des espèces qui drageonnent naturellement (Bonnet et Torrey 1965 ; Peterson, 1975 ; Mouras et Lutz 1982) ; cependant des racines d'espèces qui ne drageonnent pas naturellement ont été amenés à produire "in vitro" des pousses adventives (Allieux 1990, Lazzeri et Dunwell, 1984) .

Chez *Acacia albida* , la régénération de plantes entières a été obtenue à partir de drageons développés sur des racines et prélevés sur des arbres adultes (Gassama et Duhoux, 1986 et 1989). Des essais réussis de bouturage en serre de racines ont été effectués sur de jeunes plants (De Fraiture et Nikiema, 1989) et des arbres adultes d'*Acacia albida* (Danthu, 1992).

D) SYMBIOSE FIXATRICE D'AZOTE ATMOSPHERIQUE

La fixation biologique de l'azote atmosphérique est un phénomène qu'on retrouve à des degrés divers dans la plupart des écosystèmes forestiers. Elle peut être le fait de micro-organismes libres ou symbiotiques (bactéries, actinomycètes et cyanophycées). Parmi les bactéries fixatrices libres on peut citer les genres *Azotobacter*, *Klebsellia* et *Clostridium*, et chez les cyanobactéries, *Anabaena*, *Calothrix* et *Nostoc*; *Azolla* est une Ptéridophyte qui s'associe avec *Anabaena*; ici la plante développe des cavités au niveau des lobes dorsaux de ses feuilles au sein desquelles la cyanophycée se reproduit et se développe ; mais l'association demeure extra-cellulaire. Certaines céréales s'associent avec *Azospirillum* et échangent des métabolites sans formation préalable de nouvelles structures.

Par contre lorsqu'il s'agit des arbres associés aux *Rhizobium* ou Actinomycètes, l'association est intra-cellulaire et la formation d'un nodule est le résultat d'une vraie coopération puisque l'association est à bénéfice réciproque.

En fait la symbiose est étroitement tributaire de l'approvisionnement en énergie. Au sein de l'écosystème, les fixateurs libres sont limités par la possibilité d'accéder rapidement à l'énergie disponible; ils peuvent cependant utiliser l'énergie contenue dans les exsudats racinaires mais à ce moment ils devront entrer en compétition avec un grand nombre de micro-organismes. Les fixateurs libres ne produisent qu'un à cinq Kg d'azote par hectare et par an (Davey et Wollen, 1979). Cependant leur action ne doit pas être négligée puisqu'ils agissent sur de très grandes surfaces et l'activité fixatrice symbiotique au niveau global des écosystèmes n'est toujours pas entièrement maîtrisée.

On distingue deux grands groupes de végétaux formant une symbiose efficace avec des micro-organismes fixateurs d'azote :

- les légumineuses : les espèces cultivées dont arachide, niébé, soja pois, luzerne etc ... , et les espèces arborées *Acacia*, *Prosopis*, *Leucaena*, etc.. qui s'associent avec une bactérie du genre *Rhizobium* (s.l.)
- les non légumineuses (*Casuarina*, *Alnus*, *Myrica*, etc ...) qui s'associent avec un Actynomycète du genre *Frankia*.

1) FIXATION DE L'AZOTE CHEZ LES LIGNEUX

La dégradation des écosystèmes sahéliens, la demande accrue en bois de feu et en fourrage dans les systèmes agroforestiers et agro-sylvo-pastoraux, ont accru l'intérêt porté par les scientifiques vers les espèces ligneuses capables de restaurer les sols et de pourvoir aux besoins énergétiques des populations rurales. Les arbres fixateurs d'azote présentent de nombreux avantages par leur parfaite adaptation aux conditions extrêmes de sécheresse de

pauvreté des sols, leur capacité à se développer sur des sols très pauvres en azote en utilisant l'azote atmosphérique comme principale source azotée et enfin par la possibilité qu'ils ont de restituer grâce à la décomposition de la litière, de la matière organique dont pourra bénéficier la culture annuelle associée.

L'aptitude à fixer l'azote de l'air est un phénomène qui intègre trois composantes essentielles (la plante-hôte, la souche de *Rhizobium* et le milieu environnant); la modification d'un seul de ces facteurs est susceptible d'affecter la fixation.

2) APTITUDE à FIXER L'AZOTE ATMOSPHÉRIQUE

Les quantités d'azote fixées varient considérablement en fonction de l'espèce, de la souche et des conditions du milieu naturel. *Sesbania rostrata* peut fixer entre 498 et 654 Kg d'azote par hectare et par an (N'Doye et al., 1992), *Casuarina* près de 200 kg (Sougoufara et al., 1987), *Leucaena leucocephala* fixe entre 110 et 274 Kg (Hogberg et Kvarnström, 1982) (Sanginga et al., 1986 et 1988) . Le potentiel fixateur des espèces de *Prosopis* en zone aride ou semi-aride, serait compris entre 20 et 40 Kg d'N /Ha /an (Felker 1980).

Prosopis glandulosa est capable de fixer près de 60% de ses besoins en N, ce qui correspond à 30Kg d'N /Ha/an (Rundell 1982); *Inga junicuil* 40Kg/Ha/an (Roskoski, 1981).

Les espèces australiennes (nodulant avec les souches de *Bradyrhizobium*), ont une nodulation très abondante mais une fixation relativement faible (Cornet et al., 1985) .

Acacia pennata et *Gliricidia sepium* fixent respectivement 35 et 13 Kg d'azote/Ha/an (Roskoski et al., 1980).

Il est apparu que le potentiel fixateur, considéré comme étant le potentiel absolu ou virtuel que la plante est capable d'exprimer en dehors de toute contrainte liée à l'environnement, est très variable en fonction des espèces et en fonction de la méthode de mesure (Dreyfus et al., 1988).

Leucaena leucocephala et *Acacia mangium* ont été identifiées comme étant des espèces à fort potentiel fixateur (entre 100 et 300 kg d'N par ha et par an).

A l'opposé, *Acacia pennata*, *Gliricidia sepium*, *Prosopis glandulosa* sont des espèces à faible potentiel fixateur puisque la quantité d'azote fixée dépasse rarement 30kg d'N /Ha /an .

Ainsi les espèces à potentiel élevé se présentent souvent comme des espèces à croissance rapide et qui tirent une proportion élevée de l'azote dont ils ont besoin à partir de l'azote atmosphérique, et ceci même en conditions défavorables.

La rapidité de croissance ne constitue pas à elle-seule un très bon critère de sélection pour l'aptitude à fixer l'azote. En effet, certaines espèces telles *Cassia siamea* (actuellement

appelée *Senna siamea*) atteignent des hauteurs très élevées dès la première année en raison de la présence d'un système racinaire très développé colonisant la quasi totalité du substrat (Danso et al., 1991). D'un autre côté, un gain de croissance rapide peut être obtenu avec des espèces très peu fixatrices lorsque l'azote est remobilisé et absorbé de manière efficace par les racines .

En effet sur *Casuarina equisetifolia*, (Sougoufara et al., 1989) il a été démontré que l'aptitude à fixer l'azote de l'air est indépendante de l'aptitude à assimiler l'azote du sol; des clones de *Casuarina equisetifolia* faiblement fixateurs arrivent à utiliser de manière plus efficace l'azote du sol que les clones très bons fixateurs, et par conséquent le rendement de la transformation en biomasse est plus élevé. Les critères de biomasse végétale, de quantité d'azote totale contenue dans les tissus de la plante, et de biomasse des nodules constituent de bons indices en vue de la sélection pour l'aptitude à fixer l'azote.

Ces valeurs apparaissent très significatives mais elles ne constituent sûrement pas la quantité maximale que ces espèces sont capables de fixer ; à côté de l'aptitude virtuelle à fixer l'azote, on distingue le potentiel effectif de fixation qui est quant à lui soumis à de nombreux facteurs limitants (Dommergues, 1987).

3) FACTEURS SUCEPTIBLES D'AFPECTER LE POUVOIR FIXATEUR D'AZOTE

Tous les facteurs qui participent de façon active au processus de la fixation (Fer, Molybdène, phosphore assimilable, CO₂, lumière, eau Temperature, pH , azote combiné et le sel), peuvent, lorsqu'ils deviennent limitants en affecter l'efficacité (Duhoux et Dommergues, 1986).

La fixation biologique de l'azote nécessite en dehors du phosphore du molybdène du fer et du magnésium, une certaine quantité d'azote pour former des unités d'acides aminés indispensables aux protéines enzymatiques.

3-1) l'Azote

Un sol relativement pauvre en azote combiné favorise la nodulation alors que de forts taux l'inhibent. En effet Sanginga et al., (1988,1989) sur *Leucaena leucocephala* et Kang (1975) sur le soja ont montré que la nodulation (nombre de nodules et poids sec) pouvait être inhibée en présence d'azote organique. Dazzo et Drill (1978), avaient déjà montré que des quantités importantes d'azote réduisent le nombre de poils absorbants racinaires et par conséquent la nodulation. Sougoufra et al., (1990) ont montré l'effet négatif d'un apport d'engrais minéral azoté sur la fixation biologique de l'azote.

L'influence de l'azote combiné a été étudiée chez *Aeschynomene scabra* (Eaglesham et Szabray, 1983) ; chez *Sesbania rostrata* le taux d'inhibition de la nodulation en présence de 1,5mM de NH_4NO_3 est de 64% pour les nodules caulinaires et de 81% pour les nodules racinaires. Cependant Umali et Garcia (1988) et Galiana (1990) sur *Acacia mangium*, ont montré que contrairement aux autres espèces, en présence de fortes doses d'engrais azotés (100 kg d'N /Ha), *A. mangium* est capable de former de nombreux nodules. Domenach et Kurdali, (1989) ont démontré que de forts taux d'azote dans le sol n'inhibent pas la capacité à fixer l'azote atmosphérique chez *Alnus glutinosa*.

Les sols tropicaux sont des sols caractérisés par leur pauvreté en azote et en phosphore assimilable. L'addition d'engrais azotés constitue souvent un préalable à une croissance des plants. En effet, *Leucaena leucocephala* est une espèce qui présente une croissance initiale particulièrement lente lorsqu'il est cultivé sur un sol déficient en azote; et d'ailleurs, il est recommandé, pour améliorer sa croissance, d'ajouter un inoculum associé ou non à de l'engrais (NAS, 1977). Cet azote jouerait le rôle d'azote starter indispensable au bon développement des plants au cours des premiers mois de croissance. En effet, le processus de la fixation d'azote ne s'installant pas dès la germination, la plante subit pendant les premières semaines des carences en azote qui inhibent sa croissance ou qui lui sont parfois fatales (Sanginga et al.,1988;1989).

De même durant la période de formation des nodules, les besoins en azote sont accrus et c'est à cette période que l'addition de fertilisants est souvent recommandée (Michin et al.,1981).

3-2) le calcium

Chez les légumineuses tempérées, les besoins en calcium sont relativement importants et puisque le calcium et le pH interagissent au niveau du sol, à des pH acides, la plante nécessite plus de calcium pour la nodulation. Les carences en calcium influeraient sur les premiers stades de la nodulation, au moment de l'initiation de l'infection bactérienne (Munns, 1977 ; Lie et van Egaraat, 1988).

3-3) l'acidité et la toxicité aluminique

L'acidité et son corollaire la toxicité aluminique, constituent dans bien des cas un facteur limitant de la nodulation et de la fixation d'azote (Fageria et al.,1988). Les pH acides inhibent la croissance et la nodulation chez *Sesbania rostrata* (Furoc et al.,1985; Ahmad et Ng,1981)

Leucaena leucocephala présente un faible taux d'établissement sur les sols tropicaux acides en raison d'une inhibition de la croissance racinaire due à la toxicité aluminique (Koffa et Mori,1987; Wong et Davendra, 1983) ; selon Hutton (1983) une moins bonne absorption

du calcium serait à l'origine de l'intolérance de *Leucaena leucocephala* sur les sols acides. *Gliricidia sepium* inoculé sur sols acides a nodulé mais aucune réponse à l'inoculation relative à la biomasse produite, n'a été décelée (Osunde et Sanginga, 1989).

Les travaux récents de Lesueur et al., (1992) sur *Acacia albida* et *Acacia mangium*, ont montré que les souches de Bradyrhizobium utilisées sont parfaitement adaptées à l'acidité du milieu environnant; par contre elles ont montré une nette sensibilité à l'égard de l'aluminium qui se révèle ainsi être un facteur majeur de sélection de souches de Bradyrhizobium. Il a aussi montré que les plantes-hôtes présentent une variabilité dans le degré de tolérance à l'acidité du sol.

3-4) Pathogènes

Parmi les facteurs limitants de la nodulation et de la fixation d'azote atmosphérique, on a pu noter la population d'Actynomycètes du sol qui jouerait un rôle important par son antagonisme de la croissance des Rhizobium chez *Prosopis juliflora* et *P. africana* (Diagne 1993).

3-5) Lumière

La lumière peut jouer un grand rôle dans l'efficacité de la symbiose ; en effet une lumière rouge favorise la nodulation alors que la lumière bleue l'inhibe . Cependant, le rouge lointain qui est la longueur d'onde la plus courante sous le houppier dans les écosystèmes forestiers inhibe totalement la nodulation (Lie,1974) .

4) PROBLEMES LIÉS AUX LIGNEUX SAHÉLIENS

4-1) Absence de nodulation "in situ"

Une constante retrouvée chez la plupart des ligneux sahéliens est leur aptitude à une bonne et abondante nodulation en serre ou en pépinière, mais dès que ces plantes sont transplantées en conditions naturelles les nodules deviennent rares et à la limite disparaissent presque totalement (Dreyfus et Dommergues, 1986). Nous pouvons aussi citer les notes rapportées par Barnet et al., 1987 qui mentionnent que dans les plantations d'*Acacia longifolia* et *A. saligna*, la nodulation est éparse, erratique et les nodules difficiles à trouver.

Plusieurs raisons dont la température alliée à la sécheresse ont été invoquées pour expliquer cette absence ou défaut de nodulation en conditions naturelles; d'autre part le phénomène de recyclage de l'azote essentiellement à partir de la litière constitue une des sources principales d'azote apportée par l'écosystème (Mahendrappa et al., 1986).

Bernardt-Reversat et Poupon (1980), ont suggéré que l'absence de nodulation sur les arbres adultes d'*Acacia senegal*, serait à relier avec la forte nitrification dans les sols situés sous la canopée pendant la saison sèche.

Un autre facteur identifié est la sécheresse. En effet Dreyfus et al., 1988 ont noté une abondante nodulation sur des racines peu profondes d'*A. albida* se développant dans des sols de rizières souvent inondées et où ils ont pu observer une importante population rhizobienne. Cette absence de nodulation dans les populations naturelles n'est pas causée par une absence de souches de *Rhizobium* dans le sol puisque des prélèvements de sols effectués depuis la surface jusqu'à une profondeur de 34m sous des pieds d'*Acacia albida* ont montré qu'il existe d'importantes populations de *Bradyrhizobium* se développant jusqu'à 34m de profondeur; il est apparu après caractérisation de ces souches, que les souches de surface seraient les mêmes que les souches de profondeur puisque les premières auraient suivi la croissance du système racinaire en profondeur (Dupuy et Dreyfus, 1992). Certaines de ces souches de *Bradyrhizobium* sont des souches photosynthétiques ; cette propriété n'étant pas observée uniquement chez *A. albida* mais aussi chez *Aescyhyomenae sp.* (Dupuy et al., 1994).

4-2) la disponibilité en phosphore assimilable

Les phosphates assimilables demeurent une des contraintes majeures largement rencontrées dans la plupart des sols tropicaux. La déficience en Phosphore du sol peut affecter la disponibilité en source d'énergie (ATP) ; les importants besoins en phosphore qui constitue une part intégrante de la molécule d'ATP qui fournit l'énergie nécessaire à la symbiose, peuvent être comblés par l'apport de fertilisants, mais la plupart des espèces peuvent tirer un grand profit en s'associant avec les champignons pour former des mycorhizes capables de solubiliser les phosphates.

Sanginga et al., 1988 ont montré que *Leucaena leucocephala* a besoin d'un apport exogène en phosphore pour activer sa croissance et améliorer son potentiel fixateur. Bengé (1983), Sanginga (1988) ont montré que l'addition de phosphore entraîne une augmentation du taux de Phosphore et d'azote contenus dans les tissus de la plante. Il est apparu (Sanginga et al., 1988) que le phosphore améliore la nodulation mais n'a pas d'effet significatif sur la quantité d'azote fixé; l'effet du phosphore sur la fixation d'azote est indirect puisqu'en améliorant la croissance, il augmente la quantité d'assimilats disponibles pour la fixation biologique de l'azote.

Les carences en phosphore peuvent être comblées par une inoculation mixte *Rhizobium* et Mycorhize à vésicules et à arbuscules (VAM). Chez *Acacia albida* (Ducouso et al., 1992 ; Gueye, 1992) la double inoculation agit favorablement sur la nodulation et sur la croissance des plants. Chang et al., 1986 sur *Acacia auriculiformis* a montré que la double inoculation

augmente de manière significative la croissance par rapport à une inoculation simple et par rapport aux témoins non inoculés.

De nombreux travaux ont confirmé les effets bénéfiques d'une inoculation mixte Rhizobium/ Mycorhize sur *Leucaena leucocephala*, *Cajanus cajan* (Lucena -Costa et Paulino, 1990), *Gliricidia sepium* (Osunde, 1992) *Sesbania grandiflora* (Habte et Aziz, 1985).

Werner et al., 1984 avaient montré que l'infection VAM était obligatoire pour une installation adéquate de la symbiose rhizobienne. Les mycorhizes améliorent la nutrition minérale phosphatée et mettent à la disposition de la plante des éléments qui favorisent la fixation en particulier les ions Zn, Cu, Mo etc... (Bowen, 1980).

Les bénéfices essentiels tirés de l'inoculation VA sur des espèces ligneuses légumineuses en zone aride et semi-aride résident en particulier dans l'amélioration de l'absorption en eau et dans la stimulation de la nodulation (Diop et al., 1994). Il est heureux de remarquer que la faible spécificité des souches VA vis à vis des espèces-hôtes ainsi que l'ubiquité des souches de champignons, permet une infection quasi spontanée des plantes dès leur mise en place, ce qui permet de les mettre dans des conditions favorables pour supporter les rigueurs de l'environnement sahélien.

4-3) l'efficacité des souches

Généralement les études agronomiques ont montré (Weaver et Frederick, 1974) que les populations natives de Rhizobium ne sont pas toujours les plus efficaces et les souches introduites et sélectionnées pour leur fort potentiel en fixation leur sont souvent préférées. L'absence ou l'inefficacité des souches dans le sol constitue un élément fondamental dans la réussite de l'inoculation dans des conditions naturelles de champ.

La conséquence pratique en est la nécessité d'inoculer très tôt en pépinière en utilisant des souches performantes de Rhizobium. Chez *Leucaena leucocephala*, la souche utilisée comme inoculum s'est révélée très compétitive (Sanginga et al., 1990) puisqu'elle a réussi à s'établir dans les sols des différents sites où la plantation a été effectuée. Les populations rhizobiennes se sont maintenues un an après et se sont révélées très infectives.

La spécificité du spectre d'hôte a été souvent étudiée car si les souches de Rhizobium sont "promiscuous", l'inoculation ne devient plus nécessaire. La plupart d'espèces d'arbres telles que *Acacia albida*, *A. holosericea*, *Prosopis africana* (Duhoux et Dommergues, 1988) sont dites "promiscuous" ; alors que d'autres espèces telles que *Leucaena leucocephala*, *Acacia senegal*, *Prosopis juliflora*, *Sesbania sp.* sont très spécifiques dans leurs associations symbiotiques.

5) INFLUENCE DU GÉNOTYPE DE LA PLANTE-HÔTE

L'existence d'une variabilité intra-spécifique dans l'aptitude à fixer l'azote atmosphérique a été bien établie chez les plantes annuelles, (Caldwell et Vest, 1977, Vincent, 1984); le génotype joue un rôle essentiel dans l'expression du potentiel de fixation (Heichel et Vance, 1983; Graham et Temple, 1984).

Sougoufara et al., (1989) a montré l'importance de la variabilité intra-spécifique en utilisant des clones issus de boutures herbacées de *Casuarina equisetifolia* ; l'aptitude à fixer l'azote varie dans des proportions allant de 1 à 2,5 fois plus entre les clones bons fixateurs et les clones mauvais fixateurs. Ces importantes différences se retrouvent sur les mêmes clones cultivés au champ (Dreyfus et al., 1989).

L'amélioration symbiotique en utilisant la sélection par voie de clonage de la plante-hôte, s'est avérée très efficace (Simon et al., 1985; Tremblay et al., 1984, Sougoufara et al., 1990) . Sur *Acacia mangium* (Galiana et al., 1991), il est apparu que le génotype de la plante-hôte est tout aussi important que la souche de *Rhizobium* et qu'il est possible de sélectionner isolément les deux partenaires puisqu'il n'existe aucune interaction entre la plante-hôte et le micro-symbionte chez cette espèce.

6) L'INFECTION BACTÉRIENNE

Généralement lorsqu'une plante se trouve en contact avec une bactérie, elle développe une réaction de défense contre le microbe. Mais dans le cas de la symbiose, la plante et le micro-organisme possèdent des signes de reconnaissance permettant à la bactérie d'envahir les cellules de l'hôte . Ces mécanismes de reconnaissance sont liés à la spécificité ou non de l'association. En effet, il est apparu qu'il existe différents niveaux de spécificité plante-hôte /*Rhizobium* à l'intérieur d'une même espèce, entre différents groupes d'inoculation croisée et à l'intérieur d'une famille entière . Ceci implique que la spécificité fait intervenir non pas une molécule signal mais tout un ensemble d'interactions. Cette variabilité peut être naturelle ou induite par des mutations, elle révèle l'étendue de la base génétique de la spécificité de l'infectivité.

6-1) Événements à la surface de la cellule

L'interaction entre les deux partenaires de la symbiose débute à la surface des cellules de la racine. De récents développements ont montré que la reconnaissance entre la plante et la bactérie nécessite l'intervention de molécules-signal ; la plante-hôte libère des substances (flavonoïdes) (Harwig et al., 1990) qui activent les gènes nod de la bactérie ; à leur tour ces gènes nod codent pour des enzymes intervenant dans la biosynthèse des facteurs nod qui sont des oligo-saccharides diversement substitués intervenant dans la spécificité de l'hôte ; ces facteurs Nod provoquent non seulement des modifications de la morphologie de la racine

(Lerouge et al., 1990) , mais aussi stimulent l'initiation du primordium nodulaire (Truchet et al., 1991).

6-2) Pénétration

Il existe 3 modes de pénétration des Rhizobium au sein de la plante-hôte :

- le premier, le plus fréquent chez les légumineuses tempérées et tropicales (Newcomb, 1980; Bauer, 1981; Sprent et de Faria, 1988) fait intervenir les poils absorbants à l'intérieur desquels se forme un cordon d'infection

- le second mode de pénétration emprunte les espaces intercellulaires et les déchirures au niveau des cellules corticales ou épidermiques ; c'est le mode dit "crack entry" (Lancelle et Torrey ,1983)

- le troisième mode n'utilise ni les poils absorbants ni les zones de déchirure mais l'infection s'effectue par colonisation des espaces intercellulaires entre deux cellules épidermiques adjacentes.

A) infection par poils absorbants

L'invasion du poil absorbant se caractérise d'abord par l'enroulement en crosse caractéristique. C'est le phénotype Hac où on observe une déformation et un enroulement du poil sur 360°. Par la suite se forme au niveau de la poche créée par la courbure du poil, un point réfringent qui détermine le point par où pénètre le Rhizobium dans la cellule de l'hôte.

Par une dissolution partielle de la paroi de la cellule et un dépôt concomittant de matériaux d'une nouvelle paroi, le cordon d'infection se forme. Le cordon d'infection est une structure tubulaire qui transporte des bactéries souvent alignées sur une seule file ; à l'intérieur, les cellules bactériennes se divisent et le cordon s'accroît et se dirige vers la cellule corticale adjacente au poil.

Simultanément à la croissance du cordon d'infection, se différencie à distance du poil infecté, au sein du cortex et contre le péricycle, des amas de cellules méristématiques initiant le primordium nodulaire.

Au bout de sa progression, à proximité du primordium nodulaire, le cordon se ramifie et pénètre les cellules corticales. Les Rhizobium sont lâchés à l'extrémité du cordon dans le cytoplasme des cellules du cortex et par un phénomène d'endocytose, les bactéries sont entourées d'une membrane originaire du plasmaleme de la cellule-hôte : la membrane péri-bactéroïdienne (Newcomb, 1981). La cellule corticale infectée est siège d'une intense activité métabolique, le noyau augmente de volume et devient polyploïde ; le micro-organisme se transforme en bactéroïde qui est la forme différenciée de l'endosymbionte.

B) infection par "Crack entry"

Ce mode d'infection particulier se déroule en l'absence de cordons d'infection au cours des premiers stades de l'infection. Les bactéries accèdent aux cellules corticales par l'intermédiaire de déchirures au niveau des cellules épidermiques. Ce type d'infection a été bien décrit chez *Stylosanthes* (Chandler et al., 1982), *Arachis hypogae* (Chandler 1978), *Aeschynomene* (Yatazawa et al., 1984; Alazard et Duhoux 1990), et *Sesbania* (Duhoux, 1984). Bien que la présence de poils absorbants soit nécessaire au processus de l'infection, les cellules bactériennes empruntent les espaces intercellulaires situés entre la paroi du poil absorbant et les cellules épidermiques ou corticales adjacentes. Après altération de la paroi des cellules basales du poil, les *Rhizobium* envahissent les cellules ; ces cellules se divisent et vont plus tard former un tissu nodulaire caractérisé par l'absence de cellules non envahies. Chez *Aeschynomene afraspera* (Alazard et Duhoux, 1990) les premières cellules du cortex infecté ne se divisent pas mais elles se désorganisent pour former des espaces intercellulaires contenant de nombreuses bactéries en division. L'invasion se propage ainsi par la succession de phases de désorganisation progressive suivie de phases de multiplication au niveau des espaces intercellulaires et gagne le cortex interne. A ce niveau les bactéries envahissent les cellules par invagination de la paroi et investissent le méristème nodulaire.

Leur propagation s'effectue par la suite en utilisant la voie intercellulaire grâce à de minces cordons d'infection.

C) infection par poches intercellulaires

Ce mode d'infection a été décrit pour la première fois par de Faria et al., 1988 chez *Mimosa scabrella* ; dans ce cas précis, la colonisation des cellules s'effectue par l'intermédiaire d'espaces intercellulaires à travers les parois primaires des cellules ; les bactéries se multiplient puis pénètrent dans les cellules adjacentes après invagination de la paroi cellulaire mais elles demeurent entourées par la paroi de la cellule hôte sans être lâchées au sein du cytoplasme.

16-3) Développement du nodule

Quel que soit le mode d'infection, le processus de la formation du nodule suit un modèle identique.

Les caractéristiques de la forme du nodule sont déterminées par le génotype de la plante-hôte ; le nodule qui se forme est une structure particulière qui présente une organisation typique pour chaque espèce. On distingue généralement deux types de nodules :

A) les nodules à croissance déterminée :

Ils sont souvent sphériques ovales et sont surtout caractérisés par la présence d'un méristème à activité limitée dans le temps et une synchronie dans les stades de développement des cellules (Newcomb, 1980). Une coupe transversale de ces nodules déterminés montrent deux types de tissus (Taté et al., 1994) :

- un tissu périphérique composé du cortex externe de l'endoderme et du cortex interne avec les vaisseaux conducteurs
- un tissu central constitué de cellules envahies par les bactéroïdes, et de cellules non envahies .

L'accroissement des nodules ne se fait pas en longueur mais en épaisseur.

Ce type est fréquemment observé dans la tribu des Phaseolae et des Papilionidés (Sprent et de Faria, 1988) et en particulier chez le soja, le haricot, l'arachide, *Stylosanthes*, *Aechynomene afraspera* (Dart 1975, Newcomb et Mc Intyre, 1981; Chandler et al., 1982, Alazard et Duhoux, 1990). Chez ces espèces la forme majeure par laquelle l'azote issu de la fixation est transporté est la forme uréide (allantoïne et acide allantoïque) (Sprent et de Faria, 1988).

B) les nodules à croissance indéterminée :

Ils sont de forme allongée, oblongue ou en collerette; l'activité du méristème est continue tout au long de l'ontogénèse du nodule ce qui permet de distinguer plusieurs zones d'âges différents :

- une zone (I) apicale dépourvue de bactéries de nature méristématique
- une zone d'invasion (II) où les cordons d'infection pénètrent au niveau des cellules nouvellement divisées
- une inter-zone (II-III) caractérisée par la présence de cellules envahies riches en amyloplastés (Vasse et al. ,1990)
- une zone (III) où s'effectue la fixation d'azote avec des cellules envahies remplies de bactéroïdes
- une zone (IV) de sénescence

Ils sont caractéristiques des espèces tempérées telles que le trèfle, la luzerne et le pois.

Ils sont caractéristiques des espèces appartenant aux tribus des Viciae et des Trifoliae et de la plupart des espèces de légumineuses tropicales, dont les formes amides (Asparagine et glutamine) sont les principales formes d'exportation de l'azote (Pate et al., 1969).

Chez *A. albida* des travaux récents (Diouf, 1995) ont montré la forme prépondérante sous laquelle l'azote est transportée est la forme amides (glutamine et asparagine).

7) DIVERSITÉ TAXONOMIQUE ET SPÉCIFICITÉ DES RHIZOBIUM (s.l)

7-1) Diversité taxonomique

Le genre *Rhizobium* a été décrit dans le *Bergey's Manual of determination bacteriology* (8e Edition) (1974) comme un genre constitué de 6 espèces déterminées sur la base des spectres d'hôte. En 1984 Jordan établit la distinction entre les *Rhizobium* à croissance rapide (*R. melilotii*, *R. phaseoli*, *R. leguminosarum* et *R. fredii*) et des *Bradyrhizobium* à croissance lente (*B. lupini* et *B. japonicum*).

De grandes avancées ont été obtenues dans l'étude taxonomique rhizobienne grâce à l'utilisation des séquences d'ARN ribosomal 16S qui ont permis d'établir des relations phylogénétiques entre les différentes souches utilisées (Woese, 1987 ; Young, 1991 ; de Bruijn 1992 ; Sawada et al., 1983). L'analyse des séquences de ribosomes 16s révèle que *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* sont très distincts et que chaque groupe présente de fortes affinités avec d'autres genres de bactéries non fixatrices telles que *Agrobacterium*, *Brucella*, *Phyllobacterium* (Yanagi et Yamasato, 1993) et *Rhodopseudomonas* et *Azospira* (Willems et Collins, 1992; Dupuy N., 1993) respectivement pour *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*. Actuellement on considère qu'il existe 3 genres formant des groupes bien différenciés :

Rhizobium, *Bradyrhizobium* (Jordan, 1984) et *Azorhizobium* (Dreyfus et al., 1988)
(Tabl N°2)

Tabl N° 2: Bactéries symbiotiques des plantes supérieures et leurs hôtes

<u>Especies</u>	<u>Plantes - hôtes</u>
<i>Rhizobium meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i>
<i>Rhizobium fredii</i> , <i>R. xinjiangensis</i>	<i>Glycine max, soja</i> et autres légumineuses
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	
<i>bv. viciae</i>	<i>Pisum, Vicia</i>
<i>bv. trifolii</i>	<i>Trifolium</i>
<i>bv. phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
<i>Rhizobium tropici</i>	<i>Phaseolus vulgaris, Leucaena spp.</i>
<i>Rhizobium etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Rhizobium galegae</i>	<i>Galega officinalis, G. orientalis</i>
<i>Rhizobium loti</i>	<i>Lotus spp.</i>
<i>Rhizobium huakii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Glycine max</i>
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Glycine max</i>
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>

Tout récemment un genre *Sinorhizobium* a été mis en évidence reclassant *Rhizobium meliloti* en *Sinorhizobium meliloti* et ajoutant deux nouvelles espèces *Sinorhizobium teranga* et *S. saheli* (Lajudie et al., 1994)

7-2) Spécificité des souches de Rhizobium

L'association symbiotique plante-Rhizobium présente deux niveaux de spécificité : l'une relative à la reconnaissance qui aboutit à la formation de nodules, l'autre relative au fonctionnement de la symbiose qui a pour résultante la fixation de molécules d'azote et leur transformation en NH_3 et en azote organique.

L'analyse génétique fournit des informations sur les gènes responsables de la reconnaissance entre la bactérie et l'hôte, le mécanisme de l'induction puis de la différenciation du nodule. L'utilisation de mutants a été d'un grand apport dans l'élucidation des interactions *Rhizobium*/Plante-hôte. De nombreux gènes ont été clonés puis séquencés (Downie, 1985 ; Jacobs et al., 1985) aussi bien au niveau de la plante- hôte qu'au niveau du micro-symbionte .

Chez les plantes fixatrices d'azote, les molécules responsables de la nodulation sont des protéines spécifiques appelées nodulines (Legocki et Verma 1980 ; Vjin et al., 1993).

Les gènes nod spécifiques sont les gènes responsables de la spécificité du spectre d'hôte. Des mutations au niveau de ces gènes entraînent des modifications au niveau du spectre d'hôte (Debellé et Shamme, 1986).

Parmi les nodulines tardives qui ne s'expriment qu'au moment où l'association symbiotique est fonctionnelle, la leghémoglobine est la plus étudiée et la mieux connue.

La leghémoglobine est constituée de deux parties dont l'une l'hème est synthétisée par la bactérie alors que la globine est synthétisée par la plante . Cette molécule est responsable de la régulation du niveau d'oxygène dans les cellules du nodule.

Il existe d'autres nodulines tardives telles que les nodulines de la membrane péri-bactéroïdienne (Mouisson et Desh Phal verma, 1987), les nodulines qui agissent sur le métabolisme azoté telles que la glutamine synthetase (Lara et al., 1983) la malate deshydrogénase (Appels et Haaker , 1987) et l'uricase (Bergmann et al., 1983).

Le concept de spécificité et d'efficacité de la symbiose a été discuté par de nombreux auteurs ; en effet de nombreuses espèces de légumineuses tropicales nodulant avec des souches de *Rhizobium* sont capables de noduler avec des souches de *Bradyrhizobium* (Dreyfus 1988). Ce phénomène a été observé chez *Acacia senegal* (Dreyfus et Dommergues, 1988), *Leucaena leucocephala* (Sanginga et al., 1988) et chez *Faidherbia albida* (Gueye, 1992).

De plus il est généralement admis que les plantes-hôtes qui s'associent de préférence avec des souches de *Bradyrhizobium* sont généralement non-spécifiques dans leur spectre d'hôte. Diagne (1986) a montré que *Prosopis juliflora* est une espèce très spécifique et n'est nodulé

que par des souches de *Bradyrhizobium* alors que *Prosopis africana* est nodulé à la fois par des souches à croissance rapide et par des souches à croissance lente.

Tabl. N° 3: Spécificité de la nodulation chez quelques légumineuses à usages multiples (Danso et al.,1992)

Espèces	Nodulation par B et/ou R*	References
<i>Acacia albida</i>	B	Dommergues ,1987
<i>A. constricta</i>	R	Waldon et al.,1989
<i>A.holosericea</i>	B	Dreyfus et Dommergues 1981
<i>A. longifolia var. sophorae</i>	R	Lawrie 1983
<i>A. mearnsii</i>	B	Lawrie 1983, Dommergues 1987
<i>A. melanoxylon</i>	B	Lawrie 1983
<i>A. nilotica</i>	R	Dommergues ,1987
<i>A. raddiana</i>	R	Dommergues ,1987
<i>A. saligna</i> ,	R,B	Barnet et al.,1985
<i>A. senegal</i>	R	Dommergues ,1987
<i>A. seyal</i>	R,B	Dommergues ,1987
<i>A. tumida</i>	R,B	Habish et Khairi 1970
<i>Albizia lebbeck</i>	B	Dreyfus et Dommergues 1981
<i>Calliandra calothyrsus</i>	R	Dommergues ,1987
<i>Erythrina poeppigiana</i>	B	Dommergues ,1987
<i>Gliricidia sepium</i>	R,B	Dommergues ,1987
<i>Leucaena leucocephala</i>	R,B	Dommergues ,1987
<i>mimosa scabrella</i>	R,B	Dommergues ,1987
<i>prospis alba</i>	R	Torres , 1985
<i>P. chilensis</i>	R	Olivares et al., 1988
<i>P. glandulosa</i>	R,B	Jenkins et al.,1989
<i>Sesbania grandiflora</i>	R	Dommergues ,1987

*B= Bradyrhizobium

R= Rhizobium

MATERIELS ET METHODES

A) BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION

1) SITUATION GÉO-CLIMATIQUE DE LA RÉGION

L'étude a été menée dans la région de Dakar (14° 43' N, 17° 26' W). Le climat y est sahélien influencé par l'alizé maritime qui atténue les maxima de température et réduit le déficit hygrométrique pendant la saison sèche; la moyenne annuelle de température y est de 24 °C et la pluviométrie annuelle est de l'ordre de 300 mm.

2) LOCALISATION DES ARBRES ÉTUDIÉS

Les arbres étudiés ont été localisés sur les sites ci-après

- Site Bel-air (ORS)
- Site Hann (HAN)
- Site Dalifor (DAL)
- Site Foire (FOR)
- Site Université (UNI)

Ces sites ont été choisis sur la base de leur accessibilité et du nombre d'individus suffisamment représentatifs par population. Une dizaine d'arbres par site ont été choisis sur la base de leur stade phénologique (floraison ou fructification) et de l'accessibilité des fleurs.

3) ETUDE PHÉNOLOGIQUE ET DE LA MORPHOLOGIE DES ORGANES FLORAUX

Après avoir identifié par un marquage à la peinture des branches terminales réparties au hasard sur chaque arbre, nous avons établi la cartographie du rameau inflorescentiel.

L'ordre d'apparition des inflorescences est déterminé à partir de la zone de ramification ; le nœud d'ordre 0 est situé à l'intersection entre le rameau n et le rameau latéral n+1 portant les inflorescences.

Les inflorescences sont récoltées, les fleurs dissequées, les anthères séparées des carpelles et conservées dans de l'alcool 70% . Le nombre de monades est déterminé par observation et comptage à partir de grains de pollen frais au microscope optique ; le nombre d' ovules est compté après avoir sectionné longitudinalement les ovaires ; une autre variante a été utilisée pour compter le nombre d'ovules par carpelle : à la suite d'un traitement éclaircissant à l'eau de javel (12°C) pendant 4 heures et d'un abondant rinçage à l'eau, les

carpelles sont colorés au bleu d'aniline et les ovules colorés en bleu sont parfaitement identifiables au microscope optique.

Les photos de surface des organes floraux ont été faites au M.E.B. après fixation dans l'éthanol 100 et déshydratation dans de l'acétone pur et passage au point critique et enrobage dans une fine pellicule de métal. Les échantillons sont observés au microscope électronique à balayage type JEOL JMS 35 CF.

4) ETUDE DE LA STRATÉGIE REPRODUCTIVE CHEZ ACACIA ALBIDA

4-1) RÉCEPTIVITÉ DU STIGMATE

La période de réceptivité du stigmate est déterminée par le test de l'activité estérasique. En présence du substrat, l'~~α~~ naphthyl acetate, on note une activité enzymatique décelable par une coloration rouge dont l'intensité varie en fonction du degré de réceptivité stigmatique (Heslop-Harrison et Shivanna, 1977). Nous avons choisi les fleurs à différents stades de développement :

- A : bouton floral de 5 mm
- B : début d'ouverture de la fleur
- C : ouverture de la fleur le stigmate émergeant de la masse des filets staminaux
- D : anthèse
- E : fin de l'anthèse début de la fanaison
- F : fleurs demeurées sur l'épi inflorescentiel après que toutes les autres se soient anées et présentant un style encore turgescant.

4-2) VIABILITÉ DU POLLEN D'*Acacia albida*

Les inflorescences sont récoltées au moment où les fleurs, situées sur le rameau inflorescentiel se trouvent à un stade de début d'ouverture du bouton floral juste avant l'anthèse; elles sont placées dans des sachets en polyéthylène fermés mais aérées. La récolte du pollen s'effectue en secouant délicatement à l'aide d'un pinceau les inflorescences déjà ouvertes. Sur les inflorescences au stade de bouton de 4 à 5 mm restées fermées, et conservées dans le sachet en polyéthylène, les anthères s'ouvrent à l'intérieur du bouton floral et libèrent les grains de pollen. Ces grains de pollen sont protégés de la dessiccation par la présence des enveloppes florales. Le pollen est séparé des débris végétaux en le plaçant sur un tamis de maille de 150 μm ; il est conservé dans une boîte de pétri à la température ambiante du laboratoire (20°C).

La viabilité des grains de pollen est estimée par deux tests :

A) le test FCR (fluorochromatique reaction) (Heslop-Harrison et al.,1984).

Le principe du test est le suivant : le grain de pollen présentant une membrane intacte contient une estérase qui en présence de di-acétate de fluorescéine clive la molécule pour libérer la fluorescéine ; cette fluorescéine s'accumule au sein de la cellule et à l'observation au microscope, il est possible de détecter les cellules qui fluorescent des autres non fluorescentes.

Deux traitements ont été appliqués aux grains de pollen :

a) Les grains de pollen sont conservés intacts et protégés à l'intérieur des tissus floraux.

b) les grains de pollen sont isolés des anthères et placés dans des boîtes de Pétri à température ambiante, où ils subissent une déshydratation plus ou moins poussée.

Puis les pollens sont placés dans une goutte de liquide constituée d'une solution saturée de di-acétate de fluorescéine (0,2 mg/ml) additionnée de milieu Brewbaker et Kwacks (1963) contenant 20 g/l de saccharose. Le mélange est placé sur une lame de microscope et les grains de pollen fluorescent au bout de quelques minutes. L'observation s'effectue en épifluorescence sous une longueur d'onde émettant une lumière bleue. L'estimation de la viabilité est évaluée selon l'intensité de la fluorescence émise par les monades.

B) l'étude de la capacité de germination des monades et la croissance du tube pollinique en condition "in vitro".

Les grains de pollen conservés en boîte de Pétri, sont mis à germer sur deux milieux (voir annexes):

- BK (Brewbaker et Kwacks, 1963)

- milieu GM simplifié contenant du $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ $3 \cdot 10^{-3}$ M et de H_3BO_3 $2 \cdot 10^{-3}$ M .

Le saccharose est ajouté au milieu à différentes concentrations (5,10, 20 et 30 g/l).

Plusieurs gammes de pH ont été testées (5, 6, 6.4 , 7).

Les milieux sont solidifiés par le phytigel (2g/l). L'incubation s'effectue à l'obscurité à 30°C dans une ambiance saturée en humidité grâce à la fermeture hermétique de la boîte contenant les lames sur lesquelles s'effectue la germination. Au bout de 12 à 24 heures de culture, les échantillons sont retirés et observés sous la loupe à lumière froide et au microscope optique (Jena).

4-3) POLLINISATION CONTROLÉE

Au cours de cette expérience, nous avons cherché à déterminer de manière quantitative le niveau d'auto-incompatibilité d'individus provenant de populations naturelles d'*A. albida*. Cette expérience vise à étudier le mode de fécondation allogame ou autogame dominant chez *A. albida*.

Nous avons utilisé l'index d'auto-incompatibilité (ISI) qui est le rapport entre le nombre d'infrutescences ou de gousses obtenues à la suite de l'auto-fécondation sur le nombre d'infrutescences obtenues après fécondation croisée. Lorsque le rapport est compris entre 0 et 0,2 l'espèce est auto-incompatible ; lorsqu'il est compris entre 0,2 et 1, elle est partiellement auto-compatible ; au-delà de 1, l'espèce est totalement auto-compatible. Cet index a été développé par Zappata et Arroyo (1978) et utilisé par Kenrick et Knox, 1989 sur les *Acacia* australiens et par Tybirk, 1993 sur *A. tortilis*.

Nous avons identifié 8 arbres sur deux sites Uni et Foi. Après avoir choisi les rameaux florifères portant de nombreuses inflorescences au stade optimal, nous avons enlevé les boutons trop jeunes, les fleurs déjà ouvertes et nous avons conservé les boutons médians.

5 traitements ont été mis en place :

A- Témoins absolus ensachés sans manipulation des inflorescences (Témoins); nous avons laissé ces témoins absolus qui ne subissent aucune manipulation au cas où il y'aurait éventuellement une pollinisation autogame ou bien une apomixie.

B-Témoins ensachés mais dont les épis sont légèrement secoués à l'intérieur de la poche pour favoriser, par un déplacement du pollen, la mise en contact de ce dernier avec le stigmate (Auto S-M).

C- Inflorescences ensachées et auto-fécondées manuellement par badigeonnage avec des inflorescences récoltées au stade de l'anthèse sur le même arbre (Auto-M)

D- Inflorescences ensachées et allo-fécondées par badigeonnage avec des inflorescences récoltées au stade de l'anthèse récoltées sur un arbre différent (Allo); les croisements sont numérotés, les parents mâles et femelles identifiés .

E- Les épis sont identifiés mais ne sont pas ensachés et la pollinisation se fait par voie naturelle (Poll Nat).

Nous avons utilisé des poches fabriquées en gaze fine blanche, qui laissent passer les gaz, la lumière et ne modifient pas l'humidité à proximité des inflorescences.

3 jours après l'ensachage, nous avons enlevé tous les boutons non encore ouverts; après avoir récolté des inflorescences dont les fleurs étaient au stade de l'anthèse, nous avons fécondé les fleurs à polliniser avec ces inflorescences puis refermé les poches.

2 semaines après l'ensemble des rameaux florifères a été récolté, le nombre de gousses comptées et l'index d'auto-incompatibilité (ISI pour Index of Self Incompatibility)

calculé par la méthode de Lloyd (1965). Nous avons utilisé le nombre d'inflorescences produisant des gousses pour déterminer le rendement de la pollinisation.

Les tests statistiques par analyse de variance (test de Fischer à 95%) ont été effectués.

B) MICROPROPAGATION VÉGÉTATIVE CHEZ ACACIA ALBIDA

1) MICROPROPAGATION VÉGÉTATIVE PAR BOURGEONNEMENT AXILLAIRE

1-1) Matériel végétal

La micropropagation est réalisée à partir de noeuds de rameaux prélevés sur des arbres adultes. Ces arbres adultes sont situés dans l'enceinte de l'université de Dakar; certains pieds sont localisés au niveau du jardin botanique ou derrière l'Office du Bac. Les prélèvements se font tout au long de l'année. Le matériel végétal choisi est constitué soit de drageons, de rejets ou de pousses florifères prélevées sur la cime de l'arbre.

Chaque noeud (environ 1 cm) porte à l'aisselle des feuilles entre les épines stipulaires un bourgeon.

1-2) Désinfection du matériel

La désinfection s'effectue par pré-trempe des noeuds débarrassés de leurs feuilles, dans de l'alcool 70% suivi d'un trempage dans une solution de chlorure mercurique (0,1%) additionné d'un mouillant le tween 20. La désinfection dure 5 mn et elle est suivie de 5 rinçages à l'eau distillée stérile.

1-3) Milieux et conditions de culture

Des drageons constitués de tiges feuillées de 9 à 10 cm ont été prélevés puis placés dans les solutions aqueuses suivantes en vue d'un pré-trempe précédant l'indroduction "in vitro":

eau distillée

MS= milieu Murashige et Skoog complet

MS -oligo = milieu MS sans oligo-éléments

MS/2 + NO₃= Milieu MS dilué de 1/2 sans autre source d'azote que NO₃ (x M)

MS/2 +NH₄= Milieu MS dilué de 1/2 sans autre source d'azote que NH₄ (x M)

MS/2 -N= Milieu MS dilué de 1/2 sans aucune source d'azote

Cinq milieux minéraux de base (Composition voir en annexe) ont été testés : Murashige et Skoog (1962) ; Quoirin -Lepoivre (1977); Gamborg et al., (1968) ; Nitsch et Nitsch (1965) ; Lloyd and Mc Cown (WPM) (1985). Ces milieux sont additionnés de vitamines de Murashige et Skoog (1962) ainsi que de substances de croissance : ANA (acide naphthalene acetique); AIB (Acide indolyl-butyrique) et AIA (acide indolyl acetique) à des concentrations variant de 0 à 5 mg/l ainsi que d'une cytokinine la BAP (Benzyl amino purine).

Après addition de saccharose (3%), les milieux dont le pH est ajusté à 5,5 / 5,6 sont solidifiés par l'agar (Bacto Difco agar) (9 g/l). Après stérilisation à l'autoclave (20 mn à 120 °C), le charbon actif est ajouté stérilement au milieu de culture.

- Afin de prévenir la défoliation des vitroplants, des substances ont été ajoutées au milieu MS de base. Les différentes substances utilisées pour prévenir l'abscission foliaire et stimuler le développement sont : la glutamine, l'adénine et le phloroglucinol (1,3,5-Trihydroxybenzène) à des concentrations variant entre 100 mg/l et 1000 mg/l.

Pour intensifier la multiplication, les explants primaires pourvus de leur bourgeon axillaire, sont trempés dans une solution aqueuse de BAP très concentrée (20 mg/l) préalablement stérilisée à l'autoclave, agités par rotation pendant 15 heures. A la suite d'un rinçage à l'eau distillée stérile, les noeuds sont cultivés sur MS contenant uniquement de l'AIA comme substance de croissance.

L'enracinement des tigelles s'effectue sur différents milieux en présence d'auxine (AIA , AIB et ANA) à des concentrations variant entre 0 et 5 mg/l.

Afin d'étudier la nutrition minérale azotée chez *Acacia albida*, nous avons utilisé les macro-éléments et les micro-éléments de Murashige et Skoog additionnés de diverses formes d'azote (minérale et organique) à des concentrations variées. Les explants sont constitués de clones d'individus âgés de deux ans cultivés "in vitro".

Ces milieux sont décrits ci-après :

- 1 - Milieu 0 sans azote (MS N)
- 2 - Milieu MSN + NO₃ (5 mM /l)
- 3 - Milieu MSN + NO₃ / NH₄ : (5 mM / 20 mM)
- 4 - Milieu MSN + NO₃ / NH₄ : (1 mM / 20 mM)
- 5 - Milieu MSN + Asparagine (3,5 mM /l) =500mg/L
- 6 - Milieu MSN + Glutamine (0,7 mM /l) =100 mg/L
- 7 - Milieu MSN + NH₄ (20 mM /l)
- 8 - Milieu MSN + Glutamine (3,5 mM /l) =500mg/l)

- 9 - Milieu MSN + Asparagine (0,7 mM /l) =100 mg/l)
- 10- Milieu MSN + NH₄ (1 mM /l)
- 11- Milieu MSN + NH₄ (5mM /l)
- 12- Milieu MSN + NO₃ (20 mM/l)
- 13 - Milieu MSN + NO₃ (1 mM /l)

2) - EMBRYOGENESE SOMATIQUE

2-1) Matériel végétal

Dans le but de déclencher une embryogénèse à partir de cals, des graines matures d'*A. albida* (Provenance Ouadiour) âgées d'un an, ont été utilisées comme explant.

Les graines sont scarifiées dans de l'acide sulfurique à 98 % pendant 20 min puis rincées abondamment à l'eau distillée. La désinfection s'effectue par trempage dans une solution aqueuse d'hypochlorite de Ca (140 g/l) pendant 20 min, suivie de 5 rinçages à l'eau distillée stérile.

La germination des graines s' effectue à l'obscurité dans une étuve à 29° C sur un support inerte constitué de coton hydrophile imbibé d'eau distillée stérile. La germination survient au bout de 48 heures, avec un taux optimal de 98% environ.

2-2) Mise en culture et conditions de culture

Les prélèvements et mises en culture se font sur des plants âgés d'1 à 6 jours. Les différentes parties de la plante sont excisées cotylédons, embryon sans les cotylédons, portion d'hypocotyle, d' épicotyle, foliole ; sur certains explants (cotylédon et foliole), la partie superficielle est incisée pour favoriser la callogénèse.

La formation des embryons somatiques nécessite l'induction préalable de la callogénèse sur un milieu auxinique (AIA ou 2-4D) suivie d'une phase d'induction et d'expression de l'embryogénèse somatique après suppression de l'auxine et addition de cytokinine et de substances favorables à l'embryogénèse (hydrolysate de caséine et cocktail d'acides aminés).

Le milieu minéral de Gamborg (1965), en présence d'une auxine l'AIA et le 2-4D (0 ; 3 ; 15 mg /l) a été utilisé pour induire la formation de cals sur les explants et par la suite la BAP (Benzyl amino-purine) (1 et 2 mg/l) en présence de charbon actif (20g/l) est ajoutée au milieu de base pour stimuler la formation d' embryons.

Ce premier essai ayant abouti à une organogénèse sans embryogénèse, nous avons utilisé dans une deuxième série d'expérience, du 2-4D additionné de substances diverses (hydrolysate de caséine (500 mg/l et 100 mg/l) et un mélange d'acides aminés). Ce milieu

est appelé E-S. Après une phase de callogénèse, les cals sont placés sur milieu dépourvu d'auxine mais contenant de l'hydrolysate de caséine (500 mg/l et 100 mg/l) et un mélange d'acides aminés, le saccharose est élevé à 40 g/l ; l'agar (Bacto-Difco) est apporté à la concentration de 5 g/l et le charbon actif (20 g/l) est ajouté stérilement au milieu de culture. Le Ph est ajusté à 5.5 - 5.6 . Les cultures sont placées d'abord à l'étuve (25°C, obscurité) pendant la première semaine puis à la lumière sous une photopériode (16h/8h) à 28°C.

2-3) Histologie

Les cals fragmentés en masse de 0,5 cm de diamètre sont fixés dans un mélange fixateur le Nawaschine (Lison, 1960) pendant 24 h ; les cals sont inclus dans de la paraffine. Les coupes sériées sont colorées à l'hématoxyline d'Heidenain puis montées dans du baume du Canada.

3- CULTURE DE RACINES EXCISÉES

3-1) Matériel végétal

Le matériel, constitué d'un premier lot de graines (Prov. 3157 N), et fourni par le CTFT de Nogent sur Marne (France) et d'un second lot récolté sur des pieds situés dans le domaine de la foire (Dakar). Les gousses étaient âgées de trois mois.

Les graines sont scarifiées à l'acide sulfurique concentré (98%) pendant 20 mn puis abondamment rincées à l'eau de robinet.

3-2) Désinfection

Après un trempage d'une minute dans de l'éthanol 70% nous avons procédé à une première désinfection de 4 mn dans de l'eau de javel commercial non diluée (12° chlore actif) suivi de 5 rinçages abondants à l'eau distillée stérile. A la suite d'une période d'imbibition de 30 mn, les graines sont soumises à une seconde désinfection de 2 mn suivie de plusieurs rinçages à l'eau distillée stérile.

3-3) germination

Les graines sont placées dans des germoirs contenant une couche de coton imbibée d'eau distillée stérile et la germination s'effectue en salle de culture à la pénombre (30°C).

3-4) Mise en culture

Les segments de racines sont prélevés aseptiquement au bout de 3 à 4 jours après la germination sur les jeunes plants. La racine est coupée à 2 mm au-dessous de l'hypocotyle et à 2 mm de l'apex racinaire ; les segments de racines mesurant environ 1,5 cm sont cultivés en boîte de Pétri scellées au Parafilm sous une température constante de 25°C et une lumière photopériodique de 16 h.

3-5) Milieux et conditions de culture

La croissance des racines latérales et le nombre de bourgeons formés sur les racines ont été déterminés au bout de 30 et de 55 jours sur différents milieux de culture M-S Murashige et Skoog (1962) ; Gamborg et al., (B5)(1968) ; Lloyd and Mc Cown (WPM) (1985); Bonner et Devirian (BDA) (1939), contenant des substances de croissance et des vitamines de Nitsch et Nitsch (1965) et en particulier la vitamine B12 (cyanocobalamine) indispensable au bon développement des racines. Le saccharose (30 g/l) et la gelrite (3,5 g/l) sont ajoutés aux milieux.

Nous avons testé plusieurs hormones de croissance à diverses concentrations telles que les cytokinines (BAP, 2iP, Kinétine, Zéatine), des polyamines (Spermine, Spermidine et Putrescine) et une phényl-urée la 1-3 DPU et des auxines (AIA et AIB).

Les plants ont été acclimatés en serre sur un substrat fait d'un mélange de perlite et de vermiculite (v/v) et régulièrement arrosés avec une solution nutritive de Hoagland et Arnon (1938).

Les différents traitements ont été évalués sur la base de l'intensité de la réponse à l'organogénèse "in vitro" .

3-6) Histologie des bourgeons adventifs

Le matériel est constitué de racines coupées en fragments de 10 à 15 mm ; ces racines prélevées 15 jours après la mise en culture, présentent des ébauches de néoformation caractérisées par la présence d'un gonflement du tissu cortical sous-jacent au rhizoderme.

Les racines sont fixées dans un mélange de Glutaraldehyde (4%) / Cacodylate de Sodium (0,2M) sous trompe à vide . L'inclusion se fait dans de la paraffine et les coupes sériées sont réalisées au microtome (Reichert-Jung).

Les résultats sont analysés grâce à un logiciel de statistique qui permet d'effectuer des analyses de variances (ANOVA) en comparant les moyennes et en déterminant les différences significatives entre les traitements (test de Fischer, de Sheffé et Dunnett).

C) ETUDE DE LA SYMBIOSE FIXATRICE D'AZOTE ATMOSPHERIQUE

1) Matériel végétal

Les graines d'*Acacia albida* (Provenance 3157N CTFT) sont scarifiées à l'acide sulfurique 98% pendant 20 mn. A la suite d'un rinçage abondant à l'eau de robinet, les graines sont désinfectées à l'eau de javel pure pendant 10 mn. Après 3 rinçages à l'eau distillée stérile, la première désinfection est suivie d'une période d'imbibition d'une heure. Une deuxième désinfection survient plus courte que la précédente (3 mn). Après plusieurs rinçages, les graines désinfectées sont placées dans des germoirs sur support de coton hydrophile imbibé d'eau distillée. La germination s'effectue dans les 48 heures à la pénombre sous une température de 27°C.

2) Influence de la richesse du substrat en éléments nutritifs

En testant la nature du substrat, le dispositif utilise deux types de sable en mélange avec de la vermiculite (4v /1v) :

- sable noir du jardin botanique contenant de la matière organique (SN)
- sable blanc siliceux de Cambérène dépourvu de toute matière organique (CM).

Le tableau comparatif de la composition minérale des deux types de substrat est donné (Tableau N°4) .

Les 2 types de substrat ont été préalablement stérilisés au four Pasteur à 180 °C pendant 2 Heures.

L'inoculation a été effectuée après transplantation des semis dans des pots dès l'apparition de la 2ème paire de feuilles, au moment où le système racinaire commence à se développer et à initier des racines secondaires. Des souches ont été utilisées en mélange au moment de l'inoculation: 43.6.3 ; 43.6.4; 45.6.1; 47.6.1; 45.6.2 et ~~47.6.1~~ (source MIRCEN de l'Afrique de l'Ouest); ces souches sont spécifiques d'*Acacia albida* .

Le dispositif est le suivant:

- 2 traitements SN et CM avec 12 individus par répétition
- un traitement témoin non inoculé

Le substrat prélevé avant la mise en place de l'expérience et à la fin de celle-ci, a été analysé par le laboratoire des sols du CNRA de Bambey où les échantillons ont été envoyés.

3) Influence des différentes souches sur la capacité de fixation d'azote

3-1) Dispositif en serre

Nous avons testé 3 souches de *Bradyrhizobium* dont 2 isolées sur *Acacia albida* (47.6.4 et 45.6.1) et une isolée sur *Acacia mangium* (Baye IR), deux souches de *Rhizobium* à croissance rapide dont l'une (PJ 12) a été isolée sur *Prosopis juliflora* et l'autre (TAL 1405) sur *Leucaena leucocephala*.

Tabl N° 5: Origine des souches utilisées pour l'inoculation

<i>Bradyrhizobium spp.</i>	Plante-hôte	Source	Pays d'origine
N° de souche			
47.6.3	<i>A. albida</i>	(1) Gueye (MIRCEN)	Senegal
47.6.4	<i>A. albida</i>	"id"	Senegal
45.6.1	<i>A. albida</i>	"id"	Senegal
Baye IR	<i>A. mangium</i>	(2)	Senegal
<i>Rhizobium spp</i>			
N° de souche			
Tal 1405	<i>Leucaena leucocephala</i>	(3)	Senegal
PJ 12	<i>Prosopis juliflora</i>	(4)	Senegal

(1) : Gueye M. : communication personnelle

(2) : Herridge D.F., Roughley R.J., (1975)

(3) : Halliday J., et Somasegaran P. (1984)

(4) : Diagne O. (Communication personnelle)

Ces 5 souches ont été inoculées à des plants d'*Acacia albida* âgés de 7 jours et cultivés en serre sur un substrat et des conditions d'arrosage identiques au &3-2-1. Les résultats ont été obtenus après 15 semaines de culture et concernent 20 individus.

3-2) Dispositif "in vitro" en tubes de culture

24 plantules âgées de 3 jours, sont transférées en tube pour la phase ultérieure d'inoculation.

Le dispositif "in vitro" de culture est constitué d'un tube en verre pyrex (22mm x 150mm) contenant une motte MILCAP (Milcap France S.A Tremontines) engainant une baguette de verre creuse ; à l'intérieur de la baguette , est introduit un ruban de papier filtre qui plonge

dans la solution nutritive et le liquide qui remonte par capillarité imprègne la motte MILCAP sans la saturer .

La plante est cultivée sur la motte et son système racinaire est placé entre la paroi du tube et la motte de façon à assurer la visibilité de l'ensemble du système racinaire au cours de sa croissance. L'obturation du tube est effectuée par un bouchon en cellulose qui favorise les échanges gazeux avec l'atmosphère ambiante.

Le milieu minéral liquide sur lequel est cultivée la plantule est celui de Broughton et Dilworth (1971) dilué du 1/4 sans azote dont le pH est ajusté à 6,7. Chaque tube de culture reçoit une quantité de 20 ml de milieu de culture renouvelable au bout de 3 semaines. Le dispositif est stérilisé à l'autoclave avant la mise en culture.

L'inoculation des plants est effectuée avec une culture pure de rhizobium en phase exponentielle sur YEM liquide (Vincent,1970) pendant 7 jours et contenant environ 10^9 bactéries par ml. 1 ml de la suspension bactérienne est déposé aseptiquement au contact de la racine ; la base du tube est recouverte d'un capuchon noir pour simuler l'absence de lumière du sol. Une photopériode (16h /8h) et une intensité lumineuse de $50 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ déterminent les conditions de la salle de culture.

4) Influence de l'ablation de l'apex racinaire

4-1) Dispositif en serre

Nous avons tenté de favoriser la rencontre entre la bactérie et la plante-hôte en augmentant la biomasse racinaire par l'augmentation des ramifications secondaires après ablation du méristème principal. A la suite de la germination et au cours de la première semaine de croissance de la plantule, nous avons coupé l'apex racinaire et inoculé avec la souche 47.6.4 ; la culture s'effectue sur un substrat et dans des conditions d'arrosage identiques au paragraphe 3-1.

4-2) Dispositif "in vitro"

Les plantules âgées de 3 jours, dont l'apex racinaire a été excisé, sont transférées en tube pour la phase ultérieure d'inoculation.

Le dispositif "in vitro" de culture est identique à celui décrit au paragraphe 3-2.

5) Influence des réserves azotées cotylédonaire sur la croissance initiale et sur la fixation biologique de l'azote

L'ablation des cotylédons intervient au moment de la mise en place des plants en serre.

Les plants ont subi 4 traitements différents :

1 : ablation totale des cotylédons et inoculation

2 : ablation partielle (1/2) des cotylédons et inoculation

3 : cotylédons entiers et inoculation

4: témoins non inoculés avec cotylédons entiers

5: plants inoculés entiers addition d'azote starter 1,3 mM/l de sulfate d'ammonium 7 jours après l'inoculation

Le dispositif utilisé est constitué de deux pots en plastique superposés. Le vase supérieur (8 cm de \emptyset) est rempli d'un mélange de substrat : perlite (8 vol) et aquastock (2 vol.), un hydro-reteneur constitué de cristaux de polyacrylamide. Le vase inférieur (6 cm de \emptyset) sert de réservoir de solution nutritive. Le liquide du 2ème pot remonte par capillarité grâce à la présence d'une mèche de nylon qui relie les 2 pots. L'arrosage est régulier (1 fois par semaine) avec le milieu de Broughton et Dilworth (1971) dilué du 1/4 sans azote.

6) Paramètres mesurés

6-1) l'infectivité des souches

Elle est définie comme étant un critère qui teste la capacité d'un micro-organisme donné à induire la formation de nodules sur une plante-hôte donnée. La mesure de l'infectivité se base sur des critères de nombre et poids sec de nodules formés pendant une période donnée. Le poids sec des nodules est obtenu après séchage des nodules à l'étuve (70°C) pendant une semaine.

6-2) L'effectivité

L'effectivité d'une souche de Rhizobium se traduit par l'augmentation de la croissance et de la teneur en azote des plantes inoculées par rapport à des plantes non inoculées.

- Croissance

La hauteur totale de la partie aérienne est mesurée. La biomasse des parties aériennes et racinaires est déterminée après séchage des échantillons (70°C) à l'étuve pendant une semaine.

- Dosage de l'azote total

L'azote contenu dans les différentes parties de la plante (partie aérienne, partie racinaire, nodules) a été dosé par la méthode Kjeldhal (Bremner, Mulvanet, 1982).

Après avoir pulvérisé les parties préalablement séchées, un échantillon de 150 mg de chaque plant est prélevé puis minéralisé dans des matras contenant 5ml de H₂SO₄ et 200 mg de catalyseur à base sélénium. Le matras et son contenu sont portés à ébullition pendant environ 2h 30 mn sur les rampes de minéralisation. La minéralisation est terminée lorsque le contenu du matras qui était coloré au départ devient translucide.

L'azote minéralisé sous une forme NH_4^+ est distillé. Le distillat recueilli sous forme ammoniacal en présence d'indicateurs colorés (vert de bromocrésol 0,033% et rouge de méthyle 0,066%) et d'acide borique est dosé par titration en présence de H_2SO_4 dilué du 1/4.

Le dosage de 1 mg de H_2SO_4 correspond à 1 mg d'azote. La teneur en azote pour un échantillon de 100 mg rapportée au poids sec total des différentes parties permet de déterminer la quantité totale d'azote contenue dans chaque plante.

-Mesure de l'ARA

L'activité réductrice d'Acétylène (ARA) (Hardy et al., 1968) est dosée par chromatographie en phase gazeuse, à ionisation de flamme (DELSI, série 330).

Les plants issus de culture de serre sont débarrassés du substrat adhérent aux racines, la plantule est coupée au niveau du collet et les racines sont enfermées hermétiquement dans des flacons à sérum. 10% du volume d'air du flacon est prélevé puis remplacé par un volume équivalent d'acétylène. L'incubation se fait pendant 30 mn à température ambiante pour permettre à la nitrogénase de réduire l'acétylène en éthylène. Au bout du temps d'incubation des échantillons gazeux d'un ml sont prélevés à l'aide d'une micro-seringue puis injectés dans la colonne. Le pic d'éthylène obtenu est fonction de la quantité d'acétylène produite par l'enzyme. La quantité d'éthylène produite détermine l'ARA, elle s'exprime en moles d'éthylène produites par heure et par plante.

L'ARA spécifique ou SARA est déterminé par le rapport ARA/ poids sec des nodules. Cette valeur détermine l'activité nitrogénasique spécifique aux nodules.

7) Observation des premiers stades de l'infection

Des jeunes plants d'*Acacia albida* sont inoculés avec une souche de *Bradyrhizobium* 47.6.4 ; les prélèvements ont été effectués 10 jours, et 15 jours après inoculation.

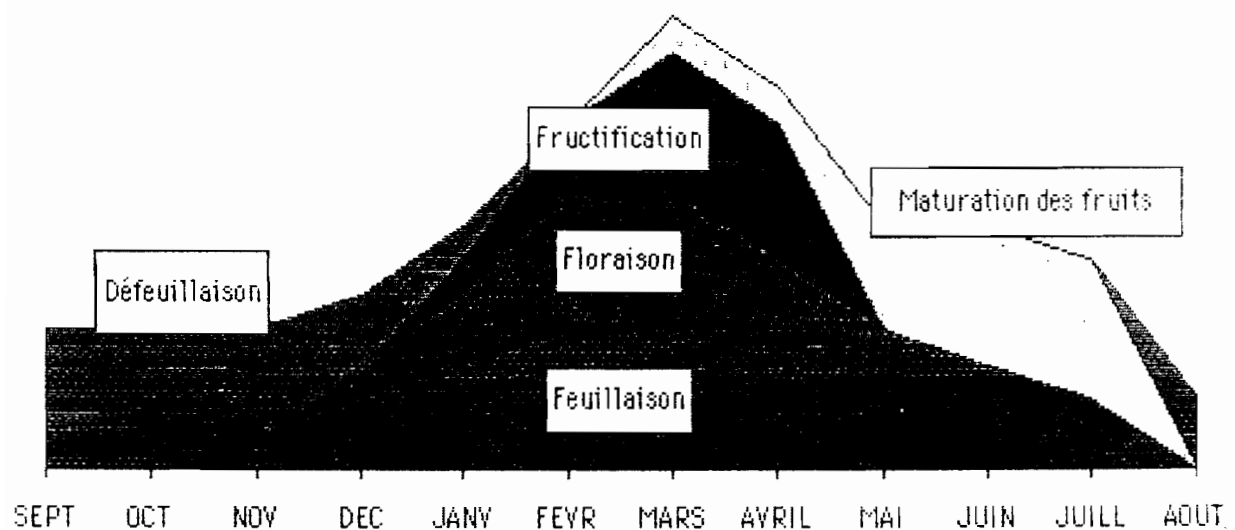
Les racines débarrassées du substrat, sont d'abord fixées dans un mélange de Glutaraldehyde / Cacodylate de sodium puis rincées dans le tampon cacodylate. Les racines sont décolorées par une solution concentrée d'eau de javel (16°CI) pendant 4 heures sous vide partiel, suivi de plusieurs rinçages à l'eau distillée. Elles sont colorées au bleu de méthylène (0.1%) pendant 5 minutes puis rincées à l'eau distillée pour éliminer l'excès de colorant.

Les observations se font au microscope optique en contraste de phase.

RESULTATS

**BIOLOGIE DE LA
REPRODUCTION**

Fig N° 2: Phénologie d'Acacia albida étudiée sur 2 populations (UNI et FOI) situées dans la région de Dakar au cours de l'année 1991-1992



Les paramètres phénologiques (défeuillaison, feuillaison, floraison, fructification et maturation) sont quantifiés en utilisant les critères suivants: 0= Absence totale; 1= 25% d'abondance; 2= 50% d'abondance; 3= 75% d'abondance; 4= 100% d'abondance.

A) BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION

1) PHÉNOLOGIE

Tous les arbres étudiés sont localisés dans la région de Dakar ; cependant la région de Dakar bénéficie d'un microclimat très particulier lié à l'influence de l'alizé maritime et les pieds de Kad y sont généralement très tardifs par rapport au centre du Sénégal. Nongonierma (1978) avait signalé ces décalages phénologiques ainsi que l'étalement dans le temps de la floraison sur certains pieds situés en bordure de mer.

Nous avons suivi le cycle phénologique chez *A. albida* durant un an dans la zone d'étude ; nous avons pu constater que (Fig N°3) :

- La feuillaison débute dès fin Octobre, l'optimum est situé entre Février et Avril et les arbres sont totalement défeuillés à partir du mois de Juillet.

- La floraison débute au début du mois de Novembre pour se terminer au mois de Mai avec un pic de floraison situé entre le mois de Février et le mois de Mars.

La floraison débute pratiquement en même temps que la feuillaison ; le décalage entre feuillaison et floraison ne dépassant pas 6 ou 7 jours; sur quelques pieds, nous avons même pu constater que la floraison pouvait précéder la feuillaison.

Au sein des différentes populations étudiées, nous avons pu constater une grande variabilité dans les stades phénologiques; les différentes phases sont très étalées dans le temps ; en effet sur un même site, il est fréquent de trouver tous les stades depuis le début de la feuillaison à la fructification .

D'autre part il n'est pas rare de trouver sur un même pied 2 stades phénologiques concomitants, floraison et fructification.

Il est fréquent de constater que les branches situées face au vent (orientation NE) sont beaucoup moins florifères que les branches situées à l'opposé (orientation SW) ; l'influence du vent se fait nettement sentir dans cette zone où l'alizé maritime souffle en permanence vers les côtes.

Généralement la floraison est relativement homogène sur la totalité du houppier qui ne se trouve pas du côté du vent (Pl 2 fig A).

En outre, il a été constaté que certains arbres n'ont pas fleuri à cette période de l'année. En effet, nous avons pu constater que sur un des sites (FOR), de nombreux arbres bien que feuillés, n'avaient pas fleuri. Ces arbres se trouvent sur un sable dunaire très pauvre en bordure de mer (500 m de la côte). L'absence de floraison serait liée à une pluviométrie insuffisante l'année précédant l'observation entraînant un abaissement du niveau de la nappe phréatique. L'insuffisance ou l'absence de ressources en eau rendant la survie de la plante difficile, seules quelques rares feuilles sont produites.

Ainsi, la diversité des stades phénologiques paraît liée non seulement à des facteurs endogènes intrinsèques propres aux individus mais aussi à des facteurs externes liés au climat.

2) CARTOGRAPHIE DU RAMEAU INFLORESCENTIEL

Les rameaux inflorescentiels se développent au niveau des ramifications axillaires portant de jeunes pousses de l'année en phase de croissance végétative. Nous avons constaté que la plupart des rameaux inflorescentiels se trouvent en position terminale ou sub-terminale. Les inflorescences sont terminales; cependant, nous avons observé au sein de la population ORS (6 sur 50 cas observés) des inflorescences se terminant par un bourgeon végétatif à fonctionnement plastochronique élaborant une pousse feuillée terminale .

Sur une quarantaine de rameaux secondaires portant des inflorescences, nous avons noté la position des noeuds portant une ou plusieurs inflorescences.

La figure N°4 schématise la fréquence d'apparition des inflorescences sur les noeuds, en nous basant sur leur position par rapport à l'axe principal .

Le nombre d'inflorescences formées est optimal entre le 7ème et le 24 ème noeud; c'est à ce niveau que l'induction florale est maximale; sur les noeuds d'ordre inférieur (1 à 6) ou supérieur (24 à 48), la fréquence et le nombre de fleurs formées sont réduits, au-delà du 48ème noeud on ne trouve plus d'inflorescence.

3) DYNAMIQUE DE LA FLORAISON

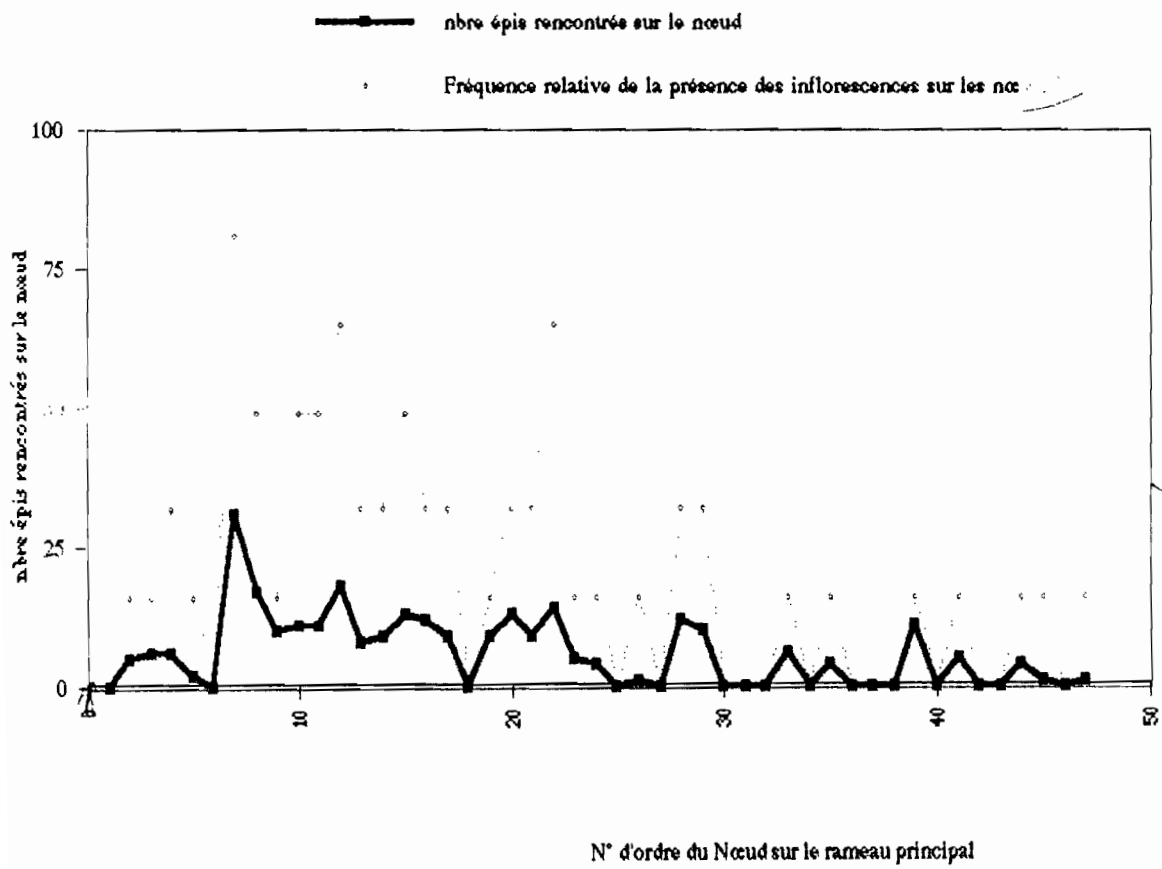
Elle est progressive et elle s'étale dans le temps sur une durée de 24 à 72 heures. Les fleurs s'ouvrent de la base vers le sommet du rameau inflorescentiel (Pl. 2 fig B).

Cette ouverture ne se réalise que lorsque les boutons floraux ont atteint une taille de 5 à 6 mm et que l'épi s'est allongé pour atteindre sa taille optimale d'environ 10 cm. Les fleurs basales qui arrivent à maturité plus tôt, s'ouvrent les premières. Elles sont morphologiquement hermaphrodites au moment de la pollinisation avec un ovaire, un style et un stigmate non atrophiés ainsi que des anthères normales.

L'ouverture des fleurs est aussi liée à leur position par rapport au soleil; elles s'ouvrent généralement le matin et ce sont les fleurs situées face au soleil qui s'ouvrent les premières avant celles opposées au soleil. Elles sont souvent butinées par les insectes (papillons et guêpes) (pl. 2 fig C)

La plupart des fleurs situées à la base se dessèchent et tombent avant l'ouverture de la totalité des fleurs de l'épi.

Fig N° 4 : Fréquences d'apparition des inflorescences et du nombre d'axes inflorescentiels formés en fonction du numero d'ordre des noeuds pris à partir de la base d'insertion du rameau chez *A. albida*



BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION CHEZ *A.albida*

PIANCHE N° 2

**Floraison chez *A. albida* au mois de Février sur le site
FOI**

Fig. A : *A. albida* en pleine floraison

Fig. B : Dans les inflorescences en épi, l'ouverture des fleurs est asynchrone et s'effectue de façon acropète.

Fig. C : La pollinisation se fait principalement par les insectes et en particulier par les papillons et les guêpes.

A



B



C



4) MORPHOLOGIE FLORALE

4-1) Description de l'inflorescence

Les fleurs sont groupées en inflorescences sur un rameau axillaire ou terminal.

L'inflorescence, de couleur crème puis jaune à maturité, se développe toujours sur des axes secondaires ; c'est une inflorescence indéfinie de type épi portant des épines stipulaires courtes.

Les caractères des organes floraux montrent une homogénéité dans le nombre total de fleurs formées par inflorescence qui varie dans une faible mesure entre 75 et 120 (Tabl. N° 6); les populations à l'exception de celle de HAN ne présentent pas de grande dissemblance.

Le nombre moyen d'inflorescences formées par rameau inflorescentiel est de 4,41. Les boutons floraux ont une taille de 5 à 6 mm au moment de leur ouverture.

Le calice est légèrement pubescent et caduque après épanouissement de la fleur.

4-2) L'androcée et le gynécée

L'ovaire est infère avec un seul carpelle, mais nous avons observé des cas (2%) de fleurs possédant deux carpelles . Le style est long de 6 à 7 mm (Pl. 3-fig A) et terminé par un stigmate en forme de coupelle d'un diamètre de 150 μm en moyenne (Pl.3-fig B). L'observation d'une coupe longitudinale du carpelle au microscope électronique à balayage a permis de voir que les ovules sont situés sur deux rangées (Pl.3 fig C) ; leur nombre varie de 18 à 25 et ils sont de type campylotrope (Pl. 4- fig A et B).

L'androcée est composée d'un nombre variable d'étamines soudées à leur base; l'insertion du filet sur l'anthère est dorsifixe et la déhiscence de l'anthère s'effectue sur une fente longitudinale (Pl. 4 fig C). Le nombre de filets staminaux reste pratiquement constant aussi bien entre individus éloignés qu'au niveau d'une même inflorescence (50 à 55) (Tabl. N° 3); cependant nous avons eu un groupe d'individus où le nombre d'étamines est beaucoup plus faible (32).

Le nombre total de grains de pollen produit par épi inflorescentiel est le produit du nombre fleurs, du nombre d'anthères et du nombre de polyades par anthère qui est constant (8). Cette quantité de pollen émise lors de la floraison rend compte de l'importance de l'investissement mâle consenti par la plante au cours d'une période reproductive. Cette quantité varie de 4652 grains de pollen pour la population DAL à 24681 pour la population ORS (Tabl. 6).

Tabl. N° 6: Caractères des organes floraux d'*A. albida* observés sur 5 sites du Sénégal en relation avec la production de pollen

Population	Longueur (cm) de l'épi inflorescentiel	Nbre fleurs/ inflorescence	Nombre d'anthères / fleur	nbre total pollen/ inflorescence (a)
ORS	8,87 a	90,42 a	34,12 b	24681,04
UNI	8,5 a	87,51 a	52 a	36404,16
HAN	6,56 b	76,5 b	51,41 a	31462,92
DAL	10,08 a	110,6 a	52,3 a	46452
FOR	9,3 a	92,57 a	52,5 a	38879,4

(a) : Nombre total pollen émis par une inflorescence = Nbre total fleurs x nbre d'anthères x 8 polyades par anthère

Tabl N° 7: Nombre d'ovules par fleur et de monades par polyade observé chez 5 populations d'*Acacia albida*

Population	Nombre d'ovules / carpelle	Ratio monades/ polyade	Ratio polyade/ovule
ORS	19,25 a	30,66 a	1,5
UNI	20,57 a	32,89 a	1,5
HAN	22,09 a	32,73 a	1,5
DAL	19,52 a	25,05 b	1,3
FOR	22 a	24,87 b	1,13

Le grain de pollen, est constitué chez *A. albida* d'un ensemble de monades agrégées en une polyade unique (Pl. 4 fig D), dont le diamètre varie entre 80 et 100 μm ; une polyade chez *A. albida* est constituée de 2 à 3 couronnes de monades dont le nombre maximum observé est de 36. Il existe une très grande homogénéité entre individus au sein d'une même population concernant le nombre de monades par polyade. Par contre, au niveau des populations, nous avons identifié deux groupes de populations en fonction du nombre de monades observées:

- les populations ORS UNI et Han ayant un nombre de monades élevé (32 à 36)
- les populations Dal et FOR avec un nombre de monades par polyade plus faible (28 à 30) .

La monade présente une éxine pratiquement lisse, finement grenue (Pl. 4 fig D) .

Le rapport moyen du nombre de monades par polyade sur le nombre d'ovules par ovaire et de l'ordre de 1,5 (Tabl. 7).

Des coupes ultra-fines du grain de pollen et l'observation au microscope électronique à transmission, montrent que la paroi de la monade est structurée en deux enveloppes : l'intine, l'exine (Pl. 5 fig A , B et C).

- a) l'intine : elle constitue la couche la plus interne directement appliquée au plasmaleme et elle est d'origine gamétophytique puisqu'elle est directement synthétisée par la cellule gamétogène; elle est constituée d'une matrice opaque parcourue par de nombreuses microfibrilles. Au niveau des pores d'aperture ou zones germinatives (Pl. 5 fig C) la matrice s'épaissit et contient des microtubules, des vésicules et des composés protéiques qui seront mis à contribution au moment de la formation du tube pollinique.

- b) l'exine située à l'extérieur par rapport à l'intine (Pl. 5 fig B) est constituée d'un matériel plus dense lamellaire formé par des dépôts successifs extra-cellulaires de polymères de glucanes et d'esters de caroténoïdes : la sporopollenine. L'exine est synthétisée par les cellules de la paroi tapétale et par conséquent de nature sporophytique.

L'exine est constituée de trois parties :

- une assise homogène, continue constituée d'une concrétion de lamelles : la néxine. Cette néxine perd son homogénéité et sa régularité au niveau des zones d'aperture où les lamelles s'intercalent avec une matrice plus claire de nature différente polysaccharidique (Heslop-Harrison 1969); cette disposition lamellaire est clairement visible à la zone d'aperture ((Pl. 5 fig C).

- une assise plus externe à la néxine : la séxine . Elle est plus hétérogène, granulaire et contient de nombreuses vésicules et granules.

- le tectum

L'écine est recouverte d'une épaisse paroi de callose qui se forme très tôt au moment de la méiose et de la formation de la tétrade; cette callose s'hydrolyse en particulier dans les espaces compris entre deux monades (Pl. 5 fig A); par contre, bien que réduite, elle persiste à la partie externe et libre de chaque monade où elle constitue le tectum; elle a pour rôle essentiellement de protéger la monade contre une dessiccation rapide.

Il faut remarquer que chez *Acacia albida* il n'existe pas de columelles au niveau de l'écine.

Au moment de la maturation du grain de pollen, on note une série de modifications au sein de la monade qui préfigurent son évolution ultérieure vers la germination. La cellule végétative se déshydrate on observe de nombreuses vacuoles de très petite taille qui occupent la totalité du contenu cytoplasmique.

Le noyau végétatif (Pl. 6 fig A) est constitué d'une masse homogène, dense, allongée et très volumineuse. La cellule reproductrice ou cellule spermatogène est multilobée (Pl. 6 fig B), allongée et est située au centre de la cellule végétative. Cette cellule spermatogène est tout à fait caractéristique, elle présente un aspect grêle et est multilobée. Elle se divise à la fin de la maturation en deux cellules reproductrices spermatogènes (Pl. 6 fig C).

5) ETUDE DE LA REPRODUCTION

5-1) Fructification

Les fleurs se fanent et tombent rapidement au bout de 72 heures ; seules les fleurs fécondées persistent sur le pédoncule floral; la chute des fleurs est progressive tout comme leur ouverture ; les premières à tomber sont celles situées à la base de l'épi puis c'est au tour des fleurs du milieu et enfin de la partie supérieure.

Les fleurs fécondées sont reconnaissables par le style très long qui demeure turgescent alors que les organes de la fleur non fécondée sont rapidement fanés. L'infrutescence commence à ce moment son développement, l'ovaire grossit devient chlorophyllien, les enveloppes s'épaississent et de très nombreux poils apparaissent sur toute la surface de la gousse en formation. Les graines se développent à l'intérieur des téguments après que la gousse ait atteint son stade ultime de croissance.

Nous avons constaté que les fleurs supérieures étaient plus portées vers la production de fruits que les fleurs basales (Tabl. N° 8). La fréquence du nombre de gousses immatures diminue progressivement de la partie apicale de l'épi vers sa partie basale.

On pourrait penser que l'épi présente une protandrie sur les premières fleurs formées et situées à la base du pédoncule floral. Ces fleurs joueraient plutôt un rôle attractif et productrices de pollen. Les fleurs situées à l'extrémité de l'inflorescence, par leur position, sont favorisées pour recevoir du pollen provenant des autres arbres ; elles se développent et

Tabl. N° 8 : Fréquences observées de la position relative des gousses immatures sur l'axe inflorescenc par rapport à la zone d'insertion de l'épi sur le rameau (observations effectuées sur 4 sites du Seneg

Position des gousses sur l'axe inflorescentiel			
Population	Distale	Médiane	Proximale
ORS	55%	33%	11%
UNIV	54%	31%	6%
HAN	72%	21%	6%
FOI	58%	33%	8%

Tabl.N° 9 : Caractéristiques de la formation des fruits et des graines chez *A. albida* en relation avec le nombre d'ovules contenus dans le carpelle (observations effectuées sur l'ensemble des arbres situés s les différents sites)

Population	Nombre de gousses/ axe inflorescentiel	nombre de graines / gousse (1)	Nombre d'ovules / carpelle (2)	déficit de remplissage du carpelle
ORS	1,31 b	14,35 a	19,25 a	25,40%
UNI	1,1 b	14,25 a	20,57 a	30%
HAN	2 a	15,04 a	22,09 a	31%
DAL	1,29 b	15,3 a	19,52 a	21,60%
FOR	1,2 b	12,35 a	22 a	43,80%

Déficit de remplissage des carpelles = $\frac{\text{nbre d'ovules par carpelle}(2) - \text{Nbre de graines par carpelle (1)}}{\text{nbre d'ovules par carpelle (2)}}$

s'ouvrent plus tardivement que les fleurs basales; elles sont essentiellement destinées à la fécondation.

Le nombre moyen de gousses matures qui sont uniloculaires et indehiscentes qui se forment par épi inflorescentiel est de 1,5 (Tabl. N° 9) et on trouve un maximum de 4 gousses par épi inflorescentiel. Le nombre de graines formées par gousses est aussi variable ; il varie de 8 à 25 avec une moyenne de 15 graines environ par gousse.

Chez les différentes populations d'*Acacia albida* étudiées, le rendement de la fécondation estimé en termes de pourcentage de remplissage du carpelle est en moyenne de 70%. Ceci rend compte d'un déficit de remplissage du carpelle qui est d'environ 30%. Le taux maximal de remplissage observé est de 94,5%.

5-2) Réceptivité stigmatique

Les stigmates d'*A. albida* présentent une réceptivité décelable par la coloration rouge caractéristique de la réaction enzymatique estérasique (Pl. 7 fig A).

La période de réceptivité (Tabl. 10) débute au moment où les fleurs commencent à s'ouvrir lorsque 80% des stigmates prennent une coloration rouge peu marquée et qui se limite à la partie supérieure du style tout autour de la coupelle.

Au moment où les filets staminaux et les styles se délient et sont en extension, la réceptivité est moyenne avec une coloration décelable sur environ 3 mm de longueur de style.

A l'ouverture des anthères pour l'émission du pollen, 65,5% des stigmates sont intensément colorés ; ici la coloration ne se limite pas à la partie supérieure du style, mais sur une longueur plus importante de près de 6 mm .

A la fin de l'anthèse, alors que les filets staminaux perdent leur turgescence, on constate que 85% des stigmates présentent une réceptivité maximale. La réaction se maintient bien que moins importante (42%) jusqu'à ce que le style soit ramolli et que l'ensemble des pièces florales soit fané.

Il apparaît ainsi que la réceptivité stigmatique n'est pas limitée à la période de l'anthèse bien qu'elle soit maximale à ce stade. En effet, elle se prolonge jusqu'à la fanaison puisqu'on constate souvent que lorsque les anthères ont dégénéré, le style et le stigmate sont encore turgescents pour quelques heures encore.

Les stigmates détendus un peu avant l'anthèse, exsudent un mucus abondant visible au centre de la coupelle du stigmate, et qui est un adhésif puissant auquel les polyades viennent s'accoler; le mucus est très adhésif ce qui retient les grains de pollen même à la suite de rinçages.

Tabl N° 10: Test de mise en évidence de la réceptivité stigmatique par la coloration rouge caractéristique des estérases stigmatiques chez *A. albida*

Traitements	Nombre	Très coloré %	peu coloré %	pas coloré %
A	24	0	50	50
B	32	0	83	17
C	45	51,80	48,2	0
D	40	65,5	31	3,5
E	38	85	12	3
F	27	42	58	0

A = bouton floral de 5 mm

B = début d'ouverture de la fleur le stigmate étant encore replié à l'intérieur

C = Ouverture de la fleur le stigmate émergeant de la masse des filets staminaux

D = Anthèse

E = Fin de l'anthèse début de la fanaison

F = dernières fleurs demeurées sur l'épi inflorescentiel après que toutes les autres se soient fanées et présentant un style encore turgescent

Tabl. N° 11 : Pollinisation naturelle et nombre de polyades rencontrés sur les stigmates au moment de l'ouverture de la fleur chez *A. albida*

Traitements	Nombre	% de stigmates portant des polyades	% de stigmates portant		
			1 polyade	2polyades	3polyades
C	45	12,5%	100%		
D	40	61,50%	75%	25%	0%
E	38	76,90%	80%	16%	3,3%

Fig. N° 5: Viabilité du pollen d'*Acacia albida* exprimé en intensité de fluorescence (test FCR) en fonction de la durée de stockage; les polyades ne sont pas libérés des anthères.

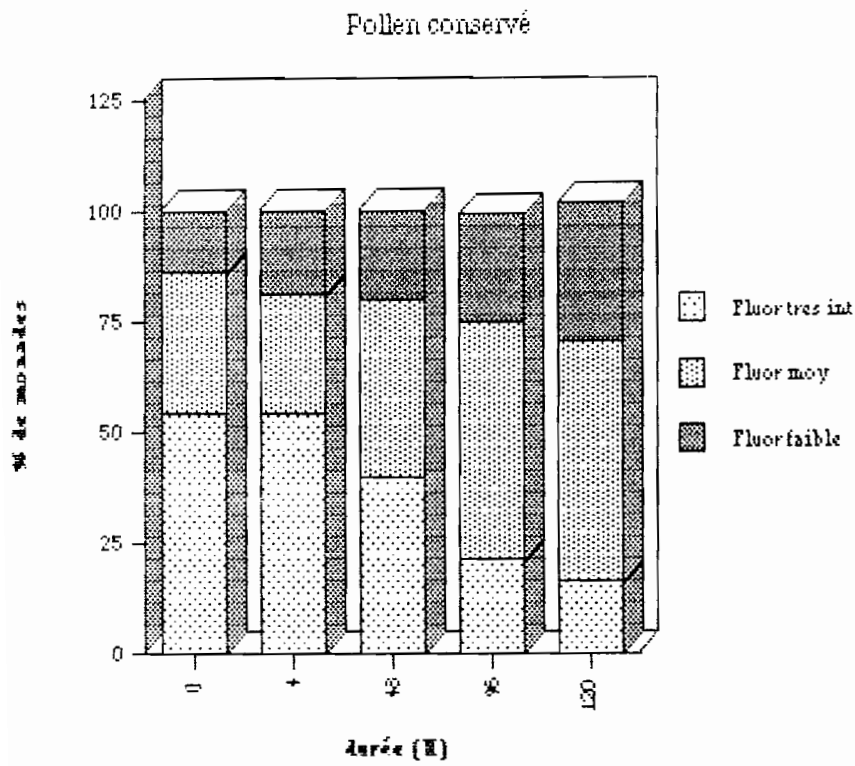
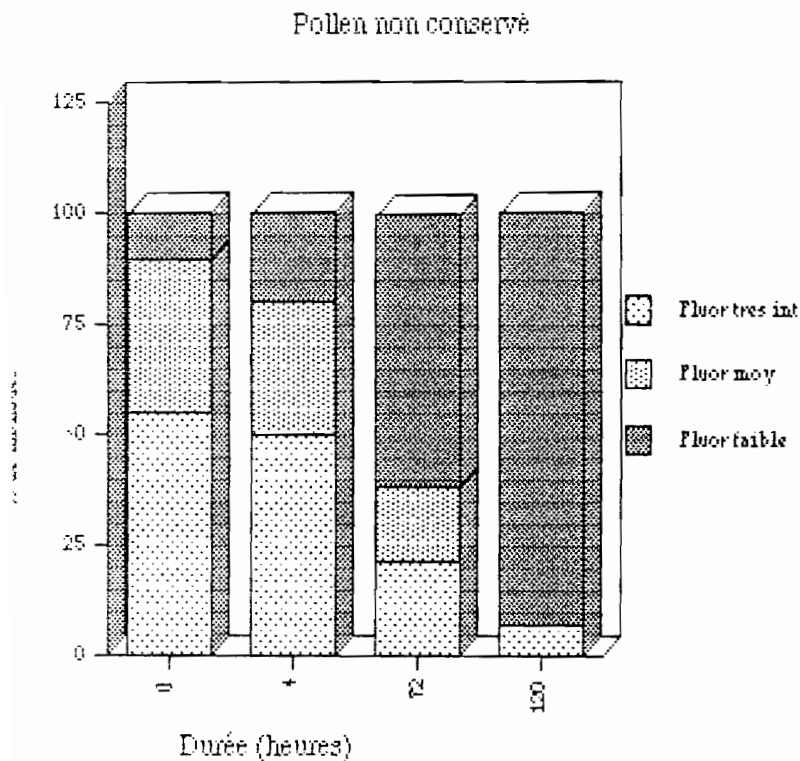


Fig. N° 6: Viabilité du pollen d'*Acacia albida* exprimé en intensité de fluorescence (test FCR) en fonction de la durée de stockage; les polyades sont libérés des anthères et conservés dans une boîte de pétri à température ambiante.



Les polyades s'accrochent sur les stigmates sur la face comme pour former un couvercle mais aussi parfois sur un des bords de la polyade (Pl. 7 fig B et D); et il n'est pas rare de trouver 2 à 3 polyades accrochés sur un stigmate (Pl. 7 fig C).

Nous avons déterminé la fréquence relative du nombre de polyades rencontrés sur les stigmates au cours de la floraison (Tabl N° 11).

Au moment où les filets staminaux sont en extension et se délient (tabl. 7), on observe très peu de polyades sur les stigmates ; lorsque le pollen est éjecté et à la fin de l'anthèse on observe respectivement 61,5% et 76,9% de stigmates portant des grains de pollen.

75 à 80% des stigmates ne portent qu'un seul grain de pollen, et 16 à 25% en portent 2.

5-3) QUALITE ET VIABILITE DU POLLEN D'*A. albida*

A) Tests FCR

La qualité et la viabilité du pollen ont été testés pendant 120 heures (5 jours après prélèvement). L'observation au microscope en épifluorescence montre des grains de pollen présentant des degrés d'intensité d'émission de fluorescence. Nous avons distingué 3 grands groupes : les monades à intense fluorescence, les monades à fluorescence moyenne et les monades à fluorescence faible voire nulle. Les résultats sont rassemblés sur les figures N° 5 et 6.

- grains de pollen conservés à l'intérieur des pièces florales (fig N°5)

Aussitôt après prélèvement des fleurs, l'activité estérasiqque est très intense sur 50% des monades alors que 31% ont une fluorescence moyenne ; il est intéressant de noter que 14 % environ des monades sont morts dès l'ouverture de la fleur.

La viabilité se maintient pendant 4 jours avec cependant une baisse de l'intensité ; la plupart des monades (80%) conservent une activité moyenne et le nombre de monades dégénérées (24%) augmente avec le temps ; 5 jours après la vitalité a baissé et seul 70 % des monades présente une fluorescence moyenne.

- grains de pollen isolés des anthères (fig N°6)

Sur les grains de pollen isolés des anthères et placés dans des boîtes de Pétri à température ambiante, la perte de viabilité survient très rapidement au bout de 72 heures où seul 38% des monades demeurent intactes. Au bout de 5 jours la quasi totalité des monades (93%) a dégénéré.

B) Germination "in vitro"

B-1) Optimisation des conditions de germination "in vitro" .

B-1-1) développement du tube pollinique

Lorsque les conditions de culture sont favorables, le pollen émet au niveau de la zone d'aperture ou zone germinative constituée ici par une ligne de moindre résistance , un tube pollinique (Pl. 8 fig 1 et 2).

Le tube pollinique se développe sur le milieu solidifié par la gélose ; il est constitué de trois zones (Pl. 8 fig.3)

- une zone proximale à cytoplasme très dense contenant le noyau végétatif, les noyaux reproducteurs et de très nombreux organites (Z. a)
- une zone médiane moins dense et très vacuolisée (Z.m)
- une zone distale claire et translucide (Z. d).

Le tube pollinique est entouré d'un manchon de substances qui, d'une part maintient la turgescence nécessaire à la croissance du tube pollinique et d'autre part, en secrétant des enzymes, facilite la digestion de la gélose (Pl. 8 fig 4).

Par ailleurs, en plaçant l'extrémité du style à proximité des grains de pollen, on peut constater une croissance polarisée des tubes qui se développent en direction du stigmate (Pl. 8 fig. 5).

B-2) Influence de la composition minérale du milieu de culture

Nous avons effectué des essais liminaires pour déterminer les conditions permettant une germination du pollen d'*A. albida*. Il a tout d'abord été constaté que l'addition de bore (H_3BO_3) s'est révélée indispensable à une bonne germination des grains de pollen ; en effet en l'absence de bore, le taux de germination est de 3% et les tubes polliniques formés sont très courts et repliés sur eux-mêmes. De même nous avons constaté que la germination est favorisée sur un milieu solidifié par le phytigel par rapport à l'agar (Bacto-Difco Agar).

Ensuite, nous avons cherché à optimiser ces milieux de culture pour la germination pollen. En comparant deux milieux de culture (BK et GM) (voir Annexe pour la composition minérale), le taux de germination le plus important est obtenu sur le milieu BK, le nombre de monades germées équivalent au nombre de tubes polliniques est aussi plus élevé. Au bout de 12 heures de culture les tubes atteignent une longueur moyenne de 334 μm (Tabl N°12).

B-1-3) Influence de la concentration en saccharose

La germination du pollen et la croissance du tube pollinique chez la plupart des espèces d'*Acacia* s'effectue en présence d'exsudats libérés au niveau du stigmate. Ces exsudats

Tabl. N° 12: Comparaison de deux milieux synthétiques B&K et GM en fonction de leur aptitude à favoriser la germination "in vitro" des polyades, la formation et l'élongation des tubes polliniques d'*A. albida*

MILIEUX	Nbre polyades observées	% germination	nbre TP(*) par polyade	longueur TP(*) (µm)
BK	79	68,3	7,32 a	334,2 a
GM	51	64,7	3,51 b	225,8 a

(*)T P : Tubes polliniques

Tabl. N°13: Influence de la concentration en saccharose sur la germination des polyades , le nombre et la croissance des tubes polliniques(TP) d'*A. albida* cultivés sur milieu B&K (les résultats sont obtenus après 12 h de culture)

Saccharose (g/l)	N total observ.	germés %	nbre TP(*) par polyade	longueur TP(*) (µm)
5	73	5,5	2,25 c	184,6 b
10	130	68,46	4,21 b	371,1b
20	198	87,3	7,19 a	865 a
30	315	82,8	5,61 b	610,5 a

(*) T P : Tubes polliniques

Tabl N°14 : Influence du pH sur la germination des polyades d'*A. albida* cultivés sur milieu BK

Ph	Nbre polyades	germés	non germés
pH 5	156	100%	0%
pH 6	143	100%	0%
pH 6,4	102	68%	33,87
pH 7	124	70%	30%

Tabl N° 15 : Germination du pollen d'*A. albida* et formation des tubes polliniques (TP) en fonction de la durée de stockage des polyades dans les tissus de l'anthere

Temps après récolte	0 h	48 h	72 h	96 h	120 h
N	39	55	46	36	32
% polyades germés	87%	85%	45%	39%	0%
Nbre TP* /polyade	12,43	12,55	7,19	5,61	0
Longueur TP(µm)	855	805	720	860	0

(*) T P : Tubes polliniques

contiennent entre autres éléments des sucres qui se sont avérés indispensables à la germination du pollen.

Le sucre contenu dans le milieu de culture doit se trouver en quantité optimale pour favoriser la germination et le développement des tubes et d'autre part établir un équilibre osmotique adéquat à la réhydratation et à une bonne turgescence des cellules.

Plusieurs concentrations en saccharose ont été testées (tabl. N°13), les milieux contenant 20 g /l de saccharose stimulent favorablement la germination (87% de polyades germés) de même que le nombre de tubes polliniques formés (7,19) et leur croissance dans le milieu gélosé (865 μm). Les tubes atteignent une longueur maximale de 1500 μm .

B-1-4) Influence du pH du milieu de culture

Le milieu de base B-K additionné de 20g/l de saccharose a été utilisé. Sur ce milieu de base le pH a été ajusté à différentes valeurs (5, 6, 6,4 et 7) pour tester l'influence du pH sur le pouvoir germinatif du pollen (Tabl. N° 14). nous avons constaté que l'optimum de germination est obtenu aux pH acides, pH où la quasi totalité des polyades émet des tubes polliniques. Le pH, en présence de 20 g/L de saccharose, n'est limitant que lorsqu'il tend vers l'alcalinité et dans ces conditions, les tubes polliniques émis sont souvent enroulés sur eux-mêmes.

B-2) Test de la viabilité du pollen par la capacité de germination "in vitro"

Les tests fluorochromiques ont été couplés à des tests de germination in vitro" afin de corroborer les résultats obtenus (Tabl. N°15). Le taux maximal de polyades en germination (87 %) est obtenu aussitôt après le prélèvement des polyades. Le nombre de tubes polliniques par polyade qui se développent au moment de la germination est en moyenne de 12 avec un maximum de 17 tubes. Au bout de 48 heures, le taux de germination par polyade ainsi que le nombre de tubes polliniques formés par polyade ne varient pas. La durée de stockage n'affecte les grains de pollen qu'à partir d'une période de 72 heures où on constate une chute du taux de germination (41%) et la réduction du nombre de tubes polliniques formés (7,19).

5 jours après la date du prélèvement, l'ensemble des grains de pollen a perdu la capacité à germer. Il est intéressant de noter qu'en l'absence de facteur limitant lié au milieu de culture, la durée de stockage n'affecte pas le développement des tubes polliniques dans le milieu de culture ; en effet l'allongement des tubes polliniques ne présente pas de différence significative.

Tabl 13: Résultats des expériences de pollinisation contrôlée chez *A. albida* : détermination des rendements de la pollinisation au niveau individuel et au niveau traitement

Arbre N°		UNIV 1	UNIV 2	UNIV 3	UNIV 4	UNIV 5	UNIV 9	F 7	F 8	total	rendement
traitement											moyen par traitement
	nbre épis	16	3	11	5	7	2		8	52	
Témoins auto sans manipulats	nbre gousses	4	0	0	0	0	1		1	6	
	rendements individuels	0,25	0	0	0	0	0,5		0,125		0,125
	nbre épis	7	4	4	3	6	3		6	33	
Auto poches secouées	nbre gousses	1	1	0	0	0	1		0	3	
	rendements individuels	0,14	0,25	0	0	0	0,33		0		0,102
	nbre épis	7	7	16	4	3	3	4		44	
Auto fleurs badigeonnées	nbre gousses	1	2	1	2	0	0	0		6	
	rendements individuels	0,14	0,28	0,06	0,5	0	0	0			0,136
	nbre épis	6	13	9	3	2	5	5	3	4	50
Allo-pollinisation	nbre gousses	3	8	1	0	3	6	3	1	0	25
	rendements individuels	0,5	0,61	0,11	0	1,5	1,2	0,6	0,33	0	0,538
	nbre épis	16	7	6	9	14	3	5	13	5	63
pollin naturelle (insectes)	nbre gousses	4	9	3	6	3	5	4	8	3	45
	rendements individuels	0,25	1,28	0,5	0,66	0,26	1,66	0,8	0,61	0,6	0,735

5-4) Pollinisation contrôlée

Sur les arbres étudiés, après avoir procédé à l'ensachage des fleurs (Pl. 9 fig A et B), au bout de 3 à 4 jours, nous avons observé l'ouverture de la totalité des boutons floraux à l'intérieur des poches de fécondation. L'atmosphère ambiante à l'intérieur des poches n'inhibe pas l'évolution normale des boutons en fleurs. Les sachets pollinisés ou non ont été récoltés, le nombre de fleurs et les gousses en formation comptés.

a) Rendements obtenus à partir de l'expérience de la pollinisation

- rendements obtenus par traitement

Les témoins ensachés, n'ayant subi aucune manipulation ont produit des gousses (Pl. N° 9 fig C) avec un rendement de la pollinisation de 0,125 représentant 15% par rapport à l'optimum obtenu dans le cas d'une pollinisation naturelle. Il est à noter que l'individu UNIV 1 a produit des rendements relativement élevés (0,25) pour le traitement témoin ; les inflorescences étant en grand nombre à l'intérieur de la poche, elles se trouvaient pratiquement accolées les unes aux autres, et l'échange de pollen a pu se produire par cette voie.

Les témoins ensachés qui n'ont pas été fécondés manuellement mais légèrement secoués, ont produit des gousses avec un rendement sensiblement identique à celui obtenu avec le témoin n'ayant subi aucune manipulation (0,102).

Lorsque la pollinisation est effectuée manuellement, en brossant les inflorescences avec du pollen récolté sur le même arbre, on constate une légère augmentation du taux de gousses formées (0,136).

Ces 3 premiers traitements ne donnent pas statistiquement des résultats significativement différents (Tabl. N° 14).

Dans le cas d'une allo-fécondation (Tabl. N° 13), en brossant les inflorescences avec du pollen récolté sur un autre arbre, les rendements obtenus (0,538) sont nettement supérieurs à ceux obtenus dans le cas d'une auto-fécondation.

Lorsque ces rendements sont comparés à ceux obtenus dans le cas d'une pollinisation naturelle, on constate qu'ils sont légèrement inférieurs à ceux obtenus dans une pollinisation naturelle par les insectes (0,7) .

La pollinisation naturelle donne un rendement optimal (0,735) considéré comme étant le maximum de gousses obtenues dans les conditions naturelles chez *A. albida* .

- Rendements obtenus par individus

17
 Tabl N°14 : Expérience de pollinisation contrôlée et naturelle chez *A. albida* : Analyse statistique des données recueillies par traitement

Traitements	Nbre moyen d'épis ensachés	Nbre gousses obtenues par épis
Auto (sans manipulation)	7,42	0,429 a
Auto -fécond (poches secouées)	4,71	0,857 a
Auto -Fécond (fleurs badigeonnées)	6,28	0,85 a
Allo-fécondation (fleurs badigeonnées)	5,55	2,77 b
Pollin naturelle (insectes)	8,66	5 b

18
 Tabl. N°15 : Fécondations croisées chez *A. albida* : rendements de la pollinisation croisée au niveau de chaque individu . Les rendements sont estimés par rapport au nombre total de fleurs .

Populations	Croisements male x femelle	Nbre inflor (a)	Nbre fleurs (b)	Nbre gousses obtenues (c)	Rendement c/b
UNI	2 x 1	6	241	3	0,0124
UNI	1 x 2	8	363	4	0,011
UNI	1 x 2	5	358	4	0,011
UNI	2 x 3	5	256	0	0
UNI	1 x 3	4	178	1	0,0056
UNI	5 x 4	3	110	0	0
UNI	1 x 5	2	93	3	0,032
UNI	4 x 5	5	162	6	0,037
UNI	4 x 9	5	185	3	0,0162
FOI	6 x 7	3	131	1	0,076
FOI	6 x 8	4	94	0	0

19
 Tabl. N° 16: Détermination de l'Index d'auto-incompatibilité (ISI)(d'après Zapata et Arroyo , 1978) au niveau individuel et au niveau moyen de la population d'*Acacia albida* étudiée.

Arbre N°	UNIV 1	UNIV 2	UNIV 3	UNIV 4	UNIV 5	UNIV 9	F 7	F 8
Rapports Auto/ Allo	0,14/0,5	0,28/0,61	0,06/0,11	0,5/0	0/1,5	0/0,6	0/0,33	0
ISI individuels	0,28	0,45	0,54	0	0	0	0	0
Moyenne ISI au niveau population = moyenne Auto/ moyenne Allo = 0,136 / 0,538 = 0,25 donc auto-incompatibilité								

Lorsqu'on considère les individus pris isolément (Tabl. N° 15), on constate que les rendements des croisements contrôlés (déterminés en terme du nombre de gousses obtenues par le nombre de fleurs fécondées par allo-pollinisation), varient en fonction des individus de 0% (UNIV 3 et UNIV 4) à 3,7% (UNIV 5) ; sur les individus UNIV 3 et UNIV 5, quelle que soit l'origine du pollen fourni, les rendements sont similaires.

Les meilleurs rendements ont été obtenus avec l'individu UNIV 5. L'arbre N°2 utilisé comme géniteur mâle n'a pas produit de gousse sauf avec l'individu UNIV 1.

Nous avons aussi constaté que les performances sont en relation avec la taille et l'envergure de l'arbre ; la plupart des arbres qui donnent un fort rendement en gousses à la suite de l'allo-fécondation, sont des arbres à cime large, avec une frondaison très étalée, un feuillage et une floraison abondantes (UNIV1, UNIV 5 UNIV 9).

Ils sont généralement isolés sur un rayon 100 m et l'un UNIV 1 se développe dans une dépression très riche en matière humique.

Par contre les arbres qui forment un faible nombre de gousses (UNIV 2, UNIV 3, UNIV 4, FOI 7 FOI 8) sont de petite taille, présentent un feuillage épars et certains (FOI 7 et FOI 8) poussent sur des sables dunaires très pauvres.

b) Estimation de l'Index d'auto-incompatibilité (ISI)

L'index d'auto-incompatibilité (ISI) (Zappata et Arroyo (1978)), est le rapport entre le nombre d'infrutescences ou de gousses obtenues à la suite de l'auto-fécondation sur le nombre d'infrutescences obtenues après fécondation croisée.

En déterminant l'index d'auto-incompatibilité (ISI) chez *Acacia albida*, lorsqu'on compare les individus pris isolément, on constate une grande variabilité de l'ISI de 0 à 0,54 (tabl. 16) alors qu'il est en moyenne de 0,25 pour l'ensemble de la population étudiée.

D'après Kenrick et Knox lorsque l'ISI est compris entre 0 et 0,2 l'espèce est auto-incompatible ; lorsque l'ISI est compris entre 0,2 et 1 l'espèce est partiellement auto-incompatible, au delà de 1 l'espèce est totalement auto-compatible.

Il apparaît d'après nos résultats qu'en considérant la moyenne obtenue au niveau de la population étudiée, *A. albida* est une espèce auto-incompatible (0,25). Cependant il est intéressant de noter qu'il existe une variabilité individuelle au sein de la population étudiée révélée par une variabilité des indices ; certains individus peuvent présenter une auto-compatibilité partielle (UNIV2 et UNIV 3) avec des indices plus élevés que la moyenne de la population (respectivement 0,45 et 0,54). Mais nous n'avons pas observé d'individus totalement compatibles (indice supérieur ou égal à 1) chez la population d'*Acacia albida* étudiée.

6) DISCUSSIONS

6-1) Phénologie et dynamique de la floraison

La floraison chez *Acacia albida* est un phénomène présentant une certaine variabilité liée d'une part au site et d'autre part dépendant du génotype de la plante puisque nous avons pu constater des décalages phénologiques importants au sein de la population étudiée.

Le vent est un des facteurs défavorables de la floraison car la plupart des rameaux situés sous le vent ne fleurissent que de façon exceptionnelle.

Généralement sur le rameau portant les inflorescences, l'induction florale est maximale entre le 7ème et le 24ème noeud; en deça et au-delà, le nombre d'inflorescences induites et formées est très faible.

En étudiant la chronologie d'ouverture des fleurs, on a pu noter que les fleurs basales s'ouvraient les premières ; il semblerait que leur rôle soit essentiellement d'offrir du pollen pour attirer les insectes pollinisateurs qui se chargeront par la suite de polliniser les stigmates. Ce phénomène a été observé sur *Acacia tortilis* par Tybirk (1989). Les fleurs médianes et surtout celles qui sont situées vers la partie extrême de l'épi inflorescentiel, sont les fleurs les plus réceptives car c'est à ce niveau que le taux de fécondation est le plus élevé (65 % pour les fleurs extrêmes, 25% pour les fleurs médianes et seulement 11% pour les fleurs basales).

Bien qu'il existe comme chez la plupart de Mimosacées, un certain taux de stérilité femelle lié à l'atrophie du style ou de l'ovaire, en présence d'organes floraux parfaitement fonctionnels, on peut noter une nette tendance vers la protandrie au niveau des fleurs basales alors que les fleurs supérieures sont en grande majorité protogynes.

Contrairement à ce qui a été rapporté par Guinet (1969) sur la morphologie des monades d'*A. albida*, nous n'avons pas observé d'exine rugulée et aréolée caractéristique de la tribu des Ingeae ainsi que la présence de columelles. Nos observations en microscopie électronique à balayage et à transmission ont montré que l'exine des monades d'*A. albida* est finement grenue et ne possède pas de columelles.

6-2) Structures reproductrices et stratégies reproductives

a) Rapport monade/ovule

Chez *A. albida* le rapport moyen monade/ ovule est de 1,5 alors que pour *Acacia nilotica* le nombre de monade par polyade est identique au nombre d'ovules par ovaire; il est de 16 (Tybirk,1989). Chez la plupart des Mimosacées et chez plusieurs espèces

d'Asclepiadacées, les rapports pollen/ovule sont généralement très faibles (1 à 1,5). Ce rapport rend compte de l'efficacité du système de transport du pollen : plus ce rapport est faible et plus le système de transport est efficace.

Chez les Mimosacées et les Asclepiadacées où les polyades sont présentes, le paquet que constitue l'assemblage de monades en polyade, constitue un investissement minimal qui est délivré au cours d'un seul voyage de l'insecte (Cruden, 1977) ; lorsque tous les grains de pollen présents sont transférés simultanément sur le stigmate et fécondent simultanément tous les ovules, le gain reproductif est maximum et les ressources sont utilisées de façon optimale.

Le rapport moyen monade/ ovule de 1,5, largement excédentaire en faveur des grains de pollen, rend compte de l'importance de l'investissement mâle par rapport à l'investissement femelle. De même, la quantité de pollen émise lors d'une phase reproductive renseigne sur l'importance de l'effort mâle fourni par la plante pour assurer la fécondation.

D'autre part il n'est pas rare de constater 2 à 3 polyades germant sur un pistil unique, ce mécanisme permet de féconder la totalité des ovules du carpelle et d'assurer au cours d'un seul événement pollinatoire la formation d'un maximum de graines.

b) Détermination du système de reproduction (allogamie ou autogamie) par les tests de pollinisation contrôlée

Lorsqu'on compare les rendements obtenus au cours de l'auto-pollinisation, on constate que les fleurs sur lesquelles le pollen est manuellement déposé, sont plus fréquemment fécondées que les fleurs n'ayant pas subi de manipulation. En effet, on constate une amélioration du rendement de la pollinisation lorsque le pollen est apporté au contact de la fleur.

Ceci montre que pour assurer une pollinisation effective chez *A. albida*, il est nécessaire d'apporter du pollen sur le stigmate ; la mise en contact du pollen sur le stigmate par un vecteur actif (manipulateur ou insecte pollinisateur), est indispensable à la fécondation ; comme l'a montré Tybirk (1993), sur de nombreuses espèces sahéliennes d'Acacia, la pollinisation chez *A. albida* est essentiellement entomophile et s'effectue en particulier par les papillons et les guêpes.

Nous avons constaté qu'il existe une différence dans les rendements obtenus à la suite de l'allo-pollinisation entre la pollinisation naturelle par l'intermédiaire des insectes vecteurs.

Cette différence de rendement observée entre l'allo-pollinisation contrôlée et la pollinisation naturelle, rend compte de la perturbation occasionnée par l'ensachage. Bien que

les échanges gazeux et la lumière ne soient pas limités par le sac transparent en gaze très fine, ce qui permet aux fleurs de s'épanouir normalement, par contre l'ensachage empêche les principaux insectes pollinisateurs d'accéder aux inflorescences. Ces insectes se déplacent de fleurs en fleurs pour collecter du nectar et lors de leur passage le frottement de leur abdomen et de leurs pattes avec les fleurs assurent une meilleure pollinisation que ne le fait le manipulateur.

L'étude du mode de fécondation allogamie ou autogamie permet de connaître le mode d'échange des gènes à l'intérieur d'une même population et entre populations différentes ; elle rend ainsi compte de la structure de la population.

Les différences très significatives de rendements observées entre l'auto-pollinisation et l'allo-pollinisation rendent compte de la pré-éminence d'un système de reproduction chez *A. albida* où l'allogamie domine largement. *Acacia albida* ne fait pas exception à la règle puisque la plupart des essences forestières exploitées sont allogames ; cependant on cite cependant le cas exceptionnel de *Leucaena leucocephala* (Brewbaker, 1983) qui est une des rares espèces ligneuses tropicales autogames.

En outre l'auto-incompatibilité n'est pas totale chez *A. albida* puisqu'il a été noté des individus présentant une auto-compatibilité partielle. Ces résultats viennent corroborer les résultats obtenus par Joly, 1992 qui en étudiant les profils électrophorétiques de plusieurs provenances d'*A. albida* de l'Afrique de l'Ouest, ont montré qu'il existe un déficit en hétérozygote, déficit qui s'expliquerait par un certain niveau d'autogamie chez cette espèce. Comme l'ont montré Kenrick et Knox, 1989 sur de nombreuses espèces australiennes, les *Acacia* en général présentent une grande variabilité dans leurs systèmes de reproduction allant de l'auto-incompatibilité stricte à l'auto-compatibilité la plus totale en passant par des stades intermédiaires.

Le modèle proposé par Kenrick et Knox (1989) pour les *Acacia* en général, repose sur un système d'auto-incompatibilité de type gamétophytique où co-existent un très grand nombre d'allèles dont certains sont post-zygotiques récessifs et létaux. Ce système d'auto-incompatibilité favorise le maintien d'une grande hétérogénéité au sein des populations en évitant la dépression due à la consanguinité ; car lorsque les allèles post-zygotiques létaux s'expriment, les embryons issus d'auto-fécondation avortent ce qui permet de privilégier et d'assurer une descendance hétérozygote à partir d'allofécondation.

Le fait constaté que le stigmate peut recevoir 2 à 3 polyades qui ne sont forcément pas de la même origine, explique aussi en partie la variabilité observée dans les traitements ; en effet, lorsque plusieurs polyades germent sur un même stigmate, ce n'est plus la loi du tout ou rien qui domine (auto-incompatibilité stricte) mais plutôt une gamme de réponses à la fécondation liée à la présence de grains de pollen de différentes origines.

Nous avons aussi constaté que les performances estimées en terme de rendements individuels de la fécondation varient avec les facteurs du milieu extérieur. La variabilité dans la réponse à la pollinisation contrôlée et la liaison des performances en fruitaison avec les facteurs intrinsèques et extrinsèques, corrobore l'hypothèse émise par Lloyd (1980) sur un ajustement sérié de l'investissement maternel au cours d'une phase reproductive donnée. Il a été démontré que le nombre de fruits formés est limité par la compétition pour les ressources nutritives (photosynthétats et éléments inorganiques) entre les fruits en croissance et les autres organes de la plante (Lloyd, 1980) ; il a aussi été démontré que la quantité de fruits produite par un individu donné est dépendante de la taille, de la biomasse, du nombre de nœuds ou du poids des feuilles de l'individu.

6-3) Effort reproductif et aptitude des deux partenaires à la reproduction

a) effort reproductif

Le taux de fécondation au niveau d'une inflorescence est faible car il dépasse rarement 1,25 % ; les pertes sont considérables car 98,75 % des fleurs se dessèchent et ne donnent jamais de fruits. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus sur différentes espèces d'*Acacia* australiens où environ 1% des fleurs produisent des fruits (Milton et al., 1981).

Le nombre de graines par gousses dépasse rarement 25 ce qui constitue le nombre maximal d'ovules rencontrés dans un ovaire. Ces valeurs sont très élevées par rapport aux autres espèces africaines du même genre (Kenrick et Knox, 1989) et en cela *A. albida* se rapproche beaucoup plus des membres de la tribu des Ingeae.

Il apparaît par ailleurs, que le caractère du nombre d'ovules par carpelle est sous contrôle génétique et par là, limite le nombre de graines.

Nous avons pu constater que chez *Acacia albida*, dans les conditions naturelles sur une moyenne de 32 monades moins de la moitié (44%) atteignent et fécondent les ovules ; avec une moyenne de 20,31 ovules par carpelle le pourcentage de remplissage du carpelle varie autour de 70% si on exclut les fécondations avortées.

Le déficit de remplissage du carpelle montre que malgré l'effort mâle fourni au niveau de la fleur, tous les ovules d'un carpelle ne sont pas fécondés.

b) Réceptivité stigmatique

Il existe un léger décalage entre l'ouverture des anthères et la réceptivité du stigmate d'*A. albida* ; en effet si la réceptivité débute réellement au moment de l'anthèse elle atteint

son optimum après l'éjection de pollen pour décroître lorsque les pièces florales sont totalement fanées.

Contrairement aux espèces australiennes d'*Acacia* qui produisent un exsudat liquide sucré au moment où le stigmate est le plus réceptif, chez *A. albida*, nous n'avons pas observé ce type de réaction ; nous n'avons pas non plus constaté la présence de cuticule comme cela a été rapporté chez les Papilionacées (ex: *Trifolium*, Heslop-Harrison et Heslop-Harrison, 1983).

Par contre nous avons observé la présence d'une substance adhésive à la partie supérieure du stigmate qui permet aux grains de pollen de s'accrocher solidement sur un des bords à la surface du stigmate.

ex sud
fluo

c) qualité du pollen

Nous avons remarqué que toutes les monades d'un polyade d'*A. albida* ne sont pas viables. Le taux maximal de viabilité est de 85%. Chez *A. retinodes* (Kenrick et Knox, 1985) seul 70% des monades sont viables ; ceci pourrait s'expliquer par un stress lié à l'environnement, l'âge de la fleur, et à un ensemble de facteurs génétiques propres à l'espèce.

Les grains de pollen libérés des anthères déhiscentes sont transportés par le vent. Au moment où le pollen arrive en contact avec le stigmate, il peut se dérouler un temps assez long ; au cours de cette période le pollen se déshydrate et perd une partie de ses facultés germinatives.

En culture, le pollen deshydraté d'*A. albida* perd en 3 jours ses facultés germinatives. Par contre lorsqu'il est protégé de la dessiccation par les tissus floraux, ses pertes en eau sont réduites et son pouvoir germinatif est conservé pendant au moins 5 jours.

Les tests de germination "in vitro" couplés avec le test fluorochromique ont montré chez *A. albida* qu'ils sont fiables et comme l'ont montré Heslop-Harrison et al., (1984) peuvent fournir une information adéquate sur la qualité du pollen qu'on va utiliser pour effectuer des fécondations croisées.

Cependant, ces deux test FCR et germination "in vitro" doivent être utilisés en complémentarité.

En effet, si le test FCR est un test qui détecte l'intégrité de la membrane plasmique et donc la possibilité pour la cellule de pouvoir fonctionner normalement, il a tendance à surestimer la qualité du pollen ; alors que le pouvoir de germer et d'émettre un tube pollinique constitue une base plus réaliste pour évaluer les performances du pollen, bien que ce test biologique soit soumis à de nombreuses limitations (composition du milieu et conditions de culture et possibilité d'interaction du pollen avec le stigmate).

L'utilisation couplée des tests de germination à des méthodes indirectes histochimiques basées sur l'activité de certaines enzymes (FCR, tri-phenyl tetrazolium etc ...) devrait permettre d'accéder à un niveau de réponse sur la viabilité très satisfaisant.

Nous avons aussi constaté que tous les ovules d'un carpelle ne sont pas fécondés au cours d'un événement pollinatoire. L'absence de fécondation de la totalité des ovules contenus à l'intérieur du carpelle pourrait être expliquée par la perte de viabilité des monades au cours du transport et le défaut de germination de la totalité des monades.

En effet lorsqu'on sait que seuls 85% des monades sont viables et qu'en moyenne 12,5 monades sont capables de germer et d'émettre un tube pollinique, on comprend dès lors que la totalité des ovules (20 en moyenne) contenus dans une loge carpellaire ne pourront pas être fécondés. Le degré de réceptivité ovulaire est un facteur critique de l'évaluation de la fécondité (Dumas et Knox 1983).

Des études complémentaires plus détaillées "in vivo" et "in vitro" sur les conditions de germination des monades, sur la cytologie de la croissance du tube pollinique à l'intérieur du style et sur les premières étapes du développement embryonnaire au sein de l'ovaire sont nécessaires pour appréhender le processus de la fécondation adopté chez *Acacia albida*.

PIANCHE N° 3

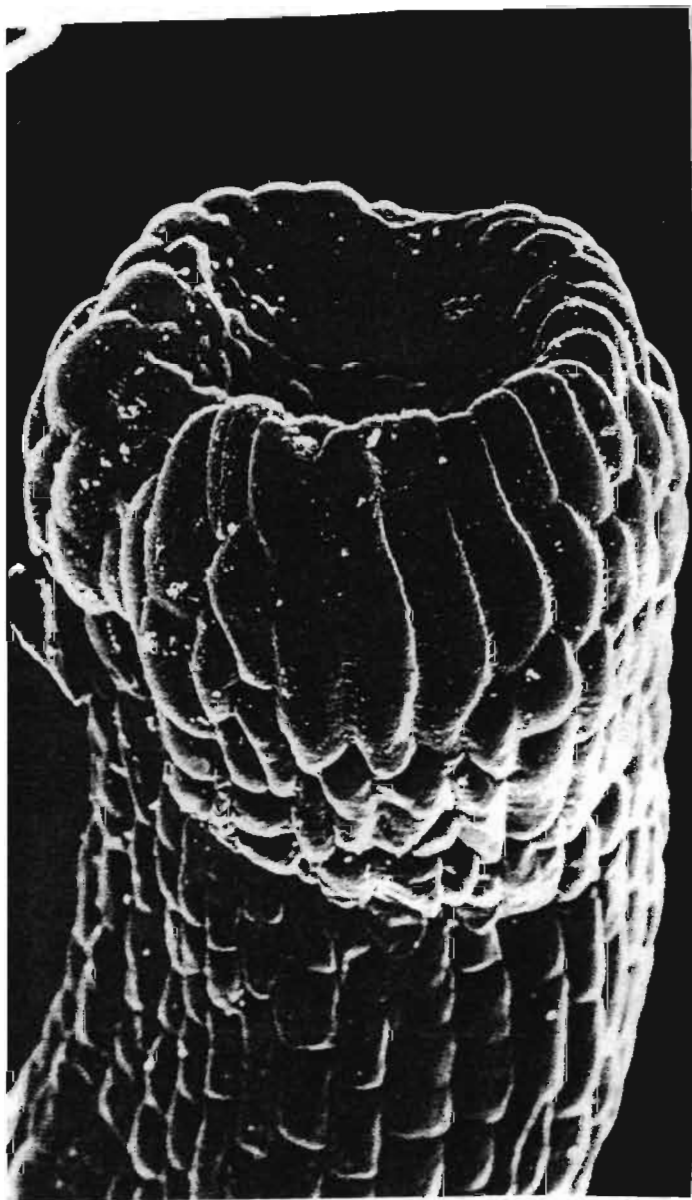
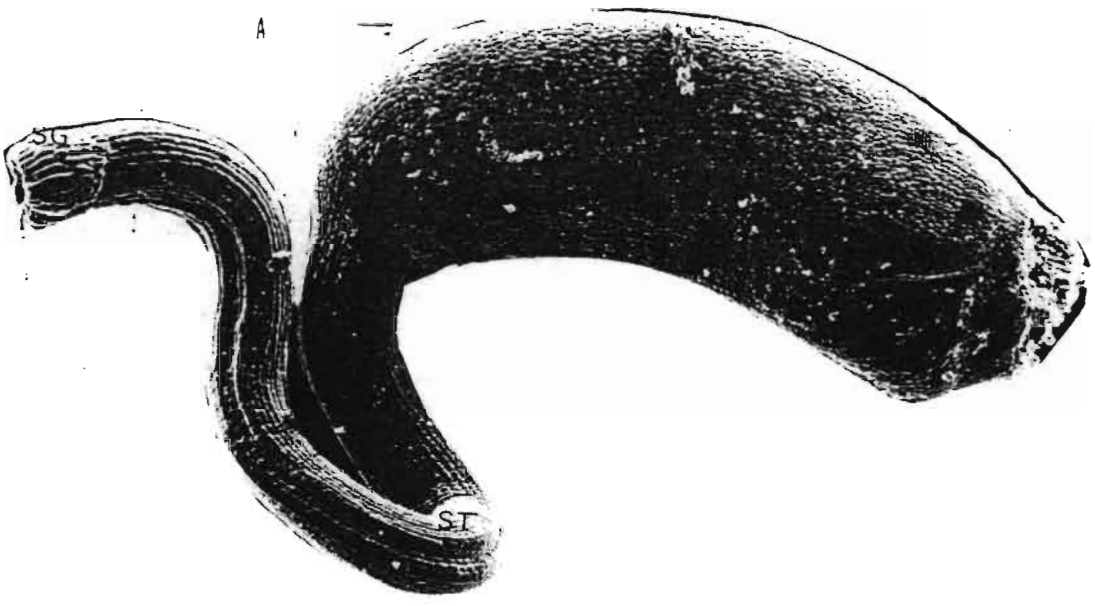
Observations du gynécée d'*A. albida* en microscopie électronique à balayage

Fig. A : Pistil d'*A. albida* isolé des pièces florales et constitué de l'ovaire (ov), du style (st) et du stigmate (sg) (Gr x720)

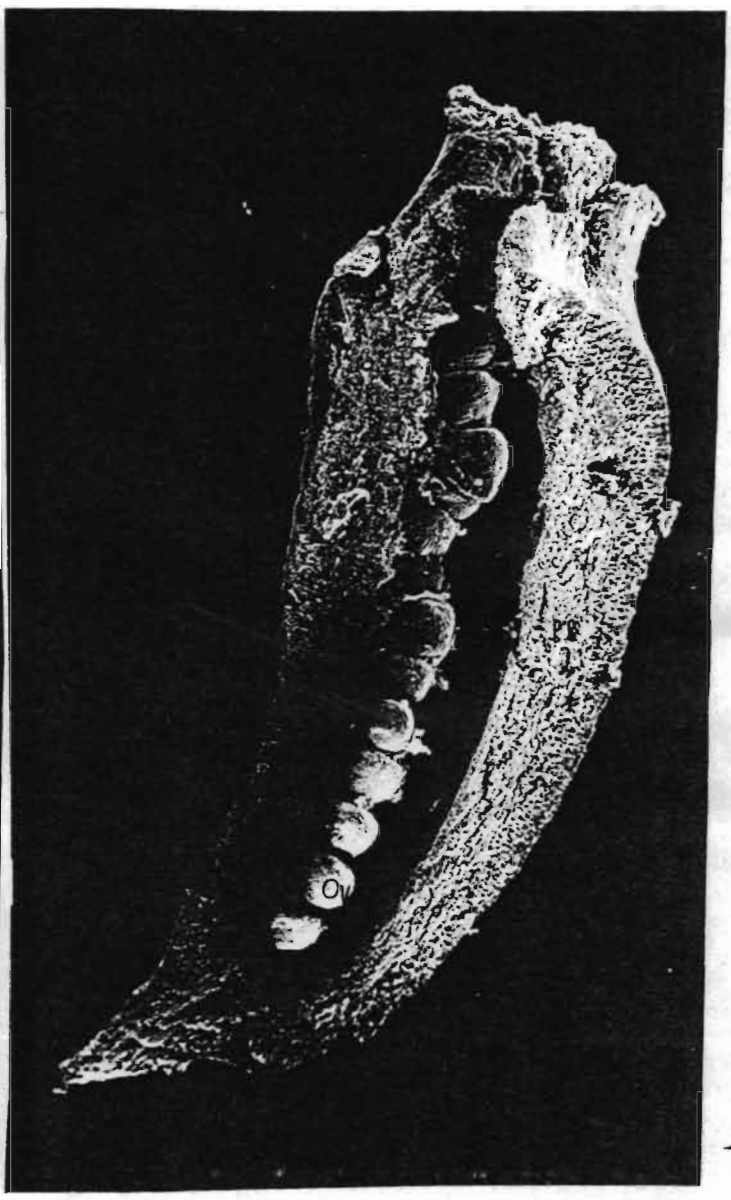
Fig. B : Détail du stigmate qui se présente sous la forme d'une coupelle noter l'absence de papilles stigmatiques (Gr x4800).

Fig. C : Coupe longitudinale de la cavité ovarienne; les ovules sont sur deux rangées, de part et d'autre de la ligne de suture du carpelle (Gr x1200). (ov: ovule; Pc: paroi carpellaire)

3



B



C

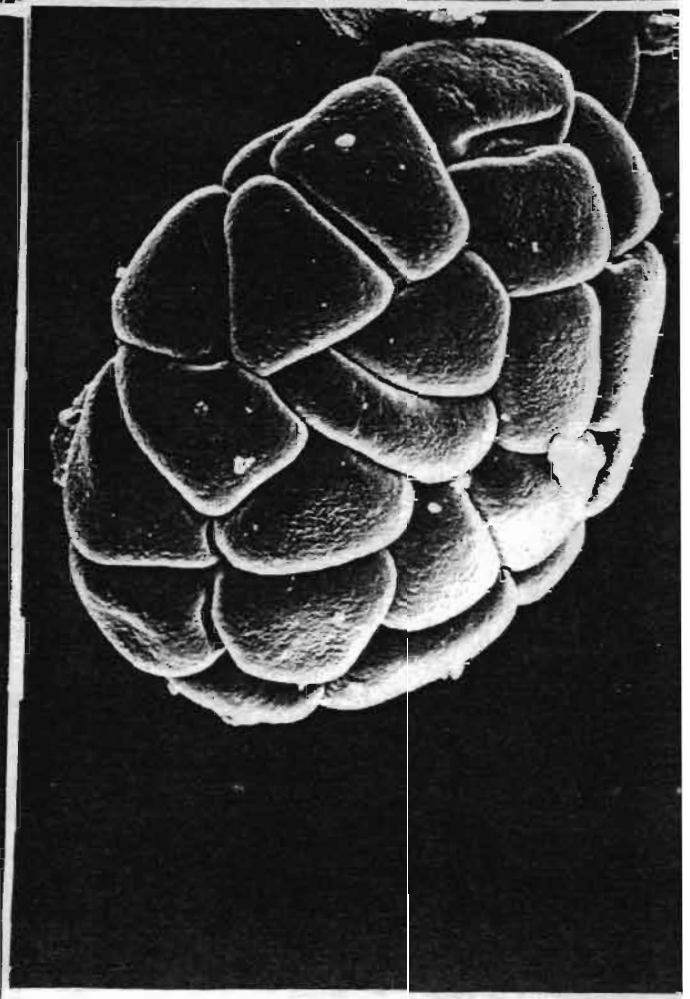
A



B

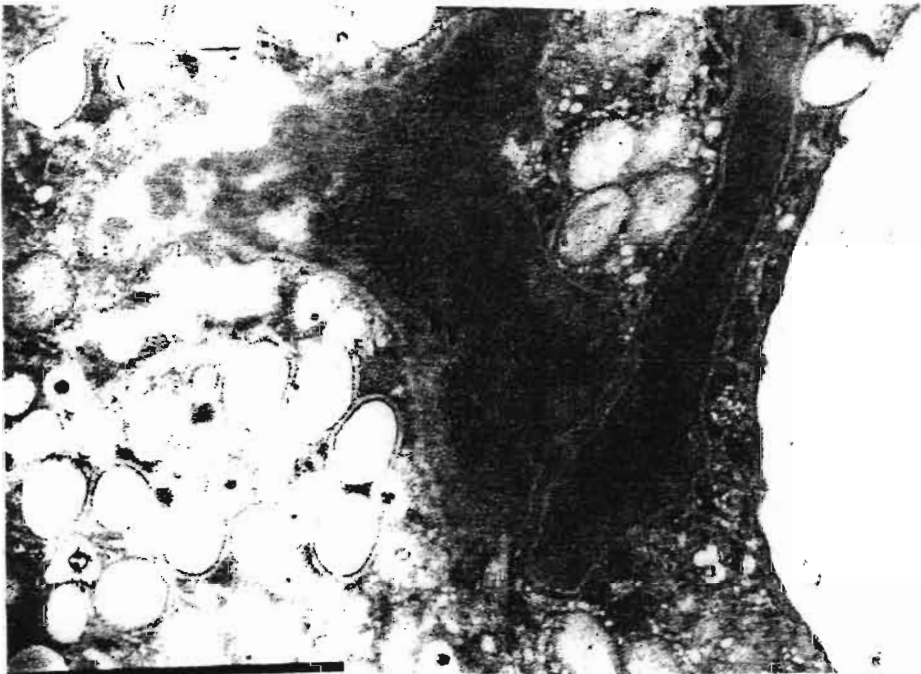


C

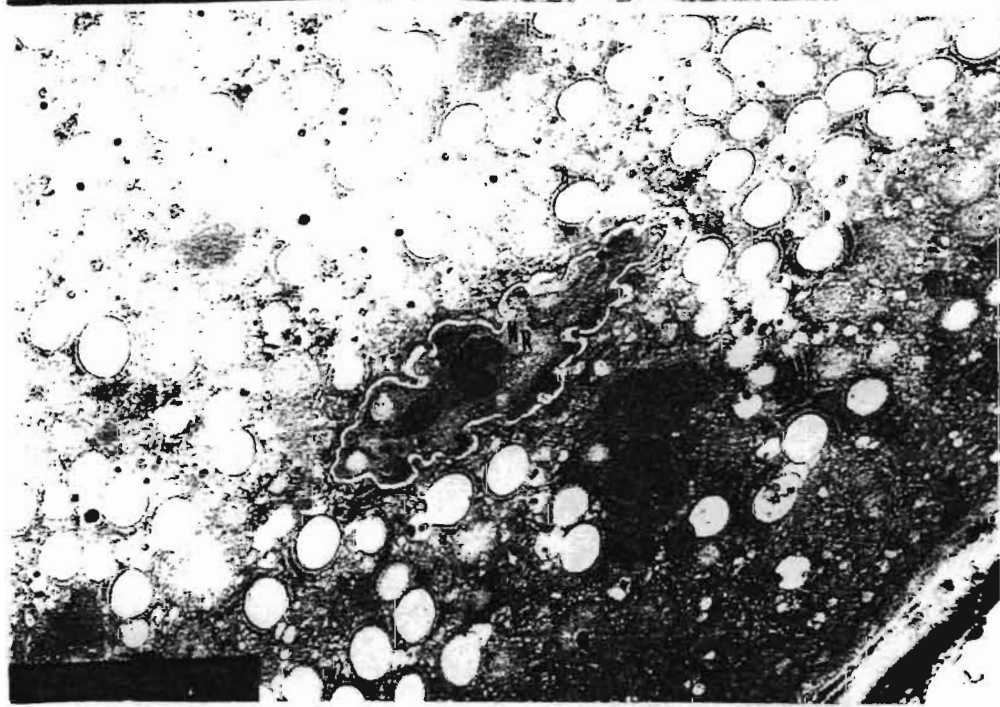


D

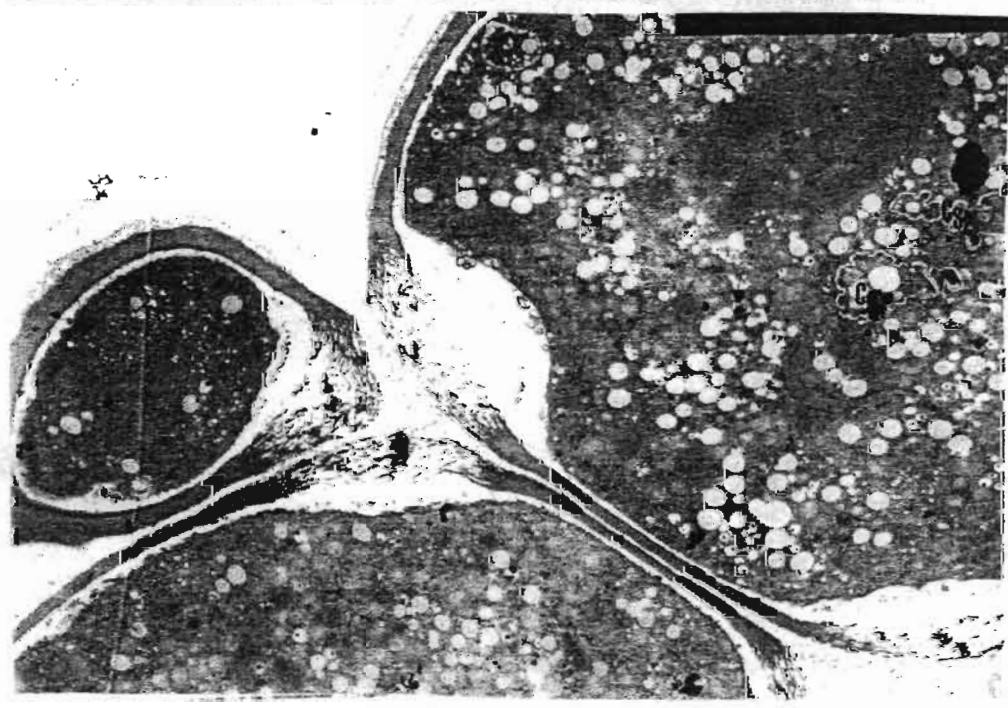
A



B



C



(7)

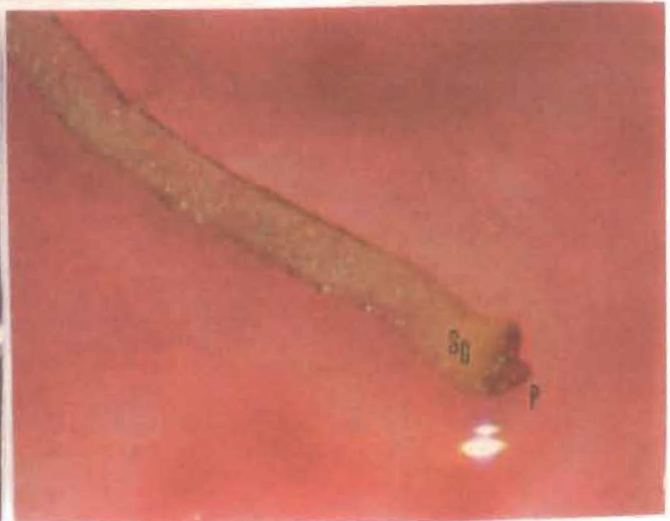


Planche N° 8

Germination "in vitro" du pollen d'*A. albida*

Fig. A : Polyade en cours de germination observé au microscope électronique à balayage (Gr. x 6000)

Fig. B: Polyades (Photo prise 4 heures après prélèvement) germant sur milieu Brewbaker et Kwacks (1975) et présentant de nombreux tubes polliniques qui s'allongent bien dans le milieu de culture (Gr. x100)

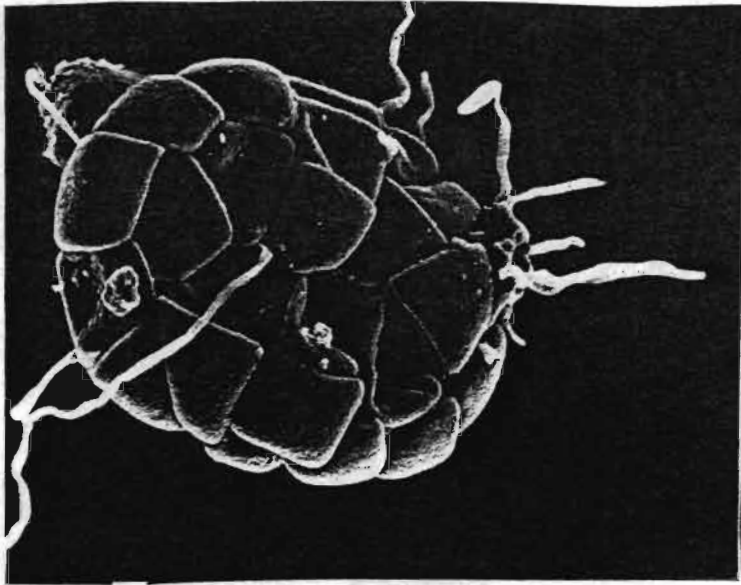
Fig. C : Déploiement du tube pollinique dans le milieu optimal de culture on distingue 3 zones (Gr. 250):

- une zone apicale (z.a) à cytoplasme dense contenant le noyau végétatif, les noyaux reproducteurs et de très nombreux organites
- une zone médiane (z.m) moins dense et très vacuolisée
- une zone distale (z.d) claire et translucide

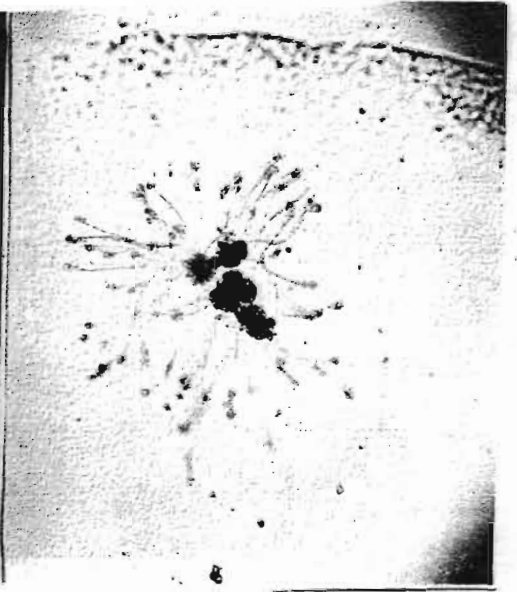
Fig. D : Croissance polarisée des tubes polliniques en direction du stigmate (Gr. x 50) (Sg: stigmate . P: polyade)

Fig. E: L'extrémité du tube pollinique est entourée d'un manchon de substances sécrétées par le tube pollinique qui maintiendrait la turgescence de l'extrémité du tube tout en favorisant sa progression grâce à la digestion enzymatique du milieu nutritif gélosé (Gr x 400) . (c: callose)

A



B



C



D



E



Planche N° 9

Pollinisation contrôlée chez *A. albida*

Fig. A : Choix d'un arbre florifère et mise en place des poches.

Fig. B : Photo prise 3 semaines après la pollinisation des fleurs à l'intérieur des poches; les fleurs sont totalement fanées et les épis dénudés. Les rameaux pollinisés sont récoltés et les gousses comptées.

Fig. C : Gousse en formation sur un épi inflorescentiel à la suite d'une auto-fécondation ; noter l'aspect pubescent de la gousse.

(Gr. x 25)



**MICROPROPAGATION
VÉGÉTATIVE *IN VITRO***

B) MULTIPLICATION VÉGÉTATIVE "IN VITRO"

1) **MICROPROPAGATION "in vitro" par culture de nœuds axillaires**

1-1) Influence de la saison sur l'expression morphogène des explants

Les prélèvements du matériel végétal ont été effectués à différentes époques de l'année sur les mêmes arbres pour déterminer les périodes les plus favorables à une bonne reprise de croissance des explants mis en culture (Fig.N°7).

En considérant le nombre d'explants primaires qui ont débourré (1), on constate une nette évolution entre les différents mois de l'année.

L'optimum de débourrement est obtenu durant les mois de Décembre, Janvier Février et Mars où pratiquement sur 100% des explants, les bourgeons débourrent. Pendant les mois allant de Juin à Octobre, on n'observe aucun signe de débourrement sur les explants primaires. A partir du mois de Novembre, les explants commencent à réagir à la culture "in vitro" et à élaborer des pousses feuillées. Il est à noter que durant le mois d'Août, mois particulièrement pluvieux, le taux de débourrement est nettement augmenté par rapport aux mois précédent et suivant.

Par rapport à la caulogénèse, nous avons pu constater que la période allant du mois de Février au mois de Mai est la plus propice à une bonne organogénèse "in vitro"; le maximum de réactivité se situant durant le mois de Février - Mars.

Durant la saison hivernale, la caulogénèse est pratiquement absente.

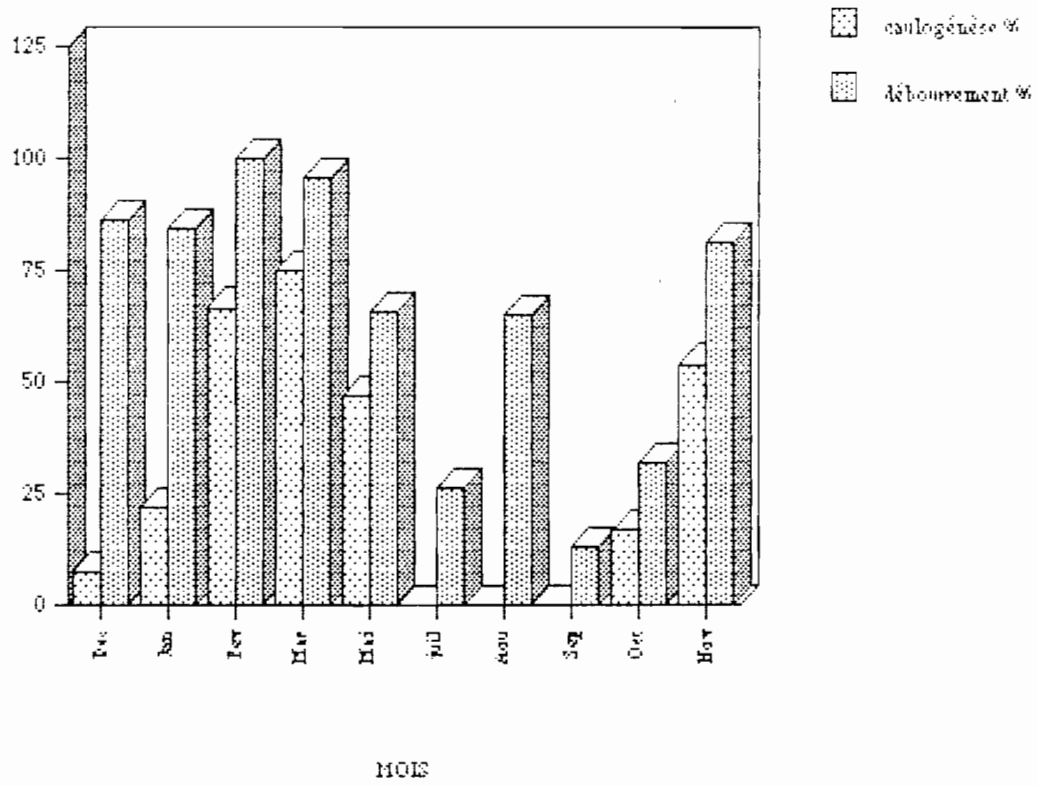
1-2) Influence de différents facteurs susceptibles d'améliorer la reprise de croissance du matériel végétal

1-2-1) Réduction de l'oxydation de polyphénols

Chez les arbres âgés, certaines substances comme les polyphénols sont accumulés dans les tissus et par leur action inhibitrice sur la croissance et la morphogénèse, ils peuvent rendre les organes mis en culture peu réactifs; parfois un simple trempage dans une solution aqueuse avant l'introduction "in vitro", permet de libérer l'explant de l'action de ces substances inhibitrices.

Il apparaît que dans le milieu M-S avec ou sans les oligo-éléments, l'importance de la concentration molaire entraîne une plasmolyse rapide après seulement quelques heures de trempage; le dessèchement débute à la partie apicale puis gagne la tige en entier. Le milieu

Fig. 7 : Influence de la période de l'année sur l'expression des potentialités morphogénétiques "in vitro" d'explants issus de dragons d'*A. a/aa* adulte.



4S /2 contenant des ions nitrate comme source azotée permet une survie limitée de la tige feuillée à 2 jours (tabl.20).

La dilution de cette solution minérale par deux avec comme source azotée des ions NH_4^+ , favorise un bon maintien des tissus de la tige pendant au moins 3 jours. Seul un pré-trempe dans de l'eau distillée permet de maintenir les tissus parfaitement intacts pendant une durée qui dépasse 3 jours. 5 jours après le trempage dans l'eau, on obtient encore 75% des tiges qui sont très vertes et turgescentes.

Il est apparu que dans les tissus adultes même rajeunis partiellement, subsistent quelques substances inhibitrices de la croissance de type polyphénols. D'autre part, il a été démontré que l'azote à forte concentration dans le milieu pouvait avoir un effet inhibiteur. Ce test préliminaire a montré que le trempage de la tige dans de l'eau distillée (tabl. 21) permet de conserver en bon état les différents tissus de la plante tout en favorisant la libération de substances toxiques.

(1)le débourrement est considéré ici comme l'étape initiale où le bourgeon gonflé s'ouvre et dévoile les premières ébauches de feuilles , alors que la caulogénèse constitue l'étape suivante au cours de laquelle le bourgeon débourré s'allonge en tige feuillée)

Tabl. N°20 : Influence du pré-trempage dans différentes solutions salines sur l'état physiologique des rameaux feuillés d'*A. albida*

durée de trempage	état physiol	M-S	M-S - oligo-Elmts	M-S + NO3	M-S+ NH4	M-S sans N	EAU Distill
		N=10	N=13	N=12	N=10	N=12	N=10
24 h	1	0	0	100%	100%	100%	100%
	2	50%	23%	0%	0%	0%	0%
	3	50%	77%	0%	0%	0%	0%
48 h	1	0%	0	0	100%	100%	100%
	2	0%	0	50%	0%	0	0
	3	100	100%	50%	0%	0	0
			0%				
72 h	1	0%	0%	0%	100%	50%	100%
	2	0%		0%	0%	50%	0
	3	100	100%	100%	0%	0	0
120h	1	0%	0%	0%	50%	50%	75%
	2	0%	0%	0%	50%	50%	25%
	3	100	100%	100%	0%	0	0%

N: Nombre total de rameaux feuillés observés

Etat physiologique 1: rameau feuillé intact vert et turgescent

2 : rameau feuillé partiellement desséché sur l'apex

3 : rameau feuillé totalement desséché sur toute sa longueur

Tabl. N° 21: Expression morphogénétique des nœuds d'*A. albida* pré-traités par trempage dans de l'eau distillée et dans le milieu M-S + NH4 pendant 120 heures et cultivés "in vitro" sur milieu M-S. Les résultats sont obtenus après 4 semaines

Traitements	Nbre total explants	Débourrement		Explants caulogènes	
		Nbre	%	Nbre	%
M-S +NH4	24	16/24	67,6%	7/24	29%
Eau distillée	24	18/24	75%	9/24	36%

1-2-2) Influence de la nature du matériel végétal

Des essais de mise en culture sur un milieu de base M-S, de différents types de matériel végétal, drageons, rejets et pousses florifères, (PI N° 10 fig A, B et C) ont montré que seuls les drageons prélevés à proximité du système racinaire permettent un débourrement du méristème axillaire.

En effet, (tabl.22) les explants prélevés sur des drageons ont un pourcentage de reprise élevé (75%), et 66% d'entre eux produisent des axes feuillés qui évoluent en tigelles par allongement. La proximité des drageons avec le système racinaire favorise l'expression de la caulogénèse grâce à un environnement nutritionnel et hormonal bénéfiques.

En utilisant des rejets récoltés sur les troncs (pousses épïcormiques) ou bien récoltés sur des souches, on constate que le pourcentage de reprise de l'activité méristématique est très faible. La plupart des nœuds forment exclusivement des feuilles à la place des tiges ; le bourgeon demeure bloqué sans pouvoir évoluer en tigelle.

Par contre les pousses prélevées au niveau de la cime au moment où l'arbre fleurit, ne débourent pas, aucune réaction morphogénétique n'est observée sur ce type d'explant.

1-2-3) Influence du mode d'obturation des tubes

La micropropagation "in vitro" est généralement tributaire des conditions physiques du milieu de culture. Parmi celles-ci, l'aération des tubes qui permet et favorise les échanges gazeux entre le tube et l'atmosphère ambiante semble être un facteur essentiel.

Lorsque les échanges gazeux se font librement, le développement se trouve facilité, par contre lorsqu'il y'a accumulation de certains gaz (tels que le CO₂ ou l'éthylène) sans que le renouvellement puisse se faire, la conséquence est le ralentissement de la croissance de l'explant.

Pour cette raison, nous avons comparé l'influence de 2 types d'obturation sur la morphogénèse d'explants d'*A. albida* cultivés sur un milieu M-S; les bouchons sont de deux types :

- des bouchons en cellulose
- des bouchons en acier inoxydable (type Bellco)

Les résultats sont présentés sur les tableaux N° 23 et 24.

Nous avons constaté un effet significatif de l'obturation sur le développement et la croissance des explants.

En effet l'expression de la morphogénèse "in vitro" (caulogénèse, élongation des tigelles, nombre de pinnules formés, enracinement des tigelles) est accrue lorsque les bouchons en cellulose où les échanges gazeux sont plus importants sont utilisés.

Tabl. N°22 : Influence de l'origine du matériel végétal sur la morphogénèse "in vitro" d'explants d'*A. albida* cultivés pendant 4 semaines sur milieu M-S .

Type de matériel	taux de survie		débourrement bq axill		croissance pousse feuil	
	nbre	%	nbre	%	nbre	%
drageons	15/24	62,5	18/24	75	16/24	66.6
rejets	9/18	50	7/18	39	0/18	0
pousse florifère	15/24	75	0	0	0	0

Tabl.N° 23 : Influence de l'obturation du tube de culture sur la morphogénèse "in vitro" d'explants d'*A. albida* cultivés sur milieu M-S après 47 jours de culture

type d'obturation	N	Infections		caulogenese		enracinement	
		Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%
bouchon cellulose	96	50/96	52,07	53/96	55,7	24/96	25
bouchon acier inox	96	62/96	64,5	47/96	48,9	14/96	14,90

Tabl.24 : Influence de l'obturation du tube de culture sur la morphogénèse "in vitro" et l'élongation d'explants d'*A. albida* cultivés sur milieu M-S après 21,34 et 47 jours de culture

type d'obturation	N	nbre folioles à 47 jours	élongation		
			21 jours	34 jours	47 jours
bouchon cellulose	96	2,5	3,77	5,1	7,45
bouchon acier inox	96	1,83	2,83	4,3	6,5

Tabl. 25 : influence de la présence ou non du charbon actif sur la morphogénèse "in vitro" d'explants issus de drageons d'*A. albida* cultivés pendant 30 jours sur milieu M-S

Traitements	explants avec feuilles		explants caulogenes		Longueur des tiges à jours 30, jours (mm)
	Nbre	%	nbre	%	
MS + Charbon	34/48	70,8	14/48	29	8,88 a
MS - charbon	37/48	77	11/48	22,9	8,74 a

Du point de vue de l'élongation (Tabl. N°24) bien que la vitesse de croissance des explants soit la même dans les deux traitements, il subsiste un léger avantage lié à l'obturation par les bouchons en cellulose.

1-2-4) Influence du charbon actif sur la caulogénèse

L'addition du charbon actif permet d'améliorer légèrement le taux de caulogénèse ; par contre son apport dans le milieu de culture n'a pas d'effet significatif sur l'allongement des bourgeons formés par rapport à un milieu sans charbon actif ; cependant la présence de charbon actif permet une amélioration qualitative au niveau aspect des pousses feuillées qui sont plus vigoureuses et ont l'aspect plus vert (tabl. 25).

1-3) Influence de la composition des milieux de culture

1-3-1) Comparaison de 4 milieux minéraux

Quatre milieux de base ont été comparés ; ces différents milieux ont chacun leurs particularités :

1) le milieu de Murashige et Skoog constitue le milieu de base couramment utilisé ; il est très riche en ions NH_4^+ , NO_3^- et K^+ ; il est considéré comme sub-optimal en raison de sa teneur élevée en éléments minéraux.

2) Le milieu Quoirin-Lepoivre est un milieu différent de celui de M-S puisqu'il contient 10 à 15 fois plus d'ions K^+ , PO_4^{4-} et Mg^{2+} ; les éléments azotés sont très réduits en particulier les ions NH_4^+ .

3) Le milieu de Nitsch et Nitsch contient beaucoup d'azote sous forme NH_4^+ et NO_3^- ; il peut être considéré globalement comme un milieu MS dilué de moitié.

4) Le milieu Gamborg est globalement plus pauvre en éléments minéraux que les autres. Il contient comme principale source d'azote du nitrate de potassium ; les ions NH_4^+ y sont en très faible quantité.

Les explants ont subi un repiquage sur les mêmes milieux de culture au bout de 21 jours et 34 jours . A 47 jours l'expérience a été arrêtée .Les résultats obtenus sont les suivants :

A) Débourrement du bourgeon axillaire

Les méristèmes pré-existants sur les explants (pl. N°11 fig A) mis en culture sur les différents milieux minéraux s'organisent en bourgeons (pl. N°11 fig B)(tabl. 26).

* sur milieu M-S

La composition minérale du milieu M-S favorise la réactivation des méristèmes axillaires ; en effet la totalité des explants mis en culture développent une réaction morphogène dont

Tabl. N° 26: Influence de 4 milieux de base sur l'expression morphogénétique du bourgeonnement axillaire d'explants d'*A. albida* après 47 jours de culture

MILIEU	Nbre initial	taux de survie		Formation de feuilles sans élongation		croissance en pousses feuillées	
		nbre	%	nbre	%	nbre	%
Q-L	48	27/48	56,25%	16/27	59,2%	11/27	40,7%
M-S	48	23/48	48%	8/23	34,70%	15/23	65,2%
GM	48	31/48	64,50%	18/31	58,06%	13/31	41,90%
N-N	48	31/48	64,50%	2/31	6%	18/31	58%

Tabl. N° 27: Elongation des tigelles formées à partir d'explants d'*A. albida* sur 4 milieux de culture en fonction de la durée de la culture

MILIEUX	Longueur des tigelles (mm)			
	Durée de la culture	21 jours	34 jours	47 jours
Q-L		4,7 a	5,1 b	7 b
M-S		4.1 a	7,6 a	10.6 a
N-N		3.6 a	5.9 b	9 a
GM		2.7 b	3.1 c	5.2 c

Tabl N°28 : Influence de 4 milieux de base sur la survie et la morphologie foliaire de tigelles formées à partir d'explants d'*A. albida* après 47 jours de culture

Milieu	Nbre initial	chute des feuilles		nbre pinnules	Morphologie des feuilles
		Nbre	%		
Q-L	48	10/27	37	1,8 b	feuilles chlorosées et de petite taille
M-S	48	2/23	8,6	2,8 a	feuilles très chlorophylliennes grandes bien étalées
GM	48	18/31	58	2,3 a	feuilles petites peu étalées
N-N	48	7/31	22,5	2,4 a	feuilles vertes bien étalées

Tabl. N° 29: Influence de la dilution des macro et des micro-éléments de MS sur l'expression morphogénétique d'explants d'*A. albida* après 4 semaines de culture.

MILIEUX	explant avec feuille sans axe de tige		explant avec tiges feuillées		explant callogène		explant sans réaction	
	nbre	%	nbre	%	nbre	%	nbre	%
M-S	1/18	5,5	14 /18	77,7	0	0	3/18	16,6
M-S/2	3/18	16,6	10 /18	57	3/18	16	5 /18	27
M-S/5	0/20	0	2 /20	1	4 /20	20	14 /20	70
M-S/10	0/18	0	1/18	0,5	2/18	11	15 /18	83,5

65,2% forment des bourgeons qui évoluent en pousses feuillées. Une importante proportion d'explants débourent mais ne produisent que des feuilles.

* sur milieu N-N

Le nombre d'explants débourents et caulogènes (58%) bien que important est moins élevé que celui observé sur milieu M-S ; par contre, seul 6% des explants primaires débourent et ne produisent que des feuilles ; par ailleurs, on observe un important nombre d'explants sans aucune réaction morphogène (35,5%).

* sur milieu GM

Les explants capables de développer une pousse feuillée constituent 41% alors que les explants produisant un bourgeon axillaire qui évolue en pousses feuillées constituent 58% du total des explants mis en culture.

* sur milieu Q-L

Les explants mis en culture sur ce milieu produisent en grande majorité des feuilles (55%) . Seuls 33% des explants développent un bourgeon qui s'allonge en pousse feuillée. 11% des explants ne présentent aucune réaction morphogène.

B) Elongation et morphologie des pousses feuillées

Les bourgeons débourents se développent en pousses feuillées qui s'allongent et élaborent de nouvelles feuilles (pl. N°11 fig C) (tabl. N° 27 et 28).

* sur milieux M-S et NN

Les milieux favorisant l'élongation sont les milieux MS et NN (10,6 mm et 9 mm respectivement) au bout de 47 jours de culture ; d'autre part les milieux MS et NN favorisent le développement des pinnules qui sont très grandes et bien vertes et bien étalées. Leur développement ultérieur est tout à fait satisfaisant. L'effet favorable de ces milieux se maintient tout au long des sub-cultures ; le jaunissement suivi de la chute des feuilles affecte un faible nombre d'explants.

* sur milieu Q-L

Au bout de 47 jours de culture , les tigelles atteignent une longueur de 7 mm et le nombre moyen de pinnules est de 2; les foliolules sont petites , jaunes et chlorosées ; la chute précoce des feuilles survient à partir de la 4ème semaine et affecte 37 % des explantats .

* sur milieu GM

La croissance des tigelles est plus lente par rapport aux autres milieux ; les foliolules sont vertes, petites de taille et peu ouvertes. A partir de la 4ème semaine de culture, elles commencent à jaunir et à chuter.

1-3-2) Influence de la dilution du milieu de base M-S

La dilution des macro-éléments et des micro-éléments constitutifs du milieu de base M-S a pour conséquence la réduction du pourcentage de caulogénèse qui passe de 77,7% pour un milieu M-S complet à 57% pour M-S dilué de moitié et 0,5% pour M-S dilué 10 fois. Le nombre d'explants non réactifs augmente de 18% pour le milieu M-S complet à 83,5% pour le milieu M-S dilué 10 fois (tabl. N° 29).

Lorsque la teneur en éléments minéraux diminue, le bourgeon réagit difficilement à la stimulation caulogène ; la tendance des explants à produire des cals est plus exacerbée que dans le cas d'un milieu normal.

1-3-3) Influence de la source d'azote

De nombreux milieux de culture sont utilisés en culture "in vitro" et la plupart d'entre eux sont très riches en azote. Actuellement, on reconnaît généralement que la qualité aussi bien que la quantité de la source azotée joue un grand rôle dans la croissance et la capacité à régénérer (Gamborg et al., 1968); cependant on dispose très peu d'informations concernant l'estimation des besoins réels des ligneux en substances azotées (Minocha et al., 1981).

Dans le sol, l'azote se trouve sous différentes formes :

- minérale (NO_3^- , NH_4^+ , NO^- NO_2^-)
- organique en liaison avec des chaînes carbonées.

Sur sols cultivés, il est fréquent de trouver l'azote sous sa forme la plus oxydée (NO_3^-) alors que dans les systèmes forestiers l'azote se trouve à une forte proportion sous une forme réduite (Robson, 1983). Chez les ligneux, il est probable qu'en fonction des espèces, il existe des voies métaboliques privilégiant soit les nitrates, soit l'ammonium.

A. albida étant une espèce agroforestière par excellence, il nous est apparu intéressant d'essayer de connaître ses exigences nutritionnelles en azote en déterminant la forme (nitrate, ammonium ou organique) sous laquelle l'azote est préférentiellement puisé chez *A. albida* .

D'autre part, l'existence d'une corrélation entre la teneur en ions azotés des différents milieux de culture précédemment utilisés et les performances morphogénétiques "in vitro" nous a poussé à étendre le champ de l'expérimentation en étudiant l'influence des différents teneurs en azote sur le développement et la croissance en tubes de vitroplants d'*A. albida* âgés de deux ans.

Tabl 30 : Influence de la nature de la source azotée sur la croissance et le développement de vitroplants d'*A. albida* pendant 30 et 45 jours

30 jours de culture					
Milieux	Nbre explant	Hauteur (cm)	nbre feuilles	Nbre racines	Long racines
MS 0	12	3	2,33	1,66	1,33
NH4 1 mM	12	2,55	2,33	1,8	
NH4 5 mM	12	3,3	6,5	7,3	4,1
NH4 20 mM	12	2,82	3	3	4,1
NO3 1 mM	12	2,83	2,6	3	2,5
NO3 5 mM	20	4,19	2,2	1,84	3,42
NO3 20 mM	16	2,11	1,5	4,6	1,37
NO3/NH4 : 1/20	12	1,7	0,8	1	
NO3/NH4 : 5/20	12	2,48	1	0	2,5
ASP 100	13	2,96	1,16	1,5	3
ASP 500	12	3,4	1,33	1	
Glut 100	12	2,34	3	3,5	3,5
Glut 500	12	3,45	4,4	2,5	1,5

45 jours de culture					
Milieux	Hauteur (cm)	nbre feuilles	Nbre racines	taux de survie	Aspect morphol à 45 jours de culture
MS 0	3,46	2,4	2	80%	nécrose apex feuilles jaunes
NH4 1 mM	2,16	1,33	0	66,60%	feuilles vertes et vert-jaunâtres
NH4 5 mM	3,91	2,5		100%	feuilles tres vertes et tres grandes
NH4 20 mM	3,3	2,5	4,5	33,30%	necrose apex couleur vert-jaunatre
NO3 1 mM	3,5	0,16	3	100%	feuilles vert-jaunatre
NO3 5 mM	3,6	0,86	2,5	64,00%	feuilles tres vertes
NO3 20 mM	1,78	0,16	5,3	37,5	feuilles vert-jaunatre
NO3/NH4 : 1/20	0	0	0	0	nécrose totale
NO3/NH4 : 5/20	0	0	0	0	nécrose totale
ASP 100	2			42,85%	exp desséché
ASP 500	3,6	1,75	2,16	66,60%	nécrose apex
Glut 100	2,16	3	3,6	83,30%	feuilles vertes début de necrose apex
Glut 500	3,75	3,5	3,5	100%	feuilles vert-jaunatre

1-3-3-1) Nutrition azotée et morphogénèse "in vitro"

A) azote minéral

A-1) hauteur totale

Le taux de croissance le plus élevé est obtenu en présence d'ions NO_3^- (5mM); les ions NH_4^+ à 5 mM favorisent aussi une bonne croissance des tiges bien qu'elle soit moins importante que dans le cas où les ions NO_3^- sont utilisés (fig N° 8 et 9). L'effet bénéfique des ions NO_3^- sur la croissance se manifeste très tôt dès le 15ème jour de culture, alors qu'en présence d'ions NH_4^+ , ce n'est qu'au bout de 30 jours de culture que les explants s'allongent réellement. Les ions NH_4^+ à 20mM permettent une croissance satisfaisante des tiges.

Sur les autres milieux la croissance est quasi stationnaire et au bout de 45 jours, on peut même noter une décroissance liée à la nécrose des apex suivie de la mort de l'explant entier. Lorsqu'on combine l'azote sous forme ammoniacal à l'azote sous forme nitraté, leur addition simultanée entraîne une baisse de la croissance.

A-2) biomasse foliaire

En considérant la biomasse foliaire produite, on constate que le milieu contenant 5 mM d'ions NH_4^+ (fig 9) favorise la production d'une biomasse foliaire importante. Cette biomasse chute 10 jours après la transplantation ; 30 jours plus tard, il s'ensuit une augmentation de la biomasse; après 45 jours de culture sur le même milieu, la plupart des explants ont perdu leurs feuilles (fig. 10-11). Les feuilles formées chutent sans être remplacées par de nouvelles.

Les autres milieux donnent des résultats sensiblement identiques ; en outre en présence d'une combinaison $\text{NH}_4/\text{NO}_3^-$ (1 /20 et 5/20 mM) les performances sont les plus faibles ; les explants après une phase stationnaire de croissance au bout de 3 semaines, se nécrosent et dégèrent rapidement.

A-3) enracinement

L'optimum concernant l'induction et la formation de racines adventives, est obtenu en présence de NH_4 5 mM (fig N° 12 et13) où 7 à 10 racines adventives sont formées par explant au bout de 30 jours de culture . Le milieu NO_3^- 20mM (fig 12) favorise aussi une bonne rhizogénèse de même que le milieu NH_4 20 mM . Les racines formées s'allongent bien dans le milieu de culture . Les mêmes contre-performances observées en d'une combinaison NH_4/NO_3 en matière de croissance et de production de biomasse, se retrouvent lorsqu'il s'agit d'enracinement des tiges sur ce milieu.

B) Azote organique

B-1) Hauteur totale

Fig N° 8 : Croissance en fonction du temps des vitroplants d'*A. salsola* en présence d'ions NH_4^+

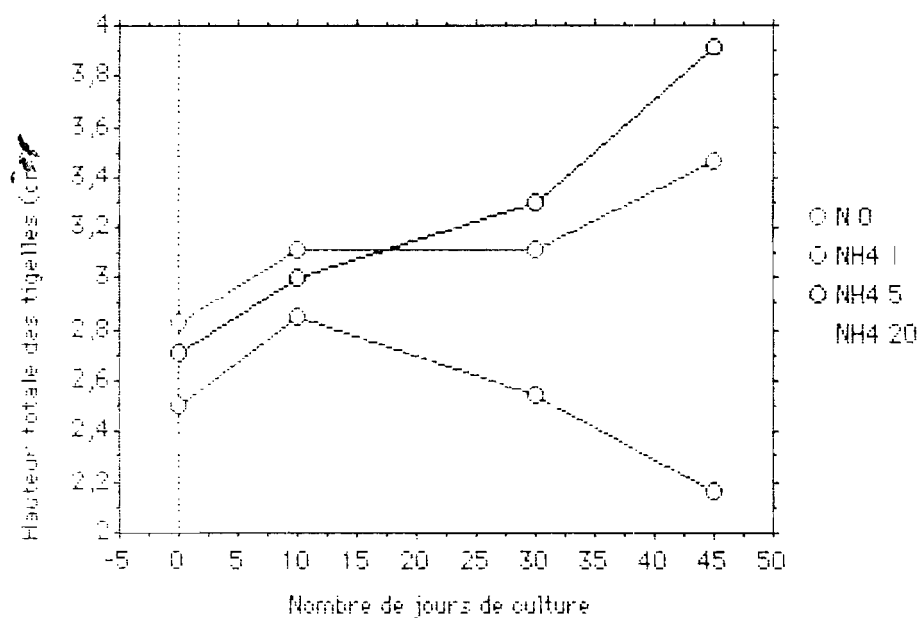
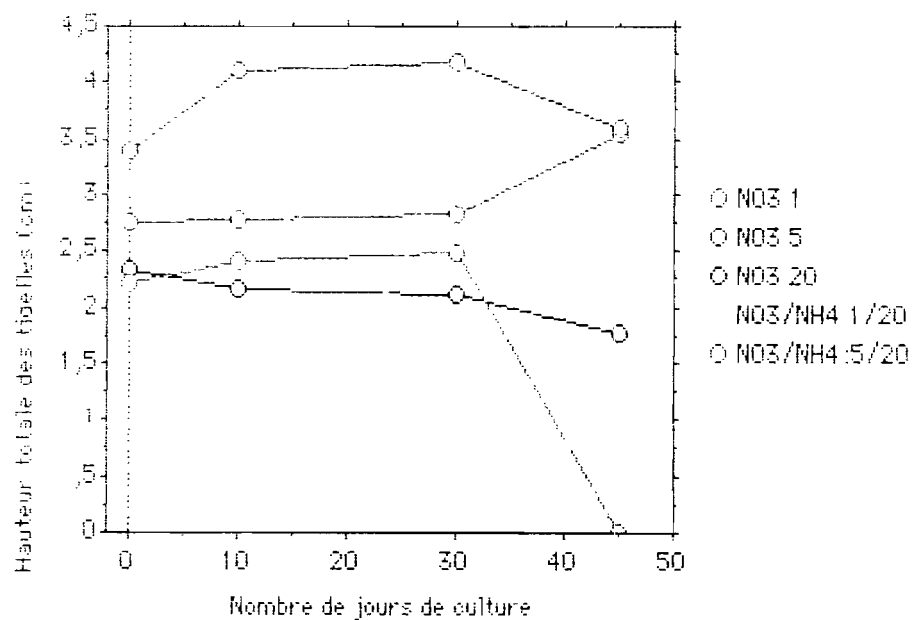
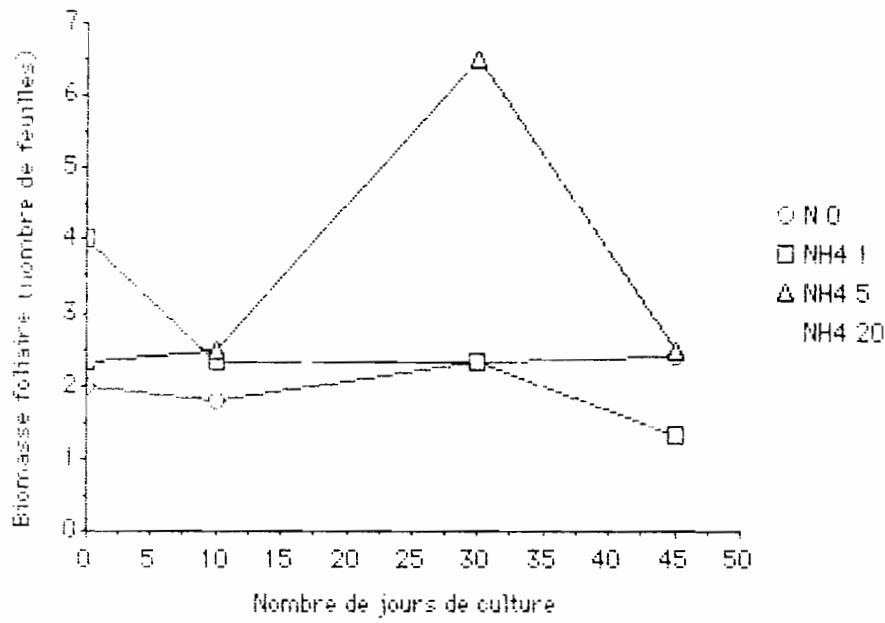


Fig N° 9 : Croissance des vitroplants d'*A. salsola* en présence d'ions NO_3^- et NH_4^+ pendant 10,30 et 45 jours



N° 10 : Biomasse foliaire produite par les vitroplants d'*A. albida* en présence d'ions NH_4^+ pendant 10,30 et 45 jours



N° 11: Biomasse foliaire produite des vitroplants d'*A. albida* en présence d'ions NO_3^- et NH_4^+ pendant 10,30 et 45 jours

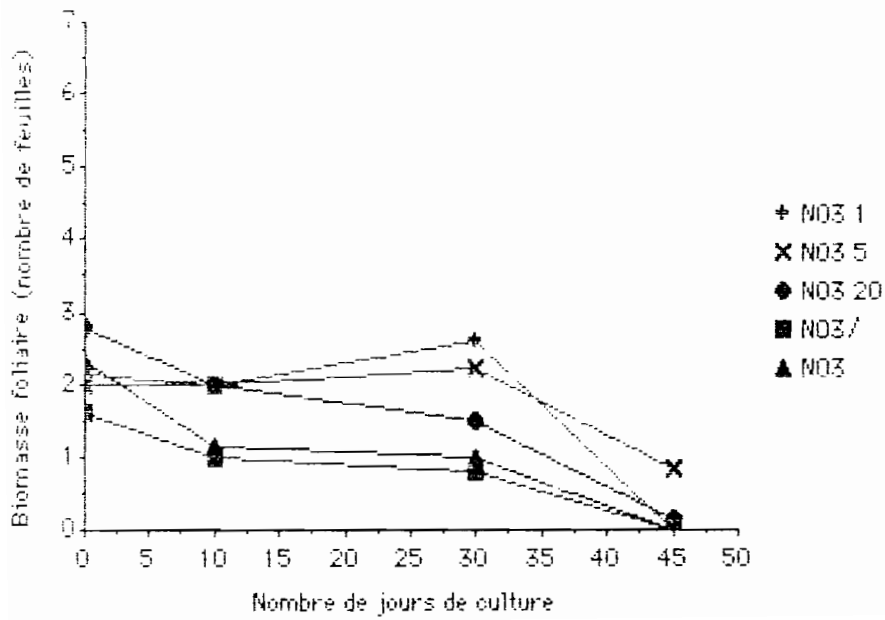
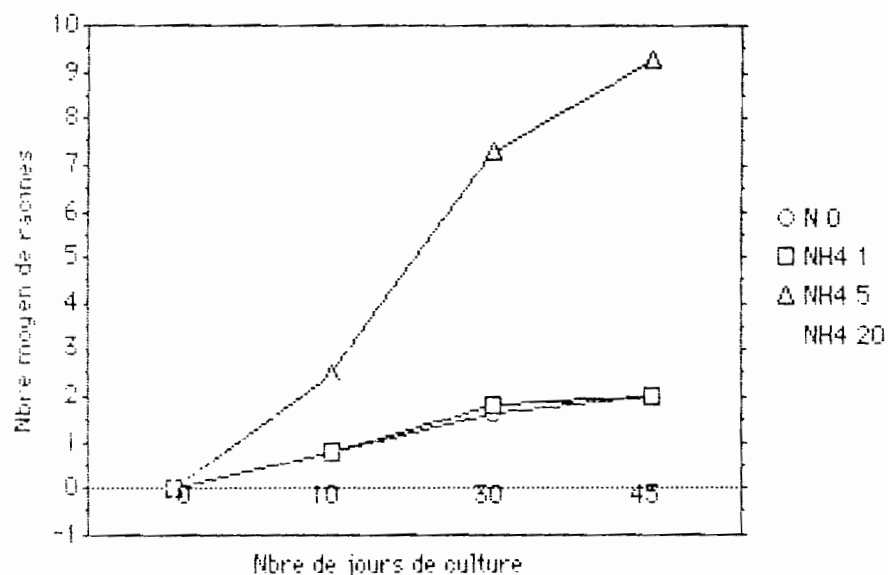


Fig N° 12: Nombre moyen de racines produites par les vitroplants d'*A. albidus* en présence d'ions NH_4^+ pendant 10,30 et 45 jours



N° 13: nombre moyen de racines produites par les vitroplants d'*A. albidus* en présence d'ions NO_3^- et NH_4^+ pendant 10,30 et 45 jours

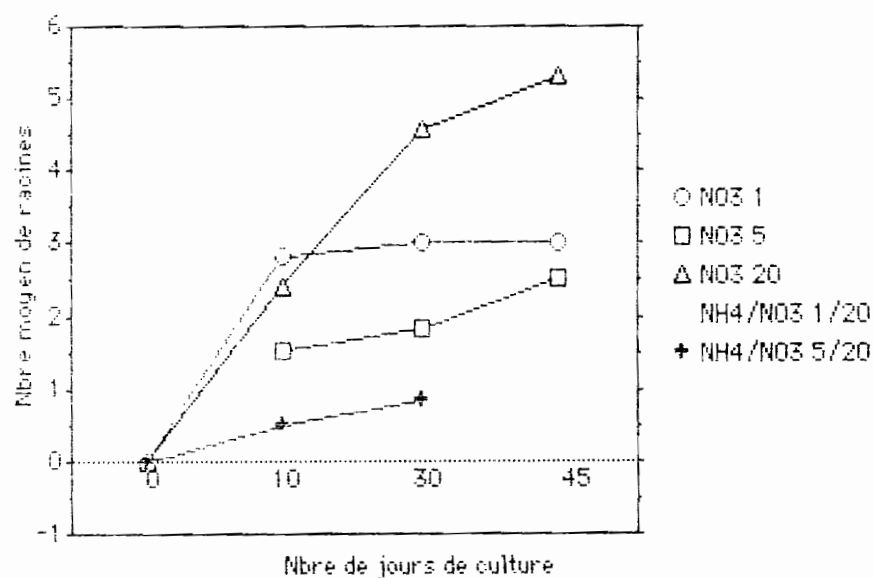


Fig 14: Croissance des vitroplants d'*A. thaliana* en présence d'amides (asparagine et glutamine) pendant 10, 30 et 45 jours

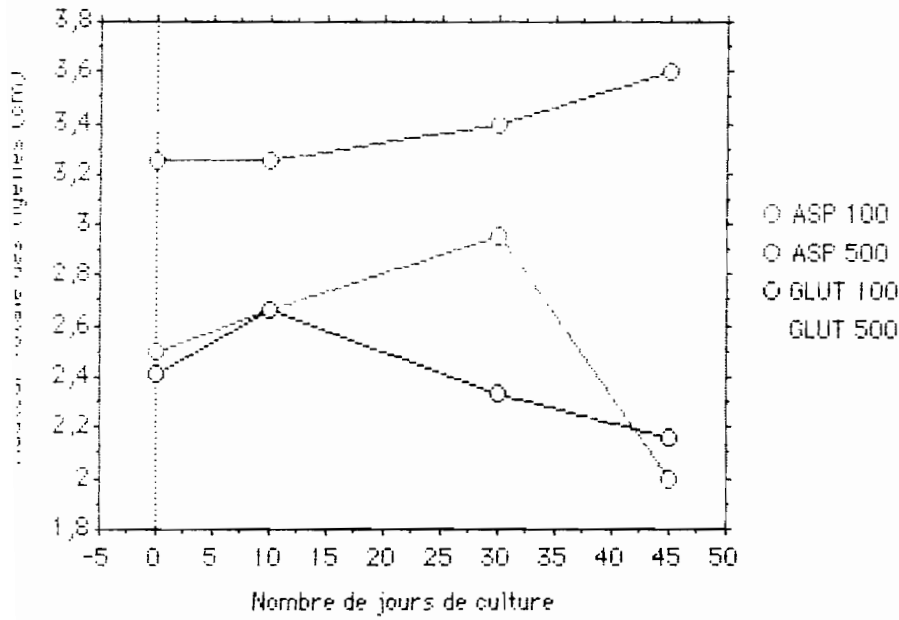


Fig 15 : Nombre moyen de feuilles produites par les vitroplants d'*A. thaliana* en présence d'amides (asparagine et glutamine) pendant 10, 30 et 45 jours

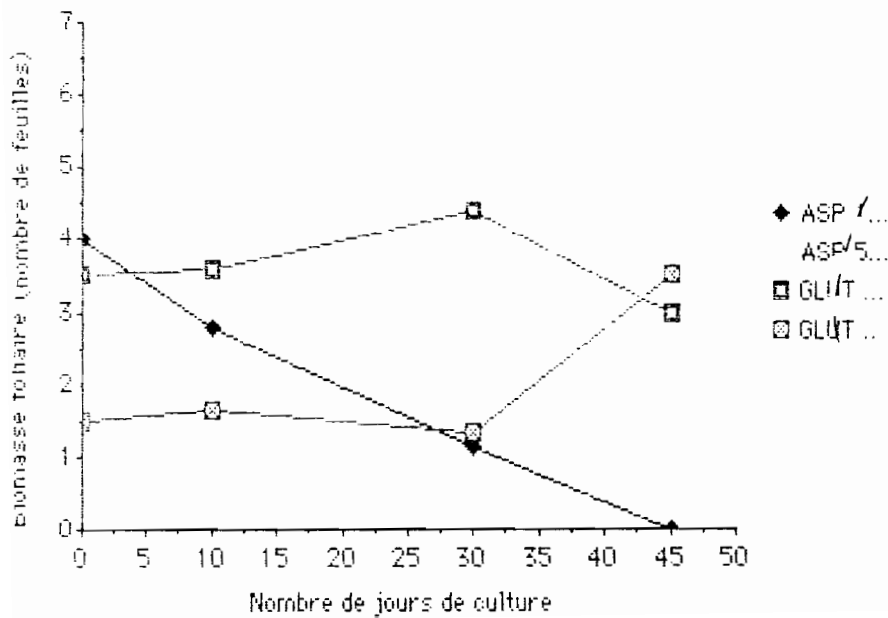


Fig. 16 : Nombre moyen de racines produites par les vitroplants d'*A. albida* en présence d'amides (asparagine et glutamine) pendant 10,30 et 45 jours

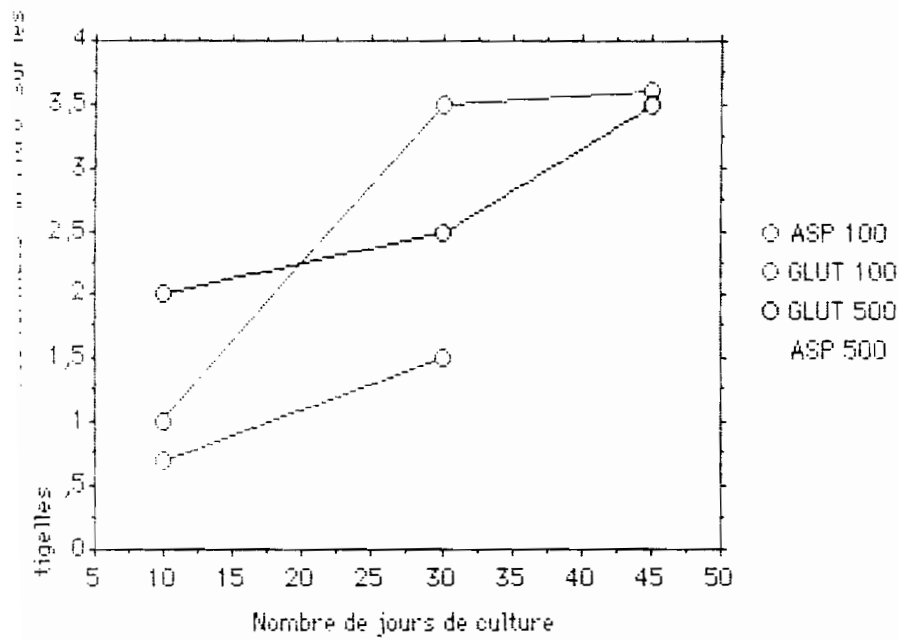
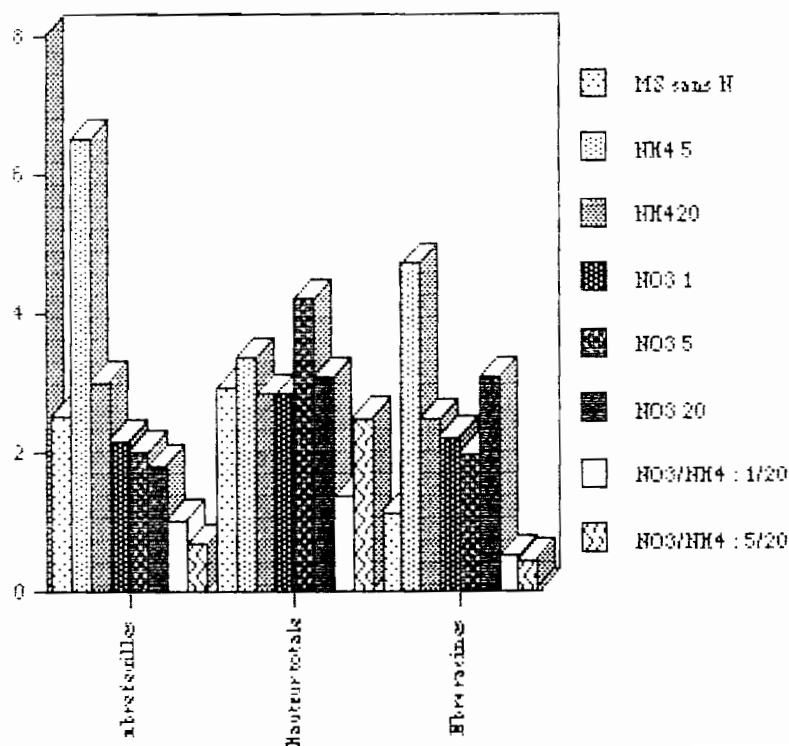
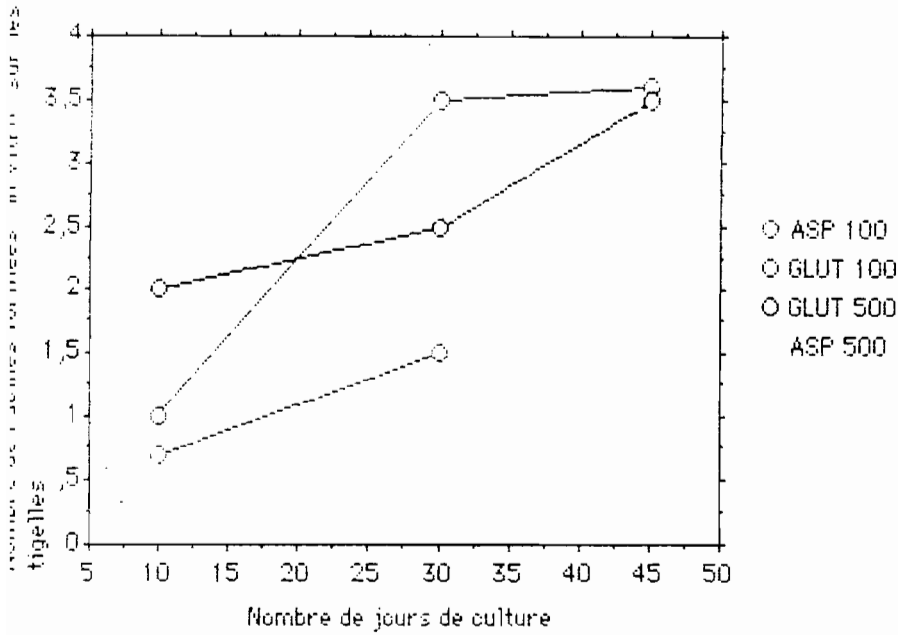


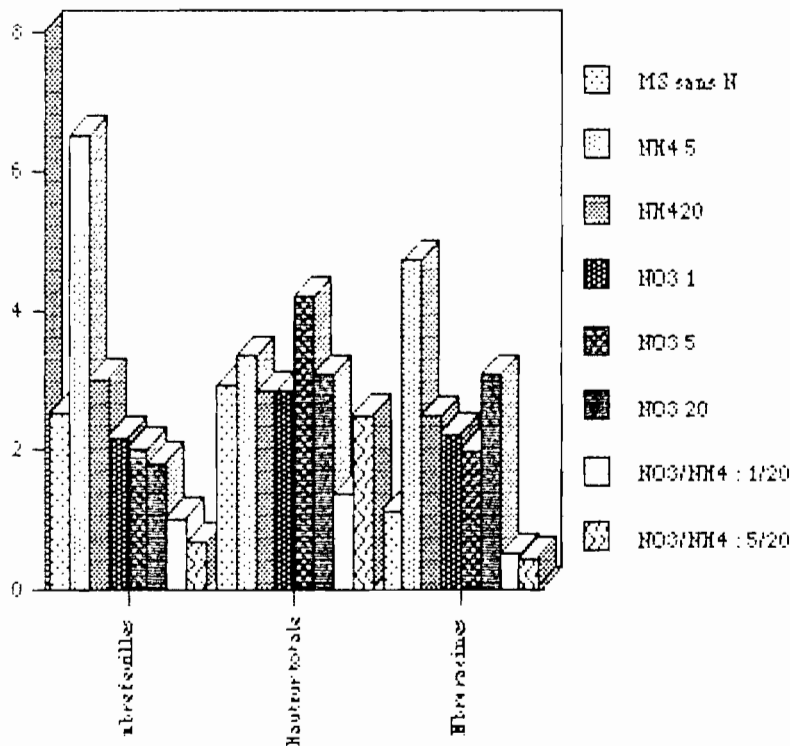
Fig. 17 : comparaison de 8 milieux azotés (l'addition d'azote au milieu M-S de base se fait sous forme minérale) et un milieu sans azote sur la base de critères morphogénétiques (hauteur totale, nombre de feuilles et nombre de racines) prises par les vitroplants d'*A. albida* après 30 jours de culture



N° 16 : Nombre moyen de racines produites par les vitroplants d'*A. albida* en présence d'amides (asparagine et glutamine) pendant 10,30 et 45 jours



N° 17 : comparaison de 8 milieux azotés (l'addition d'azote au milieu M-S de base se fait sous forme minérale) et un milieu sans azote sur la base de critères morphogénétiques (hauteur totale, nombre de feuilles et nombre de racines produites par les vitroplants d'*A. albida*) après 30 jours de culture



L'addition d'asparagine et de Glutamine à 3,5 mM permet de maintenir un taux de croissance satisfaisant pour les explants (fig N° 14). Lorsque la teneur en ces deux éléments azotés est ramenée à 0,7 mM la croissance est ralentie.

B-2) Biomasse foliaire

A 45 jours de culture, la présence de glutamine (0,7 à 3,5 mM) permet de maintenir et d'améliorer le nombre de feuilles produites par tigelle (fig N° 15); lorsque c'est l'asparagine qui est la seule source azotée, on assiste à une chute précoce des feuilles, chute qui n'est pas suivie d'un renouvellement foliaire.

B-3) enracinement

L'optimum du nombre moyen de racines par tigelle est obtenu en présence de la glutamine (0,7 et 3,5 mM) (fig N° 16)

1-3-3-2) Taux de survie des tigelles à 45 jours

Sur un milieu dépourvu d'azote, on note une nécrose fréquente des apex . L'aspect général des plantules dénote une mauvaise croissance et la couleur des feuilles est caractéristique d'une déficience azotée marquée. Malgré tout ces plantules se maintiennent durant toute la culture avec un taux de survie de 80% (tabl. N° 30).

En présence d'azote minéral disponible soit sous forme NO_3^- soit NH_4^+ , les explants sont généralement chlorophylliens jusqu'à la 4ème semaine ; au delà, seuls ceux qui sont cultivés sur un milieu NH_4^+ 5 mM et NO_3^- 5mM conservent une morphologie satisfaisante (absence de nécrose de l'apex, feuilles chlorophylliennes, tige en croissance et nombreuses racines adventives). Les autres explants montrent des signes de nécrose de l'apex et les feuilles présentent une couleur vert-jaunâtre. Le taux de survie le plus élevé (100%) est obtenu en présence de NH_4^+ 5mM.

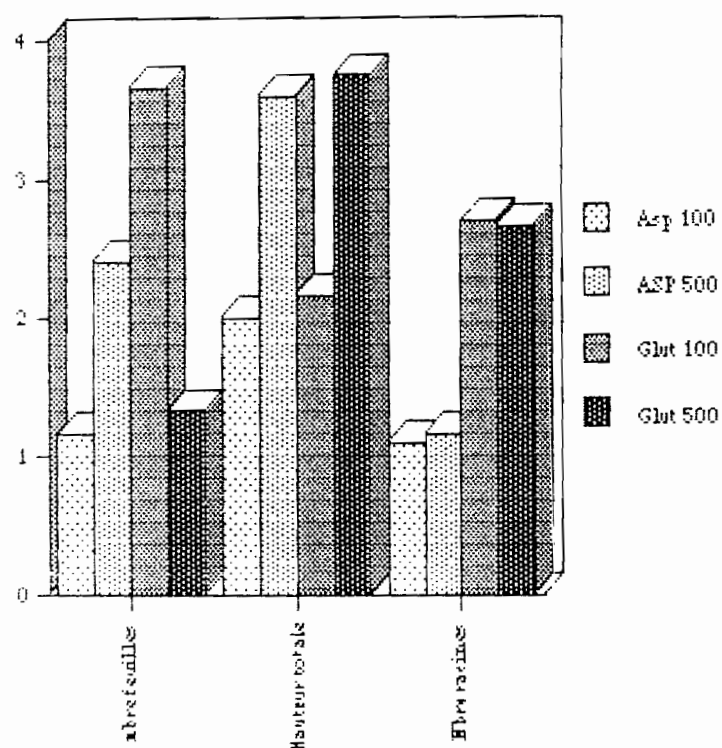
La combinaison NH_4^+ / NO_3^- n'est pas du tout favorable à un bon développement des explants qui commencent à dépérir dès la 3ème semaine. Après 45 jours de culture, la quasi totalité des explants ont dégénéré par suite d'une nécrose totale des tissus.

Les explants cultivés sur milieu contenant de la glutamine commencent à se nécroser et à jaunir à partir de la 4ème semaine; cependant leur aspect général n'est pas critique. Par contre en présence d'asparagine les explants sont en majorité nécrosés ou deséchés.

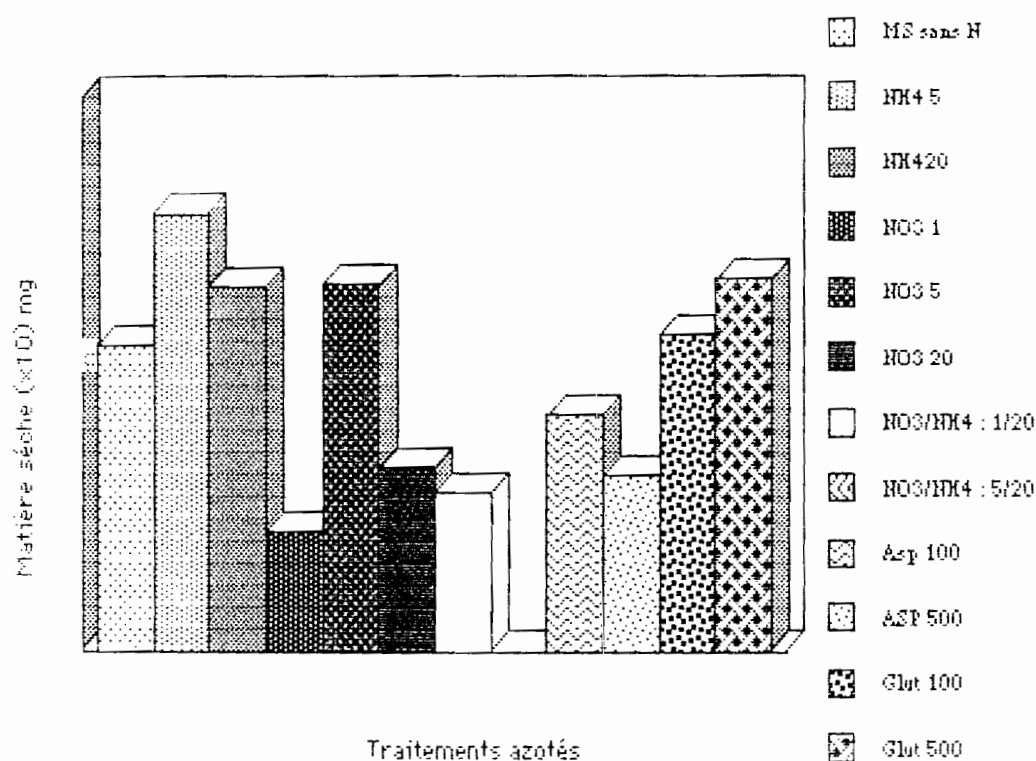
1-3-3-3) Matière sèche

Les tigelles sorties du tube ont été séchées à l'étuve pendant 15 jours ; l'évaluation du poids sec moyen des vitroplants par traitement azoté , nous permet d'apprécier la biomasse moyenne produite pour chaque traitement.

N°18 : Comparaison de 4 milieux azotés (l'addition d'azote au milieu M-S de base se fait sous forme organique) et un milieu sans azote sur la base de critères morphogénétiques (hauteur totale, nombre de feuilles et nombre de racines) duites par les vitroplants d'*A. albidus* après 30 jours de culture



N°19 : Comparaison de 12 milieux azotés (l'addition d'azote au milieu M-S de base se fait sous forme minérale ou organique) et un milieu sans azote sur la base de la quantité de matière sèche produite par les vitroplants d'*A. albidus*



En considérant la biomasse sèche produite (fig N° 19), on constate que les meilleures conditions de croissance et de développement sont réalisées en présence d'une source d'azote équivalente ou proche de 5 mM /l que la source azotée soit minérale ou organique ; en effet la glutamine (500 mg/l) constitue une source azotée qui peut remplacer les nitrates car la biomasse produite dans les deux cas est sensiblement la même. Les explants cultivés sur un milieu dépourvu d'azote malgré leur aspect chlorotique produisent une biomasse supérieure à celle obtenue en présence d'une combinaison $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ (5/20 mM) ou bien en présence d'asparagine, où après une phase stationnaire de croissance, on observe une dégénérescence totale.

1-4) Etude de facteurs susceptibles de prévenir l'abscission foliaire

Nous avons remarqué chez *A. albida* que les pousses développées à partir de bourgeon axillaire "in vitro" ont tendance à perdre leurs feuilles prématurément au delà de 4 semaines de culture . Le jaunissement suivi de la chute des feuilles, débute à la base de la tigelle puis gagne la totalité de la tige (pl. N°12 fig A). La croissance est alors ralentie et la tigelle végète. Pour prévenir cette chute des feuilles, nous avons cherché à améliorer les conditions de culture par transfert des explants sur milieux neufs ou par addition de substances testées sur d'autres espèces en vue d'enrayer l'abscission foliaire.

1-4-1) Fréquence des transferts sur milieux neufs

Les explants ont été régulièrement transférés sur milieux nutritifs neufs dans le but d'améliorer leur taux de survie.

Nous avons comparé des explants repiqués régulièrement à des explants cultivés dans les mêmes conditions mais sans repiquage pendant 28 jours (tabl. N° 31).

Le repiquage fréquent améliore notablement la réponse morphogénétique et la croissance des vitroplants ; en effet le repiquage sur un milieu neuf au bout de 20 jours de culture permet aux explants qui n'avaient pas réagi en début de culture de trouver les conditions adéquates à une bonne expression de la morphogénèse; le pourcentage de caulogénèse augmente aussi avec le repiquage.

L'elongation est particulièrement favorisée ; le taux de croissance est de 259 % par rapport au témoin qui n'a pas été repiqué. Le rafraîchissement fréquent de la base de l'explant, le renouvellement fréquent des éléments nutritifs de base agissent sur l'allongement et préviennent la chute des feuilles puisque les explants conservent leurs feuilles pendant 60 jours au bout desquels on commence seulement à observer une chute des feuilles.

Tabl N°31 : Influence des transferts successifs après 15, 19,25,35,48,60 jours sur un milieu M-S neuf sur le débourrement et la croissance des bourgeons axillaires des nœuds d'*A. albida*.

Explants non transférés			Explants transférés					LONGUEUR (mm)	
Morphogénèse			Morphogénèse						
age de la culture	axes de tige		LONGUEUR (mm)	transferts à n jours de culture	bourgeon débourré		axes de tige		
	Nbre	%			Nbre	%	Nbre	%	
				7 j	36/54	66	3/54	5	0
12 j	10/48	20,8	2,45 ± 1,5	15 j	45/54	83	12/54	22	5,36 ± 4,05
16 j	14/48	30	4,38 ± 3,1	19 j	46/54	86	17/53	32	7 ± 6,06
20 j	14/48	30	5,03 ± 4	25 j	49/54	90	18/53	33	8,21 ± 6,42
28 j *	14/48	30	5,83 ± 5,6	35 j	49/54	90	18/53	33	11,14 ± 9,18
35 j	14/48	30	6,5 ± 5,8	48 j	49/54	90	18/53	33	13,92 ± 9,9
				60 j*	49/54	90	18/53	33	15 ± 10,32

Les jours marqués d'un astérisque (*) représentent la date à partir de laquelle les explants commencent à perdre leurs feuilles

1-4-2) Addition de substances susceptibles de prévenir la chute prématurée des feuilles

En présence de phloroglucinol utilisé à des concentrations élevées (500 à 1000 mg/L) le délai de reprise de l'activité du méristème caulinaire est réduit à 3 jours. Le nombre de bourgeons débouffés est plus important (95,8%) (tabl. N°32) ; la caulogénèse est favorisée (33,3%), ces bourgeons s'organisent en pousses feuillées très allongées. L'addition de phloroglucinol à 1000 mg /L a pour conséquence une nette stimulation de l'élongation des pousses formées qui atteignent 7 à 8 cm au bout de 2 mois de culture sans repiquage.

Ces tigelles sont particulièrement distinctes des tigelles obtenues pour les autres traitements effectuées sur les explants adultes d'*A. albida* par leur extrême vigueur et le développement des feuilles très chlorophylliennes bien étalées et très grandes (pl. N°12 fig B). Sur ces milieux le taux de survie foliaire déterminé par le nombre d'explants qui conservent leurs feuilles intactes, est le plus élevé ; en effet, les explants conservent leurs feuilles pendant 60 jours au bout desquels on commence seulement à observer une chute des feuilles (tabl. N° 33).

L'addition de la glutamine et de l'adénine permet le débouffement des bourgeons axillaires; des ébauches se forment mais restent bloquées à ce stade. La glutamine n'améliore pas le taux de survie ; la plupart des explants présente une croissance extrêmement lente; la chute des feuilles survient au bout de 28 jours.

L'addition de l'adénine a un effet inhibiteur sur la formation des pousses et stimule la formation de cal à la base de l'explant ; la défoliation apparaît de façon précoce par rapport aux témoins.

1-5) Multiplication du bourgeonnement axillaire

De faibles concentrations en cytokinine BAP (0,5 mg/l) associées à l'ANA (1 mg/l) ne pouvant pas induire la multiplication du bourgeon axillaire, nous avons été amenés à définir une méthode favorisant la stimulation et la formation de nombreux bourgeons axillaires à partir d'un seul noeud.

L'imprégnation des noeuds d'*A. albida* dans une solution de BAP à 20 mg/l pendant 15 heures, a pour effet de stimuler la caulogénèse lorsque par la suite, les noeuds sont cultivés sur un milieu M-S dépourvu de cytokinine et ne contenant que de l'auxine ; en effet en l'absence de stimulation un seul bourgeon axillaire se développe (Pl. N°13 fig A). A la suite de l'imprégnation par la BAP des méristèmes axillaires, l'organogénèse est activée et elle se manifeste par la sortie de plusieurs bourgeons axillaires (Pl. N°13 fig B). Les méristèmes

Tableau N° 32: Influence de l'addition de substances organiques (adénine, glutamine, phloroglucinol) au milieu M-S de base sur l'expression morphogénétique d'explants d'*A. albida* cultivés pendant 68 jours

SUBSTANCES	Concentrat. (mg/l)	débourrement bourg. axill.		Caulogénèse		Elongation (mm) après 45 j	remarques
		Nbre	%	Nbre	%		
Phloroglucinol	1000	46/48	95,8	16/48	33,3	29,06	formation de pousses vigoureuses feuilles bien étalées bon allongement
	500	17/24	70,8	8/24	33,3	27	
	250	16/24	66,6	7/24	29,1	14,33	
	100	5/24	20,8	5/24	20	2	
glutamine	1000	24/24	100		0		débourrement du bourgeon axillaire pas de pousses for- mées mais formation feuilles uniquement
	500	24/24	100		0		
	250	14/24	50,33		0		
	100	14/24	50,33		0		
Adénine	1000	2/12	16,66		0		débourrement du bourgeon axillaire formation de feuilles pas de caulogénèse mais importante callogénèse
	500	3/12	25		0		
	250	6/12	50		0		
	100	4/12	33		0		
temoins	MS + CA	10/24	41	3/10	30	7,8 ± 6,4	débourrement et chute prématurée des feuilles

Tableau N° 33 :Influence de l'addition de substances organiques (adénine, glutamine et phloroglucinol) milieu de base (M-S) sur la chute des feuilles d'explants d'*A. albida* cultivés pendant 68 jours

SUBSTANCES	Concentrat. mg/l	délai reprise méristem (j)	durée de la feuillaison	Explants feuillés	
				Nbre	%
Phloroglucinol	1000	3	60	27/48	56,2
	500	15	43	6/24	25
	400	15	55	5/24	20,8
	250	15	33	2/24	8
	100	15	24	0/24	0
glutamine	1000		20	5/22	22,7
	500	12	28	6/24	25
	250	12	28	4/24	16,6
	100	12	28	2/24	8,3
Adénine	1000	5			
	500	4	28	6/24	25
	250	5	22	6/24	25
	100	5	22	8/24	33
temoins	MS + CA	11	30	6/24	25

caulinaires qui en principe, ne produisent qu'un seul bourgeon axillaire sont stimulés pour en former plusieurs. Cette activation concerne la totalité des explants mis en culture (tabl. 34).

L'action stimulante de la BAP se manifeste au bout d'une durée de culture relativement longue de 28 jours sur un milieu dépourvu de cytokinine et ne contenant qu'une auxine l'ANA.

Les explants ont été suivis à 28 jours, 38, 42 et enfin 53 jours après leur transfert sur un milieu dépourvu de BAP.

28 jours après la mise en culture des nœuds, la fréquence relative du nombre de bourgeons par explant montre que 50% des explants ont formé 1 bourgeon, 30% en ont formé 2, 11% en ont formé 3 et 9% ont formé 4 bourgeons visibles (fig 20).

38 jours après la date de la mise en culture, la fréquence relative du nombre de bourgeons est différente ; en effet le nombre d'explants présentant 3 à 4 bourgeons est accru de 20 à 30%, le nombre d'explants avec 2 bourgeons augmente de 20 à 30% alors que le nombre d'explants avec 1 bourgeon diminue de 50 à 20%.

C'est à partir de 53 jours de culture qu'on peut observer des explants ayant développé 5 bourgeons axillaires.

D'autre part, nous avons constaté une forte dominance d'un des bourgeons formés sur les autres qui se développe beaucoup plus rapidement que les autres. C'est au bout de 42 jours de culture que nous avons séparé les bourgeons dominants des autres pour les repiquer séparément sur un milieu neuf.

A la suite de l'ablation du bourgeon dominant, on constate un débourrement des autres bourgeons qui évoluent en pousses.

Cependant il faudra faire remarquer que l'aspect des pousses dans ces cas est différent ; en effet suite à une élongation très rapide des entre-nœuds (tabl. N° 35), les primordia foliaires ne se développent pas et les pousses obtenues ne possèdent que des ébauches foliaires.

1-6) Enracinement des tigelles

1-6-1) Influence du milieu de base

Lorsque les nœuds sont placés sur 4 milieux de base (Q-L; M-S; NN ; GM) à la suite de deux repiquages successifs, et après une observation à 47 jours, un certain nombre d'entre eux s'enracinent spontanément sans un traitement préalable à l'auxine. Le taux d'enracinement est variable en fonction des éléments de base contenus dans le milieu. Il est apparu que les milieux les plus pauvres en éléments minéraux (N-N et GM) sont ceux qui favorisent la plus grande réactivité vis à vis de l'enracinement (tabl. N° 36); en effet le taux optimal dans ces conditions est obtenu avec le milieu GM (25,8%) et le milieu NN

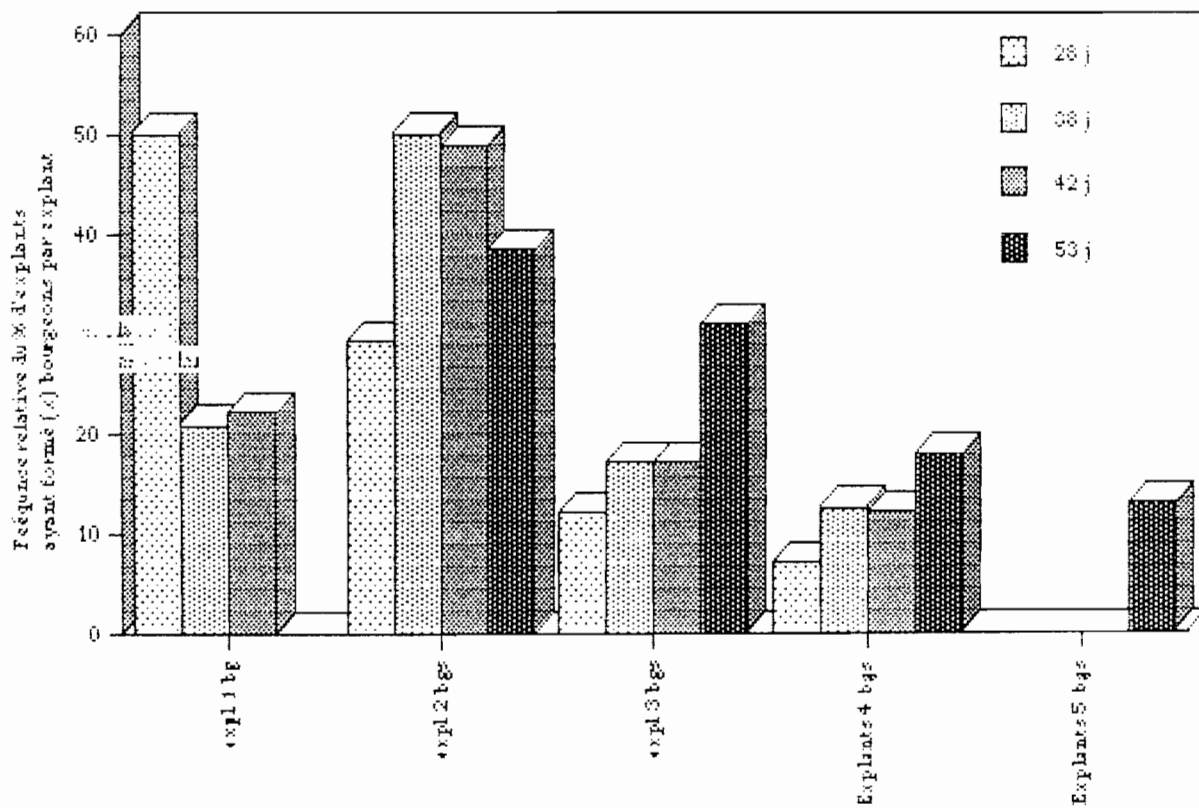
Tabl. N° 34: Action d'une forte stimulation à la BAP (20 mg/l pendant 15 heures) suivie d'une culture sur milieu M-S dépourvu de cytokinine et additionné d'AIA (0,5 mg/l) sur l'activité caulogène et la fréquence d'apparition des bourgeons d'explants d'*A. albida*. Les observations ont été faites à 28 jours, 38 jours, 42 jours et 53 jours de culture.

Durée	Nombre d'expl.	Explants avec 1 bourgeon		Explants avec 2 bourgeons		Explants avec 3 bourgeons		Explants avec 4 bourgeons		Explants avec 5 bourgeons	
		Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%
3 jours	48	24	50	14	29,2	6	12,5	3	6,2	0	0
3 jours	48	10	20,8	24	50	8	17	6	12,5	0	0
2 jours	41	9	22	20	48,7	7	17	5	12	0	0
3 jours	39	0	0	15	38,5	12	31	7	18	5	13

Tabl. N°35: Action d'une forte stimulation à la BAP (20 mg/l pendant 15 heures) suivie d'une culture sur milieu M-S dépourvu de cytokinine et additionné d'AIA (0,5 mg/l) sur l'élongation des bourgeons issus d'explants d'*A. albida*. Les observations ont été faites à 38 jours et 42 jours de culture.

Traitements	durée de culture	longueur (mm)	nbre entre-nœud
plants activés	38 j	14,3 a	
par la BAP	42 j	18,3 a	7,3 a
plants témoins	30 j	10,6 b	4,1 b

Fig N° 20: Influence de l'impregnation des nœuds d'*A. alba* dans une solution de BAP (20 mg/l pendant 15 heures) sur l'intensité de la caulogénèse "in vitro". Les observations ont été faites à 28 jours, 38 jours, 42 jours et 53 jours de culture.



tbl N°36 : Influence de la composition minérale du milieu de culture sur l'enracinement de tiges d'*A. albida* après 47 jours de culture

lieux	nbre explants	plants enracinés		présence de cals	
		Nbre	%	Nbre	%
M-S	23	3/23	13	7/23	30
NN	31	7/31	22,5	0/31	0
GM	31	8/31	25,8	6/31	19,3
Q-L	27	3/27	11,1	5/27	18,5

tbl N°37 : Influence de 3 auxines sur l'aptitude à la rhizogenèse "in vitro" de tiges d'*A. albida* après 35 jours de culture sur milieu M-S de base

auxine	conc (mg/l)	apparition 1ères racines	Taux d'enracinement		présence de cal		morphologie racinaire
			nbre	%	nbre	%	
NA	1	-	0	0	-	-	-
IA	5	11 jours	6/24	25	2/6	33,3	longues fines
B	1	-	0	0	-	-	-
IB	5	11 jours	6/24	25	3/6	50	épaisses courtes
A	1	28 jours	6/24	25	1/6	16,6	longues fines

tbl N° 38: Influence de la pré-culture des tiges d'*A. albida* en présence de M-S additionné de phloroglucinol (1g/l) sur l'enracinement ; les résultats sont obtenus après 35 jours de culture

lieu	concentration	Nbre tiges	taux enracinement	Apparition racines
tiges ayant subi le traitement au Phloroglucinol (1g/l)				
M + AIB	5 mg/l	12	59,60%	11 jours
	1 mg/l	14	33,30%	30 jours
PM + AIB	5 mg/l	9	30,70%	17 jours
	1 mg/l	10	37,50%	16 jours
tiges témoins n'ayant pas subi de traitement au phloroglucinol				
M + AIB	5 mg/l	12	25%	13 jours
	1 mg/l	10	0%	

(22,5%). la culture sur M-S pendant 47 jours favorise la formation d'un cal basal alors sur milieu NN aucun cal n'est formé.

1-6-2) **Influence de la nature et de la concentration en auxine**

3 auxines ont été testées : l'ANA , l'AIA , l'AIB à des concentrations variant de 1 à 5 mg /l. Le matériel végétal est constitué de vitroplants préalablement cultivés pendant 1 mois et demi sur milieu M-S jusqu'à atteindre une hauteur de 3 cm en moyenne. Ces vitroplants proviennent de culture à partir de noeuds prélevés sur les drageons cultivés. Le milieu d'enracinement utilisé est le milieu M-S.

Les plants réagissent très rapidement (11 jours) à des concentrations élevées (5 mg /l) d'ANA et d'AIB (tabl. N°37). Par contre pour l'AIA la réponse est plus longue mais sans callogénèse avec des racines fines et longues qui se développent bien dans le milieu de culture (Pl. N°14 fig C). L'optimum d'enracinement obtenu est de 25% pour les 3 auxines utilisées ; les différences se situent au niveau de la concentration et de la morphologie des racines ; en effet si pour l'ANA et l'AIB, 5mg/l sont nécessaires pour déclencher la rhizogénèse "in vitro" par contre en utilisant l'AIA comme hormone d'induction, on s'aperçoit qu'une plus faible dose suffit pour la production des racines. Par ailleurs, l'AIB produit des racines longues et bien développées (Pl. N°14 fig A) alors qu'en présence de l'ANA, on note souvent la présence d'un cal basal (Pl. N°14 fig B).

1-6-3) Influence d'une pré-culture au phloroglucinol

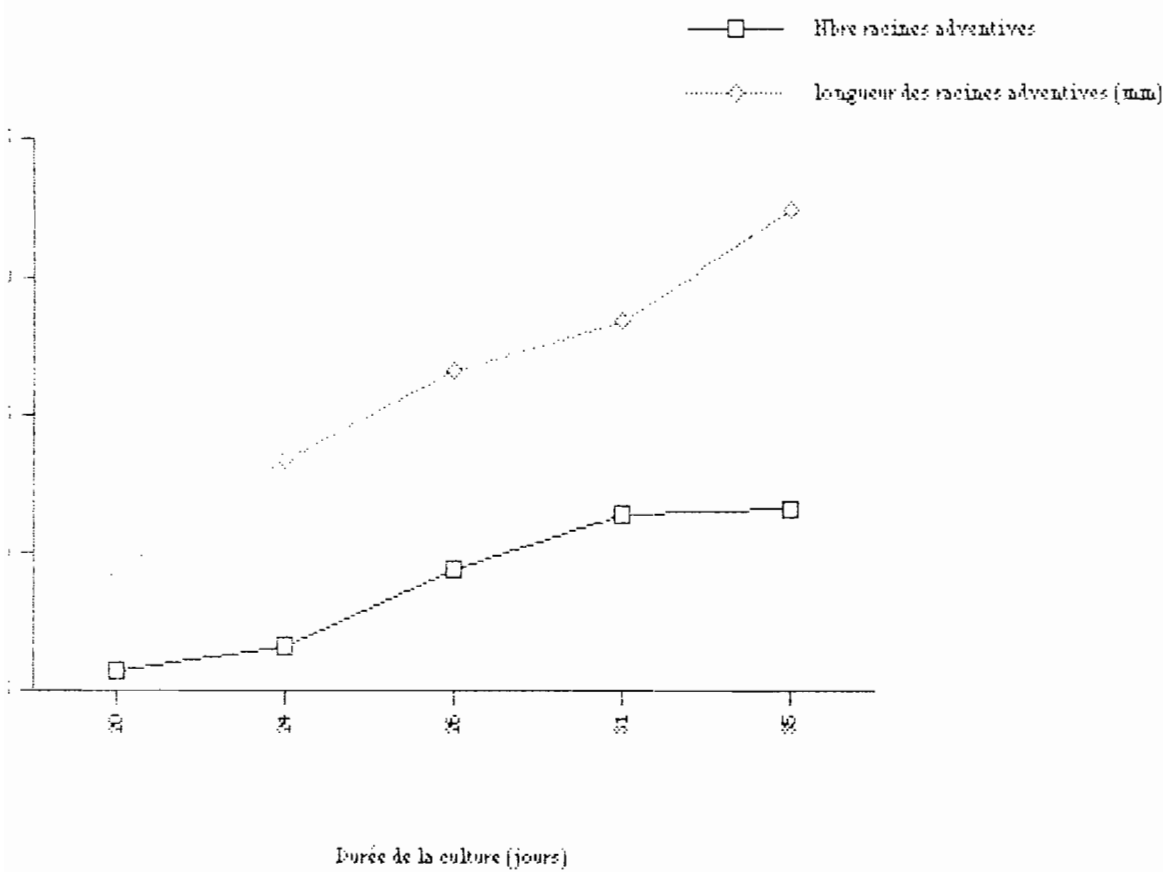
L'addition d'une substance de nature phénolique telle que le phloroglucinol est susceptible d'induire des modifications au niveau du végétal pouvant affecter ou stimuler la réponse à la rhizogénèse.

Des pousses préalablement cultivées sur un milieu contenant du phloroglucinol (1g/l) et suffisamment allongées, ont été prélevées après séparation de l'explant primaire puis mises à enraciner sur 2 milieux de culture MS et WPM additionnés d' AIB à 1 et 5 mg/l. Des tigelles ayant été cultivées sur M-S sans phloroglucinol sont utilisées comme témoins.

Les explants préalablement cultivés sur phloroglucinol s'enracinent au bout d'une durée variable de 11 à 30 jours (tabl. N° 38); alors que chez le témoin seuls 25% des tigelles s'enracinent exclusivement sur milieu AIB 5 mg/l. Il apparait ainsi que la pré-culture sur milieu additionné de Phloroglucinol améliore l'enracinement des plants d'*Acacia albida*.

L'optimum d'enracinement est obtenu (59,6%) avec la combinaison M-S + AIB 5mg/l avec un délai minimal d'apparition des premières racines de 11 jours. L'évolution des tigelles déterminée par le nombre de racines formées et leur longueur (fig N° 21), montre une nette stimulation de la rhizogénèse "in vitro" en présence de phloroglucinol.

Fig. 21: Evolution pendant 35 jours de la rhizogénèse des de tigelles d'*A. zizanioides* préalablement
inoculées en présence de Phloroglucinol (1g/l) pendant 60 jours sur milieu MS + AIB 5mg/L



1-7) Conclusions et discussions

La micropropagation "in vitro" d'arbres adultes ayant exprimé leurs potentialités est la voie la plus rapide et la plus efficace pour améliorer les peuplements forestiers. Cependant, comme cela a été montré chez de nombreuses espèces d'arbres, la plupart des ligneux en particulier les arbres sahéliens sont très récalcitrants à la multiplication végétative (Mc Cown et Mc Cown, 1987; Badji et al., 1992). La propagation par voie végétative d'*Acacia albida* à partir d'arbres adultes pose de nombreux problèmes. Ces difficultés sont liées principalement à l'obtention d'une culture saine à croissance optimale et à développement continu. Plusieurs facteurs interviennent .

A) La saison

Le degré d'expression morphogénétique est soumis à l'influence de la saison chez *A. albida* ; en effet la période la plus propice à la réactivation des bourgeons axillaires, est la période allant du mois de Novembre au mois de Mai ; cette période coïncide avec la période de croissance active végétative et à la floraison. Cette période, consécutive à la phase de repos durant l'hivernage est caractérisée par le débourrement des bourgeons, l'allongement des pousses feuillées nouvellement formées et la floraison. Cette phase est surtout caractérisée par une remobilisation et une circulation des assimilats en particulier les sucres (Bory, 1992); chez *Antiaris africana* (Olofonboba, 1969) l'évolution des teneurs en sucres du bois est lié à la phénologie de la plante ; en effet à la suite de la phase de repos et avant la phase de croissance active, on remarque souvent une augmentation transitoire de l'amidon une mobilisation et une migration des réserves glucidiques lors du gonflement des bourgeons (Bory, 1992). De même, c'est au cours de cette phase que les organes floraux s'édifient et où, lors de la méiose précédant la formation des gamètes, on assiste à un rajeunissement global des méristèmes (Holliday et Pugh, 1975 ; Demarly et Sibi, 1989; Bonga, 1982). Ce rajeunissement se traduit par la néoformation "in vitro" de pousses enracinées et d'embryons à partir de lignées cellulaires somatiques proches des sites où se déroule la méiose ; ce phénomène a été observé sur des fragments de pédoncules inflorescentiels chez le palmier à huile (Reynolds , 1981) ou de pédoncules de cônes femelles immatures chez *Pinus mugo* (Bonga, 1982).

L'augmentation nette du taux de morphogénèse au cours des mois de Février et Mars serait donc liée à cette période favorable où tous les méristèmes se trouvent dans un environnement nutritionnel et hormonal optimal.

B) L'origine du matériel végétal

Il a souvent été démontré que les potentialités morphogénétiques des tissus matures sont tributaires de l'origine du matériel végétal (Boulay, 1979; Franclet, 1980). L'utilisation des techniques de multiplication végétative horticoles ou "in vitro" chez les arbres

forestiers matures, nécessite la localisation ou l'induction préalables "in situ" sur l'arbre des zones ayant conservé leur état juvénile (Francllet, 1979).

Nous avons montré que les drageons prélevés à proximité du système racinaire ont révélé des potentialités morphogénétiques nettement plus importantes que les rejets ou les pousses prélevées sur la cime même pendant la floraison.

Les drageons de *Faidherbia albida* syn. *Acacia albida* (Danthu, 1992), et d'*Acacia koa* (Skolmen et Mapes, 1976), développés à partir du système racinaire, ont montré un niveau de juvénilité se manifestant par un taux de morphogénèse plus élevé que celui des rejets ou des ramets récoltés sur la cime ainsi qu'une morphologie de type juvénile.

Nos résultats en culture "in vitro" confirment ainsi que la proximité des explants initiaux avec le système racinaire de la plante est un facteur déterminant dans l'expression de la caulogénèse "in vitro"; le corrolaire à cette proximité racinaire est une meilleure alimentation en eau, en éléments minéraux et en sucres (car les racines d'*A. albida* contiennent d'importantes réserves amylacées).

C) Réduction de l'oxydation de polyphénols par le pré-trempage

Certaines substances telles que les polyphénols sont accumulées au sein des tissus et peuvent être inhibitrices de la croissance et de l'organogénèse. Il est possible que dans les tissus adultes même rajeunis partiellement, subsistent ces substances inhibitrices de la croissance de type polyphénols.

Le pré-trempage permet l'exsudation de substances inhibitrices de l'explant et favorise sa croissance ultérieure (Cresswell et Nitsch, 1975).

Comme l'a précédemment montré Bonga, (1977) en utilisant des bourgeons dormants d'arbres âgés de 15 à 20 ans d'*Abies balsamea*, le pré-trempage soit dans de l'eau distillée ou dans une solution d'acide caféique, améliore l'organogénèse "in vitro". Nous avons montré que par rapport aux solutions salines de M-S/2, la solution contenant les ions NH_4^+ ou la solution aqueuse favorise la survie des tiges pendant au moins 3 jours. La culture subséquente améliore le taux de morphogénèse "in vitro".

D) la fréquence des repiquages

L'organogénèse "in vitro" d'explants adultes dépend de la miniaturisation de l'explant qui, libéré des corrélations inhibitrices "in situ", exprime ses potentialités morphogénétiques (Francllet, 1981). Nous avons montré chez *A. albida* qu'un repiquage fréquent a un effet favorable sur le développement des bourgeons en pousses feuillées. Cet effet positif est lié d'une part à la réitération de la blessure à la base de l'explant, au moment du transfert tendant à activer les méristèmes quiescents, et d'autre part, à la disponibilité d'éléments nutritifs après chaque transfert sur un milieu neuf. Ces résultats s'accordent avec ceux obtenus par Nozeran (1978); de la Goublye (1980); Francllet, (1981); Moncousin

(1982); Detrez et al., (1992) qui ont montré que les repiquages successifs ou les microgreffages réitérés d'apex améliorent de manière significative la croissance et le développement des tigelles.

E) Les milieux minéraux de base

Au cours de nos expériences, il nous a été permis de définir les conditions satisfaisantes pour la régénération "in vitro" chez *Acacia albida*. La comparaison de quatre milieux minéraux sur la base de leurs performances morphogénétiques, a révélé que le milieu de Murashige-Skoog est l'un des meilleurs milieux utilisés en vue de la régénération de plantes entières. En effet ce milieu favorise la caulogénèse et la croissance en pousse feuillée vigoureuse.

- D'autre part, nous avons pu constater que les milieux MS et NN caractérisés par leur richesse en ions NH_4^+ et NO_3^- sont ceux qui favorisent le plus la croissance et le développement des explants adultes d'*Acacia albida*. Il est apparu que l'élément déterminant dans la réponse à l'organogénèse "in vitro" chez *Acacia albida* est l'azote. Cet azote se trouve sous deux formes ioniques : NH_4^+ et NO_3^- ; parmi ces 2 formes compte tenu du classement respectif des différents milieux de culture en fonction de leur teneur en ces 2 ions, il est apparu que l'ion NH_4^+ discrimine le mieux les différentes réponses observées.

En effet, au vu des résultats, il apparaît que la concentration en ions ammonium explique le mieux le classement obtenu entre les différents milieux de culture ; ainsi, nous pouvons constater que les performances obtenues sur les différents milieux de culture utilisés, décroissent avec la diminution de la teneur globale en ion NH_4^+ .

Il existe donc une corrélation nette entre la teneur en ions azotés et la réactivité "in vitro". Le rôle prépondérant de la teneur en azote du milieu de culture a été démontré chez le peuplier (Mc Cown et Selmer, 1987) et le walnut (Driver et Kunuyuki, 1984) ou le réajustement de la teneur en NH_4NO_3 du milieu WPM à des teneurs proches de celles du milieu M-S améliore de façon notable la croissance.

F) Nutrition azotée minérale et organique

- Azote minéral

L'étude de la nutrition minérale azotée chez *Acacia albida* a montré que cette espèce ne présente pas une grande exigence nutritionnelle vis à vis de telle ou telle source azotée. Par contre elle est très sensible à la concentration ionique globale où l'optimum est atteint à 5 mM/L. En présence de faibles teneurs azotées, (0.7 à 1 mM/L) la croissance est très réduite ; à des teneurs moyennes (5 mM/L) l'optimum de croissance est obtenu ; à des teneurs élevées (20 mM/L), le développement est réduit.

Il est apparu au cours de cette expérience que l'ammonium est bien assimilé par la plante à 5 mM / L, même à 20 mM/l, il est toléré par la plante.

Contrairement à ce qui est généralement admis en culture "in vitro", la présence des ions ammonium ne constitue pas un facteur inhibiteur de la croissance chez *Acacia albida*.

En outre, il a été constaté qu'un développement optimal de la biomasse foliaire ainsi que de la biomasse racinaire est plus fréquent sur les milieux ne contenant que l'ammonium comme source d'azote.

Les ions NH_4^+ se comportent comme des cations antagonistes de K^+ et de Ca^{2+} ou Mg^{2+} (Heller, 1991); une concentration excessive en ions ammonium pourrait avoir comme conséquence d'induire une carence en ces ions ; c'est pour cette raison que la plupart des auteurs (Margara, 1985) considèrent que les ions NH_4^+ sont toxiques lorsqu'ils sont utilisés en culture "in vitro" et bien que l'addition d'ions Ca^{2+} réduise la toxicité des ions ammonium, ils tendent souvent à abaisser sa teneur ionique globale dans le milieu de culture. Mais inversement, la présence des ions NH_4^+ favorise l'entrée des ions PO_4^- .

L'assimilation de l'azote "in vitro" est variable et les besoins spécifiques en nitrates ou ammonium sont différents en fonction des espèces et de l'âge des plants.

Minocha, (1981) a montré sur le bouleau que les explants âgés de 10 semaines environ se développent indifféremment sur les deux sources d'azote alors que les explants âgés de 20 semaines nécessitent du nitrate pour se développer. Chez *Prosopis alba* (Tabone et al., 1986) la présence d'ions NO_3^- favorise la croissance et le développement foliaire.

Daguin et al., 1991 sur des vitroplants de *Mahonia japonica* ont montré que les différents cultivars testés préfèrent une source d'azote ammoniacale par rapport à une source nitrée. Sur le pistachier (Abousalim, 1991) et chataigner (Vieitez et al., 1986) les auteurs ont mis en exergue l'importance de la réduction des ions NH_4^+ sur l'optimisation de la croissance des clones.

Les meilleures conditions d'élongation sont obtenues en présence d'ions NO_3^- à 5mM alors que les fortes teneurs en ions NO_3^- (20mM) sont défavorables à la croissance et à la morphogénèse chez *A. albida*.

Nous avons aussi démontré que la combinaison NH_4/NO_3 (1/20 et 5/20) inhibe la morphogénèse chez *A. albida* ; l'addition simultanée de ces deux ions ne produit pas l'effet positif additif escompté sur l'organogénèse "in vitro", les explants après une phase stationnaire se nécrosent et dégèrent totalement.

On considère généralement que lorsque deux facteurs pris séparément ont chacun un effet positif, alors que ces mêmes facteurs pris ensemble produisent un effet négatif, on doit considérer qu'ils corrigent tous deux un même déficit (Robson, 1983). Les ions NO_3^- et NH_4^+ agissent tous deux pour répondre aux mêmes besoins spécifiques de la plante ; leur addition simultanée dans le milieu de culture n'est pas nécessaire, une seule source azotée suffit et celle qui est nous est apparue être la mieux adaptée aux besoins de l'espèce est l'azote sous forme ammoniacale.

Sur les sols cultivés il est fréquent de trouver l'azote sous sa forme la plus oxydée alors que dans les systèmes forestiers l'azote se trouve à une forte proportion sous une forme réduite (Robson 1983). Par conséquent une nutrition azotée ammoniacale nous semble être un point

particulièrement intéressant lorsqu'on considère la place de l'*A. albida* dans un système agro-forestier sahélien. Si les plantes cultivées annuelles utilisent l'azote sous une forme oxydée, l'arbre qui leur est associé n'est pas concurrentiel dans la mesure où il prélève préférentiellement l'azote ammoniacal. En outre, par sa capacité d'élaborer des nodules fixateurs il restitue au sol d'importantes quantités d'azote.

- Azote organique

L'utilisation de la glutamine comme source azotée permet de répondre aux besoins nutritionnels d'*A. albida*. En effet la glutamine semble être plus assimilable ou plus efficace que l'asparagine. Ici encore la réponse organogène de l'explant est déterminée par la concentration ionique; l'optimum de réponse est obtenu à 3,5 mM alors qu'à 0,7 mM la réponse morphogénétique est faible.

La glutamine et l'asparagine sont les premiers produits exportés à partir de la symbiose fixatrice d'azote chez *A. albida* (Diouf 1995). Ces produits sont facilement solubilisés, rapidement disponibles pour la synthèse protéique et les autres voies métaboliques contrairement aux uréides qui ont une faible solubilité (Sprent, 1979). Ces produits sont rencontrés à l'état libre dans la sève brute et la sève élaborée et constituent une des formes de transport les plus fréquentes des amides. Dans les bulbes et les tubercules, ils constituent les formes sous lesquelles l'azote est stocké (Heller, 1991).

L'azote organique s'est révélé être un important facteur pour favoriser "in vitro" le développement de la pousse; Gamborg (1970) a montré que les seules amides glutamine et asparagine sont susceptibles de remplacer le $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ en culture cellulaire de cals de soja en permettant le maintien d'un taux de croissance élevé pendant une longue période.

G) l'abscission foliaire des tigelles formées "in vitro"

Chez les arbres adultes, la maturation s'accompagne souvent de phénomènes complexes d'adsorption et de rétention différentielle de substances (rapport Calcium/Potassium; rapport $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$; auxine/cytokinine protéines de maturation etc...) certaines substances telles que les polyphénols sont accumulées au sein des tissus; elles peuvent être inhibitrices ou activatrices de la croissance et de l'organogénèse.

Chez *A. albida*, l'addition de phloroglucinol à des concentrations élevées (1000 mg/l) améliore la croissance des pousses et prévient la chute des feuilles pendant 60 jours.

Chez *Leucaena leucocephala* (Dhawan et Bhowani, 1985), l'abscission foliaire est réduite après addition de phloroglucinol à 100 et 200 mg/l sans pour autant améliorer la croissance des clones; par contre l'incorporation de glutamine améliore nettement non seulement la survie des feuilles mais encore augmente le nombre moyen de pousses développées par explant.

L'enracinement obtenu est meilleur à la suite du traitement au phloroglucinol où 60% des pousses s'enracinent sur milieu MS +AIB 5 mg/L. Ces résultats viennent corroborer ceux

obtenus sur le pommier par Jones (1976) qui a mis en évidence l'action jувénilisante du Phloroglucinol grâce à une nette amélioration du taux de prolifération de clones agés.

H) le taux de multiplication

Comme la plupart des ligneux sahéliens qui sont très récalcitrants à la multiplication végétative (Badji et al., 1992), *Acacia albida* présente un taux de multiplication relativement faible. La stimulation des méristèmes en présence d'une forte concentration en cytokinine (BAP) est nécessaire pour activer la formation de nombreux bourgeons axillaires à partir d'un seul. En opérant un pré-trempage dans une solution contenant une forte concentration en BAP, il est possible d'améliorer le rendement de la culture "in vitro" en multipliant le nombre de bourgeons formés par 4 ou 5.

Chez *Acacia koa* (Skolmen, 1986) seules des concentrations élevées (15 mg/l) en cytokinine (BAP, 2iP, Zéatine) sont capables d'induire une multiplication du bourgeon axillaire. Ce même phénomène a été observé chez *Dalbergia latifolia* (Rao, 1985) et *Prosopis alba* (Tabone et al., 1986) où de fortes stimulations en BAP sont nécessaires à la multiplication du bourgeon.

Ces résultats montrent toute la difficulté d'obtenir un taux de multiplication supérieur à 1 chez les ligneux sans une forte stimulation en cytokinine ; cependant il faut noter que chez *Eucalyptus sideroxylon* par contre, les tissus adultes rajeunis par recépage réagissent plus favorablement à de faibles concentrations en BAP (Burger, 1987).

I) l'enracinement

Nous avons montré lors de cette étude que l'enracinement qui est souvent une étape critique dans le cadre de la micropropagation d'arbres adultes, est tout à fait possible chez *Acacia albida*. Le taux optimal d'enracinement est obtenu sur un milieu M-S + AIB 5 mg/l avec un délai de réponse organogène court de 11 jours. Les recherches effectuées avec de nombreuses espèces ont montré que la capacité d'émettre des racines adventives à partir de segments de tiges diminue avec l'âge ; souvent des traitements rajeunissants ont été utilisés pour améliorer le taux d'enracinement. Ces résultats illustrent toute la difficulté d'enraciner du matériel adulte même rajeuni (Franclet, 1981).

J) Le phénomène de croissance épisodique

L'excision des explants des tissus maternels n'est pas aussitôt suivie d'une croissance car les explants subissent une période de latence de durée plus ou moins variable en fonction de l'état du matériel végétal. En moyenne et en l'absence de tout traitement, la période de latence dure 7 à 10 jours au bout desquels le bourgeon se gonfle et la tigelle commence à émerger.

Des travaux sur des clones de *Betula* (Mc Cown et Mc Cown, 1987) ont montré que la durée de la phase de quiescence est proportionnelle au degré de maturation des tissus originels.

Les explants issus de tissus matures d'*A. albidula* produisent une pousse feuillée qui s'allonge lorsque les conditions sont favorables. Au bout d'une période allant de 30 à 45 jours, la croissance est arrêtée, les feuilles jaunissent et leur chute débute à la base de la tigelle pour gagner les feuilles supérieures. Ce phénomène peut être atténué en contrôlant la composition du milieu de culture mais l'abscission ne peut en aucun cas être arrêtée. La tigelle dépourvue de feuilles ne s'accroît plus pendant 5 mois malgré les repiquages fréquents dans des milieux neufs. A partir du 6ème mois, la tige commence à se re-déployer et quelques feuilles apparaissent au sommet.

Il apparaît ainsi que les explants subissent une croissance épisodique suivie d'une phase de quiescence durant une période pour reprendre un nouveau cycle de croissance.

Ce phénomène a été déjà décrit chez un certain nombre d'espèces forestières ligneuses (Mc Cown et Mc Cown, 1987). En effet il est apparu sur Amelanchier, *Betula*, *Quercus* et *Ulmus* que cette croissance épisodique est plus accentuée lorsqu'il s'agit de tissus matures (chez *Quercus*, cette variation cyclique peut durer plusieurs années) ; en effet ils ont constaté qu'avec des explants juvéniles, l'amplitude et la fréquence de cette évolution épisodique sont faibles et le phénomène est plus amorti.

D'après leurs observations, les auteurs ont distingué 3 phases dans l'évolution de la culture :

- une première phase d'isolement de l'explant où la réponse morphogénétique est directement liée à l'état physiologique et ontogénétique du rameau dont il est issu ; si le rameau se trouve dans une période favorable, le débourrement et la croissance du bourgeon sont très rapides, les tigelles formées sont très vigoureuses et de bonne qualité. Cependant cette phase est de courte durée puisqu'elle est le résultat de l'expression du bourgeon isolé des tissus de la plante-mère.

- une seconde phase qui est une phase en plateau durant laquelle la tigelle entre dans une phase de quiescence, la croissance est ralentie, aléatoire ; au cours de cette seconde phase, l'environnement physico-chimique et nutritionnel de la culture joue un rôle prépondérant. Elle peut durer plusieurs mois.

- une troisième et dernière phase appelée phase de production durant laquelle les cultures sont entièrement stabilisées, la croissance des tigelles est continue et leur aspect est homogène. Ce n'est que lorsque les plantules sont bien installées dans cette phase qu'on peut réellement

envisager une production à grande échelle qui sera suivie de l'enracinement et de l'acclimatation.

L'observation et l'étude des modalités de croissance en conditions naturelles permettent de prévoir le comportement ultérieur des explants au cours de ces différentes phases de culture. Car il a été constaté que généralement les espèces végétales dont le modèle de croissance est caractérisé par un développement continu (quelques soient les conditions

environnementales) traversent très rapidement ces différentes phases . Ainsi les plantes herbacées, les plantes annuelles et les semis se stabilisent très rapidement en culture "in vitro". Par contre les plantes telle que *A. albida* qui ont des rythmes de croissance variables en fonction des saisons avec des périodes de croissance épisodique suivies de phase de repos, sont les plus difficiles à stabiliser "in vitro". Du fait de l'existence de contrôles internes physiologiques et indépendants de l'environnement, toute tentative visant à faire évoluer les explants vers une stabilisation totale s'est souvent révélée infructueuse.

Au cours de notre étude, nous n'avons pas pu atteindre le niveau de stabilité et d'homogénéité préalable à une production massale de vitroplants ; les explants ont conservé le rythme de croissance lente et aléatoire dans leurs cellules méristématiques et il serait difficile de prédire à quel moment l'explant sortira de cette phase.

MICROPROPAGATION CHEZ *A. albida*

PLANCHE N°10

Matériel utilisé en vue de la régénération "in vitro" à partir d'arbres adultes

Fig A: Drageons se développant au pied de l'arbre en continuité avec le système racinaire de la plante; ces drageons se forment très fréquemment chez *Acacia albida* .

Fig B: Rejets formés sur le tronc de l'arbre à la suite d'une taille de ce dernier

Fig C: Pousses florifères récoltées sur les arbres au moment de la floraison

A



B



C



PIANCHE N° 11

Regénération "in vitro" d'*A. albida* adulte à partir de nœud issu de drageons

Fig.A: Nœud portant un bourgeon axillaire entre les épines stipulaires au moment de la mise en culture sur un milieu contenant du charbon actif

Fig.B: Débourrement du bourgeon axillaire et sortie de la première paire de pinnules

Fig.C: Elongation du bourgeon axillaire en tigelle

Fig.D: La formation de nouvelles racines suit la sortie des feuilles au cours de la phase d'élongation

11



C



D



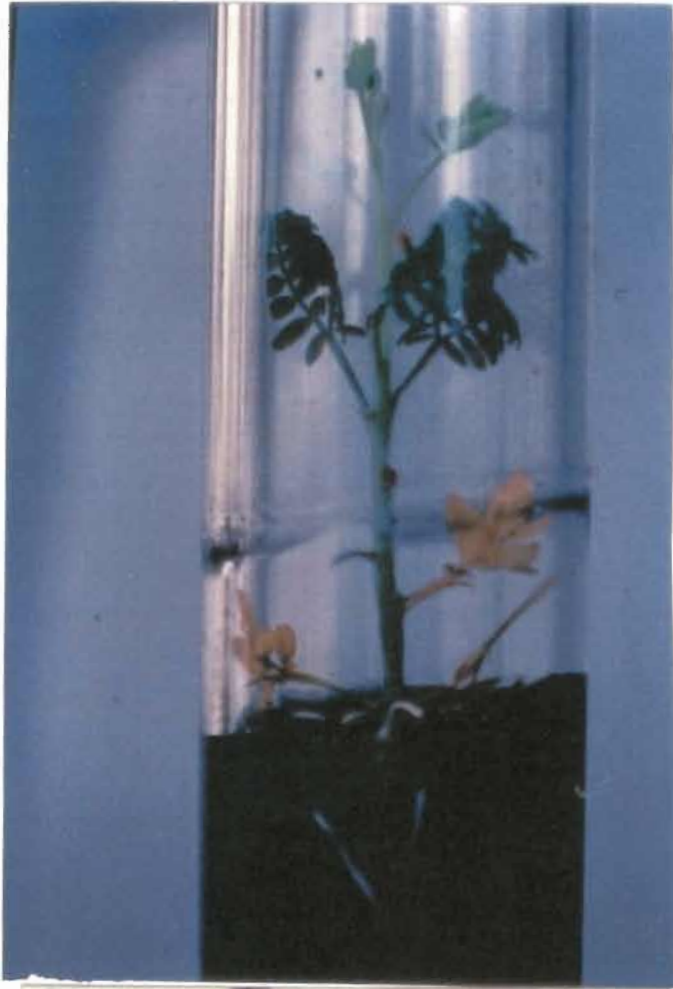
PLANCHE N°12

Défoliation des tigelles d'*A. albida* "in vitro"

Fig.A: Au bout de 30 jours de culture on constate un jaunissement des feuilles à partir de la base suivie d'une abscission foliaire.

Fig.B : A la suite d'un traitement au Phloroglucinol (1g/l), la croissance et l'enracinement des tigelles sont améliorés.

A



50



PLANCHE N°13

Intensification de la multiplication des bourgeons axillaires issus de matériel adulte

Fig.A : A partir d'un explant primaire, en présence de Bap (2,5mg/L), la régénération ne permet d'obtenir qu'une seule pousse feuillée.

Fig.B: A la suite d'une stimulation du bourgeon axillaire par trempage des nœuds dans une solution concentrée en BAP (20 mg/l), 3 bourgeons (flèches) sont initiés par multiplication du méristème axillaire.

A

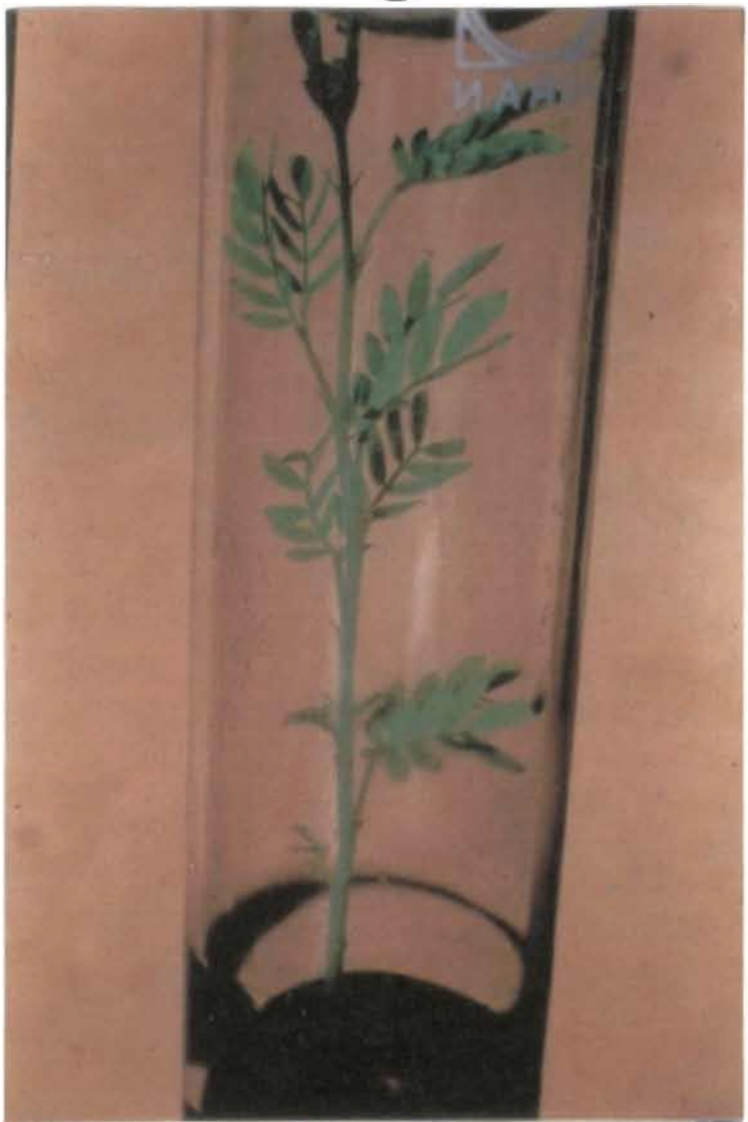


PLANCHE N°14

Enracinement "in vitro" des tiges d'*A. albida* et influence de la nature de l'auxine

Fig.A : Enracinement sur milieu MS + AIB

Fig.B : Enracinement sur milieu MS + ANA

Fig.C: Enracinement sur milieu MS + AIA

A



B



C



Tabl N° 39 : Influence de l'AIA sur la réponse organogène d'hypocotyles d'*A. albid*a au bout de 7 , 17 et 25 jours de culture sur milieu Gamborg.

7 jours de culture					
AIA	nbre total explants	caulogénèse %		Rhizogénèse %	
0 mg/l	15	0		0	
3 mg/l	15	0		33%	
15 mg/l	15	0		25%	

17 jours de culture					
AIA	nbre total explants	caulogénèse		Rhizogénèse	
		Nbre	%	Nbre	%
0 mg/l	15	0	0%	0	0%
3 mg/l	15	3	20%	7	46%
15 mg/l	15	0	0%	8	53%

25 jours de culture					
AIA	nbre total explants	caulogénèse		Rhizogénèse	
		Nbre	%	Nbre	%
0 mg/l	15	5	33%	0	0%
3 mg/l	15	4	26%	7	46%
15 mg/l	15	0	0	15	100%

Tabl. N° 40: Morphogénèse à partir de divers explants d'*A. albid*a en fonction de trois concentrations en 2-4D au bout de 30 jours de culture sur milieu Gamborg

type explant	2-4D	nbre explant	cal	racines
embryon excisé				
	1 mg/l	15	100%	0%
	3 mg/l	17	100%	0%
	6 mg/l	19	100%	0%
hypocot+ épice				
	1 mg/l	12	50%	0%
	3 mg/l	14	80%	0%
	6 mg/l	13	0	0%
hypoc + radic				
	1 mg/l	15	50%	0%
	3 mg/l	14	80%	0%
	6 mg/l	16	0	0%
cotylédons				
	1 mg/l	21	40%	10%
	3 mg/l	25	55%	0%
	6 mg/l	29	100%	0%

2-EMBRYOGENESE SOMATIQUE

2-1) Callogénèse

2-1-1) Influence de l'AIA

Nous avons cherché au cours de cette expérience à induire la formation de cal en utilisant une auxine naturelle l'AIA.

Le matériel de base utilisé dans cette expérience est constitué de fragments d'hypocotyles d'1 cm de long. 3 concentrations en AIA (0, 3 et 15 mg/l) ont été testées sur le pouvoir callogène.

Les résultats sont confinés sur le tableau N°39 .

Sur un milieu totalement dépourvu d'auxine, la réaction des explants est très lente et on n'observe aucun signe de callogénèse. Par contre, des bourgeons se forment au bout de 25 jours de culture. Avec des doses plus élevées d'auxine (3 à 15 mg/L), des racines adventives apparaissent vers le pôle distal de l'hypocotyle alors que vers le pôle proximal de l'hypocotyle proche du collet, se forment des bourgeons adventifs.

Les racines néoformées sont très longues, fines et se développent bien dans le milieu.

L'AIA ne permet pas la formation d'un cal préalable à une embryogénèse somatique ; par contre elle est une excellente auxine pour induire une rhizogénèse et une caulogénèse adventive chez *A. albida* .

Il est intéressant de noter l'existence d'un important potentiel organogénétique chez *A. albida* car sans apport exogène de cytokinine l'espèce est capable de régénérer à partir de fragments d'hypocotyles.

2-1-2) Influence du 2-4 D

L'AIA ne pouvant pas induire la formation de cal chez *Acacia albida*, nous avons été amenés à utiliser une auxine plus forte notamment le 2-4D qui a été utilisé à des concentrations variant entre 0 , , 1 et 3 et 6 mg/l ainsi qu'une solution constituée d'un mélange d'acides aminés et utilisé à 3 concentrations (0,5, 1 et 2 mg/l) (tabl. N° 40). Les explants sont d'origine diverse : des fragments de foliolules, des embryons excisés, des fragments de pétiole, de cotylédons et d'hypocotyles .

La callogénèse est importante lorsque les explants sont placés sur des milieux contenant 1 mg/l de 2-4D ; on obtient en effet 75 à 100% d'explants callogènes au bout de 20 jours de culture ; les explants les plus callogènes sont les portions d'hypocotyles et

Tabl N° 41: Organogénèse à partir de cals d'*A. albida* en fonction de la concentration en BAP au bout de 2 mois de culture sur milieu Gamborg

BAP	RHIZOGENESE		CAULOGENESE		CALLOGENESE	
	Nbre	%	Nbre	%	cal brun évolué	cal peu évolué
1 mg/l	5/32	15%	5/32	15%	22%	56%
2 mg/l	16/36	45%	8/36	23%	33%	22%

20

Tabl. N°42 : Callogénèse des différents types d'explants d'*A. albida* en présence de 2-4D , d'hydrolysats de caséine et d'acides aminés additionnés au milieu de base (E-S) après 5 semaines de culture

explant		milieu A	milieu B	milieu C	milieu D	milieu E
cotyl entiers	couleur	blanc	blanc		blanc	blanc
	aspect callogénèse	fibreux	grumeleux		fibreux	fibreux
	racines	1	2	0	1	2
		0	0	0	0	0
fragments cotylédons	couleur	blanc	jaune	jaune	jaune-brun	jaune
	aspect callogénèse	fibreux	fibreux	fibreux	grumeleux	grumeleux
	racines	2	1	1	2	3
		0	0	0	0	0
embryons	couleur		jaune		jaune	jaune
	aspect callogénèse		gonflé		gonflé	gonflé
	racines		1,5		1	1
			0	0	0	0
hypocotyle	couleur	blanc	creme	creme		creme
	aspect callogénèse	fibreux	fibreux	grumeleux		grumeleux
	racines	1	1	1	0	1
		0	0	0	0	0
foliole	couleur	blanc	blanc	blanc	blanc	blanc
	aspect callogénèse	fibreux	fibreux	fibreux	fibreux	fibreux
	racines	2	3	2	3	3
		0	0	0	0	0

cal : 1 faible intensité callogène
 2 moyenne intensité callogène
 3 forte intensité callogène
 4 très forte intensité callogène

racines : 1 faible intensité rhizogène
 2 moyenne intensité rhizogène
 3 forte intensité rhizogène
 4 très forte intensité rhizogène

Milieu A: Hydrol Caséin 500mg/l
 Milieu B: Hydrol Caséin: 250mg/l
 Milieu C : Acides Aminés 100 ml/l

Milieu D: Acides Aminés 200 ml/l
 Milieu E: Hydrol Caséin: 500mg/l
 +Acide aminés 100 ml/l

surtout les cotylédons (Pl. N°15 fig A); l'épicotyle et la radicule ne produisent pratiquement pas de cal.

A 3 mg/l la callogénèse est plus abondante, elle concerne 80 à 100% des explants constitués des cotylédons et des portions d'hypocotyles.

A 6 mg/l, seuls les cotylédons produisent des masses de cals très volumineuses ; les autres parties excisées ne présentent aucun signe de réaction ; les tissus se gonflent et demeurent bloqués à ce stade.

2-1-3) Induction de l'embryogénèse par addition de BAP

A partir des cals issus des cotylédons et des portions d'hypocotyles, nous avons cherché à induire la formation d'embryons somatiques par suppression du 2-4D et apport de cytokinine.

Après 30 jours de culture sur un milieu callogène, les cals devenus volumineux, blancs crème et de consistance très friable sont replacés sur un milieu contenant de la BAP 1mg/l et 2 mg/l. L'évolution des cals passe par différentes étapes : de la couleur blanc-crème et un aspect fibreux pour certains cals et friable pour d'autres, les cals prennent une coloration plus foncée beige-jaune et deviennent plus compacts. Par la suite la couleur devient brune et la surface du cal devient lisse et brillante. Cette évolution concerne 50% des cals mis en culture sur milieux contenant de la BAP.

Sur d'autres, à partir de ces cals, on obtient une organogénèse "in vitro" (formation de tiges (Pl. N°15 fig C et D) et de racines (Pl. N°15 fig B)(Tabl N°41).

2-1-4) Influence de l'hydrolysate de caséine et d'un mélange d'acides aminés sur l'embryogénèse

Pour cette troisième série d'expérience, nous avons utilisé un milieu contenant du 2-4D à 2 mg /l hormone callogène additionnée d'un mélange d'acides aminés et d'hydrolysate de caséine qui se sont par ailleurs révélées être des substances inductrices d'une embryogénèse somatique chez différentes espèces.

- callogénèse

Les cotylédons produisent un abondant cal de couleur jaune crème au bout de 5 semaines de culture sur milieu 2-4 D (tabl. N° 42).

L'embryon excisé produit très peu de cal ; la portion hypocotylaire produit du cal localisé aux extrémités, au niveau des zones de cicatrisation.

Les folioles sont des explants très callogènes ; en effet dès la première semaine de culture un abondant cal se forme au niveau des zones d'incision qui gagne ensuite la totalité de la surface de la foliole au bout de 3 semaines de culture. La callogénèse est beaucoup plus importante au

Tabl N°43 : Morphogénèse des différents types d'explants d'*A. albida* en présence d'hydrolysats de caséine et d'acides aminés au bout de 4 mois de culture sur milieu E-S

explant		milieu A	milieu B	milieu C	milieu D	milieu E
cotyl entiers	couleur	brun	brun	jaune	brun	brun
	aspect	compact	compact	compact	friable	friable
	callogénèse	3	3	1	3	3
	racines	2	2	0	2	2
fragments cotylédons	couleur	jaune	jaune	jaune	brun clair	brun
	aspect	friable	compact	fibreux	compact	compact
	callogénèse	3	3	1	2	3
	racines	0	2	0	0	0
embryons	couleur		jaune		jaune	jaune
	aspect		gonflé		gonflé	gonflé
	callogénèse		1		1	1
	racines		0		0	0
hypocotyle	couleur	jaune	jaune	jaune		jaune
	aspect	fibreux	fibreux	friable		friable
	callogénèse	1	1	1	0	1
	racines	0	0	0	0	0
foliole	couleur	jaune	brun clair	jaune	jaune	jaune
	aspect	friable	friable	friable	friable	friable
	callogénèse	4	4	2	3	3
	racines	2	3	2	0	0

cal : 1 faible intensité callogène

2 moyenne intensité callogène

3 forte intensité callogène

4 très forte intensité callogène

Milieu A: Hydrol Caséin 500mg/l

Milieu B: Hydrol Caséin: 250mg/l

Milieu C : Acides Aminés 100 ml/l

racines : 1 faible intensité

2 moyenne intensité

3 forte intensité

4 très forte intensité

Milieu D: Acides Aminés 200 ml/l

Milieu E: Hydrol Caséin: 500mg/l

+Acide aminés 100 ml/l

niveau des cotylédons qui réagissent mieux aux différentes concentrations d'acides aminés et d'hydrolysats de caséine.

- Induction de l'embryogénèse somatique

Au bout de 5 semaines de culture, les cals sont sortis du milieu de callogénèse pour être placés sur un milieu dépourvu de 2-4D sans cytokinine, mais contenant toujours les additifs de départ. Le sucre a été élevée à 43 g/l et la gélose réduite à 5 g/l; Les résultats rassemblés dans le tableau N°43 résument l'évolution des différents types d'explants sur les divers milieux utilisés.

Les cotylédons produisent d'abondants cals quel que soit le milieu ; ce cal est souvent de couleur jaune ou brune mais plus fréquemment brune. Il peut être grumeleux et présenter des signes d'évolution dans le sens du brunissement et compactage; à la surface des cals on observe des protubérances de forme arrondie de couleur plus claire que la masse du cal.

Les cals issus des folioles évoluent vers des structures de couleur jaune compactes ou friables ; ce cal se détache en petites boules de 1 à 2 mm de diamètre ; sur ces explants on note la présence de racines adventives mais aucune caulogénèse n'est observée.

Les fragments d'hypocotyle qui produisent essentiellement des cals jaunes aux extrémités, n'évoluent pas .

L'embryon excisé est très faiblement callogène quelque soit le milieu

2-2) Histologie des cals obtenus

En prélevant les cals brunâtres avec des gonflements irréguliers localisés à la surface du cal, nous avons effectué des sections. Les coupes (Pl N°16 fig A et B) montrent deux types de cellules:

- des cellules de grande taille, arrondies ou légèrement allongées, très vacuolisées à paroi mince et présentant de larges espaces inter cellulaires. Ce sont des cellules parenchymateuses constituant l'essentiel de la masse du cal.

- des cellules de petite taille peu vacuolisées, au contenu très dense et aux parois plus épaisses; elles sont accolées les unes aux autres sans espace intercellulaire, et se divisent activement. Ces cellules présentent les caractéristiques des cellules-oeuf embryogènes.

Ainsi au sein du cal, à l'intérieur d'une masse parenchymateuse apparemment indifférenciée, quelques cellules agrégées au contour bien net densément colorés se sont organisées. Il apparaît que ces cellules sont organisées en méristémoïdes au sein du cal et

sont à l'origine des embryoides au tout début de leur phase d'évolution. En effet, ces amas cellulaires se divisent et évoluent en passant par les différentes étapes comparables à celles observées lors de l'embryogénèse sexuée (stade globulaire, cordiforme et torpille).

On peut observer l'élaboration d'un axe embryonnaire au stade globulaire (Pl N°16 fig N°A), et lorsque les méristémoides sont cordiformes et torpilliformes, la différenciation s'effectue en deux pôles opposés, le pôle caulinaire et le pôle racinaire (pl N°16 fig B).

Il apparaît, au vu de ces observations, que des structures embryogènes se sont différenciées au sein du cal en empruntant la voie normale (globulaire, cordiforme, torpille etc...) mais ces structures embryonniques n'ayant pas trouvé de conditions adéquates de germination, sont restées bloqués à ce stade.

En effet, le transfert des cals sur un milieu dépourvu d'hormones et contenant de l'hydrolysate de caséine considéré comme substance généralement indispensable à l'embryogénèse somatique, n'a pas produit d'effet positif sur l'évolution ultérieure des cals. D'autre part, la culture de ces cals a duré 21 semaines au bout desquels nous avons sacrifié ces cals pour en déterminer la structure histologique ; il a été observé sur les coupes un début de dissociation des embryoides de la masse indifférenciée du cal qui devrait, si la culture était poursuivie, aboutir à la libération des embryoides.

2-3) Discussions

Chez *A. albida*, l'induction de cals embryogènes est possible à partir de tissus cotylédonaire. Comme chez *Acacia koa* (Skolmen et Mapes, 1976) à partir de tissus hypocotylaires, les cals d'*A. albida* développent en effet des nodules méristématiques qui présentent les différents stades morphologiques caractérisant l'évolution ontogénétique d'un embryon somatique (globulaire, cordiforme, torpille et enfin embryon avec cotylédons).

Ces structures embryoides évoluent de manière similaire aux embryons zygotiques.

Chez *A. albida* comme chez *Hevea brasiliensis* (Carron et al., 1984), le vieillissement du cal semble être une condition favorable à l'induction embryogène.

La germination qui constitue une étape critique dans le processus de maturation des embryons n'a pas pu se réaliser chez *A. albida*. Skolmen (1986) sur *Acacia koa* a rapporté la difficulté d'obtenir des plantules à partir des embryons formés. En cherchant à pallier à l'absence de stimuli d'origine cotylédonaire, il a ajouté 1% d'extrait de cotylédons ; en fait, parmi tous les traitements appliqués sur les embryons (réduction de la pression osmotique du milieu de culture, augmentation de la teneur en lait de coco, en cytokinine et en auxine), aucun n'a réussi à lever l'inhibition exercée sur la germination de ces embryons. Chez *A. albida*, le transfert des cals sur un milieu dépourvu d'hormones et contenant de l'hydrolysate de caséine considéré comme substance généralement indispensable à l'embryogénèse

somatique et du charbon actif, n'a pas produit d'effet positif sur l'évolution ultérieure des cals.

Cependant comme l'ont fait remarquer certains auteurs, (Sommer, 1980 et Sondhal et al., 1978), l'étape finale de la maturation des embryons somatiques requiert un passage en milieu liquide agité permettant de libérer ces structures embryoniques de la masse compacte du cal. En outre chez *Hevea brasiliensis* (Carron et al., 1984), il a été constaté qu'à la suite de la dislocation des cellules parenchymateuses entourant le nodule méristématique, ce dernier se libère progressivement pour émerger à la surface du cal et produire des embryons normalement constitués qui germent rapidement.

PLANCHE N°15

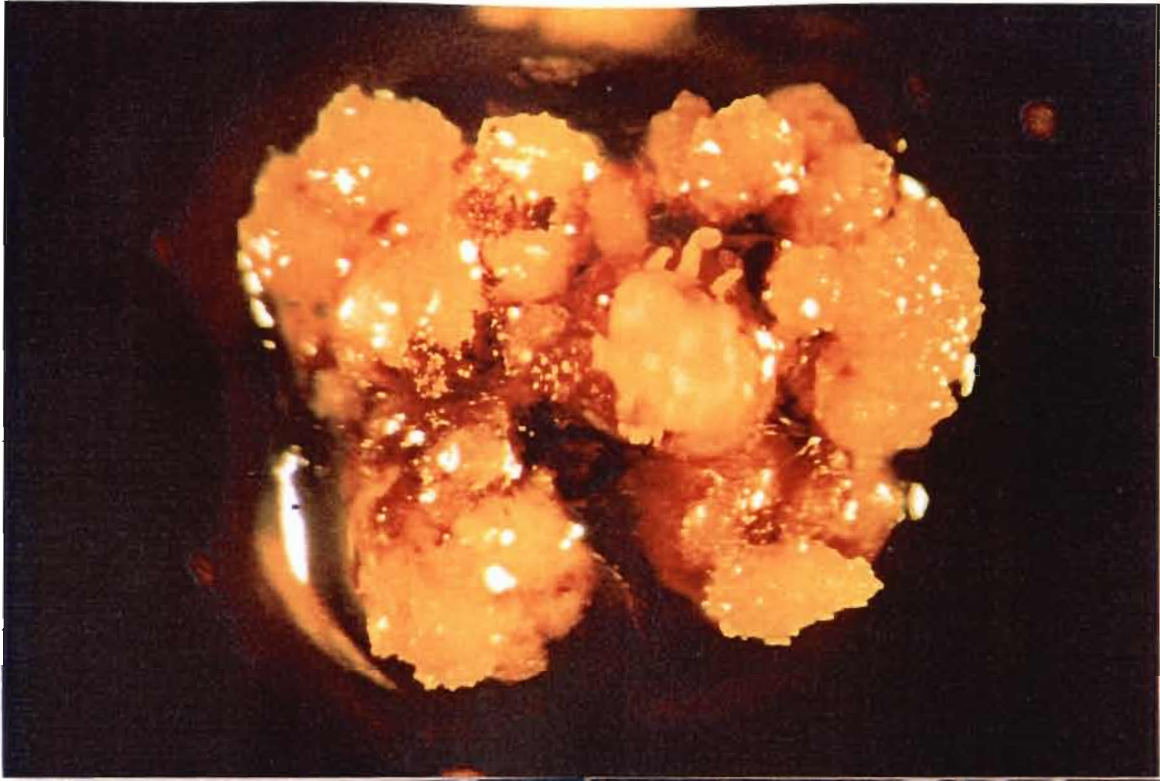
Organogénèse à partir de cals d'*A. albida*

Fig.A: Callogénèse sur fragments de cotylédons après une induction sur un milieu contenant du 2-4D .

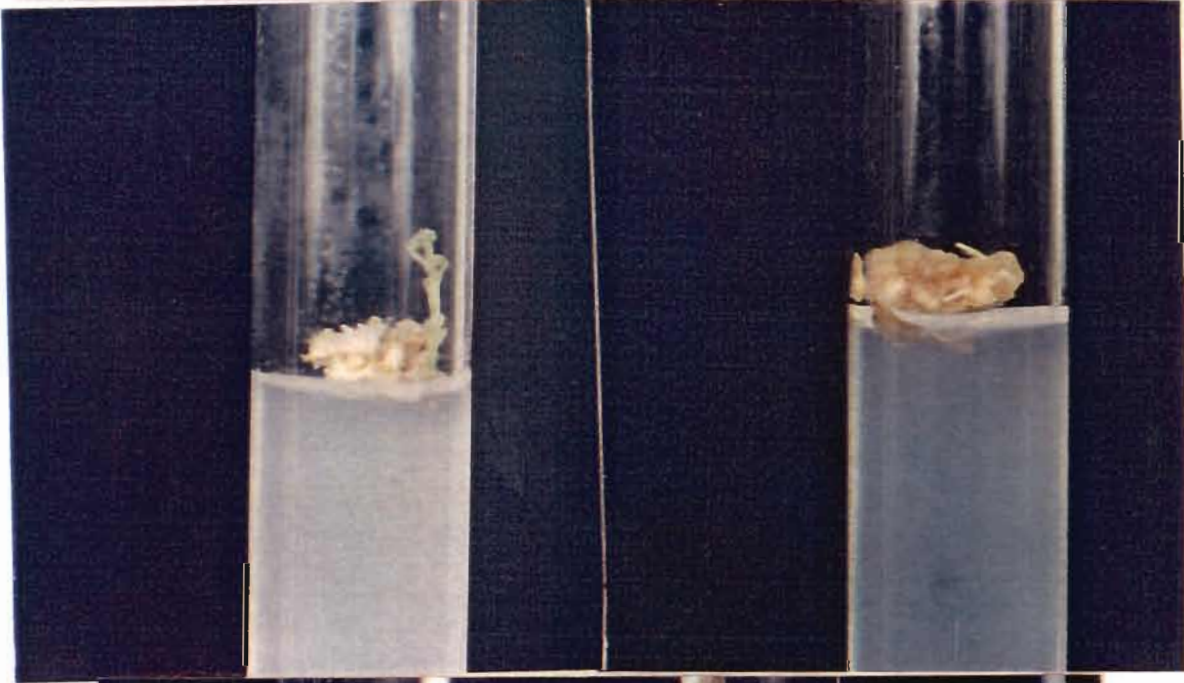
Fig.B : Cal cotylédonaire organogène produisant des racines adventives.

Fig.C et D : Cal cotylédonaire organogène produisant des bourgeons adventifs évoluant par la suite en pousses feuillées.

A



C



B

D



PLANCHE N°16

EMBRYOGÉNÈSE SOMATIQUE À PARTIR DE CALS COTYLÉDONAIRES D'*A. ALBIDA*

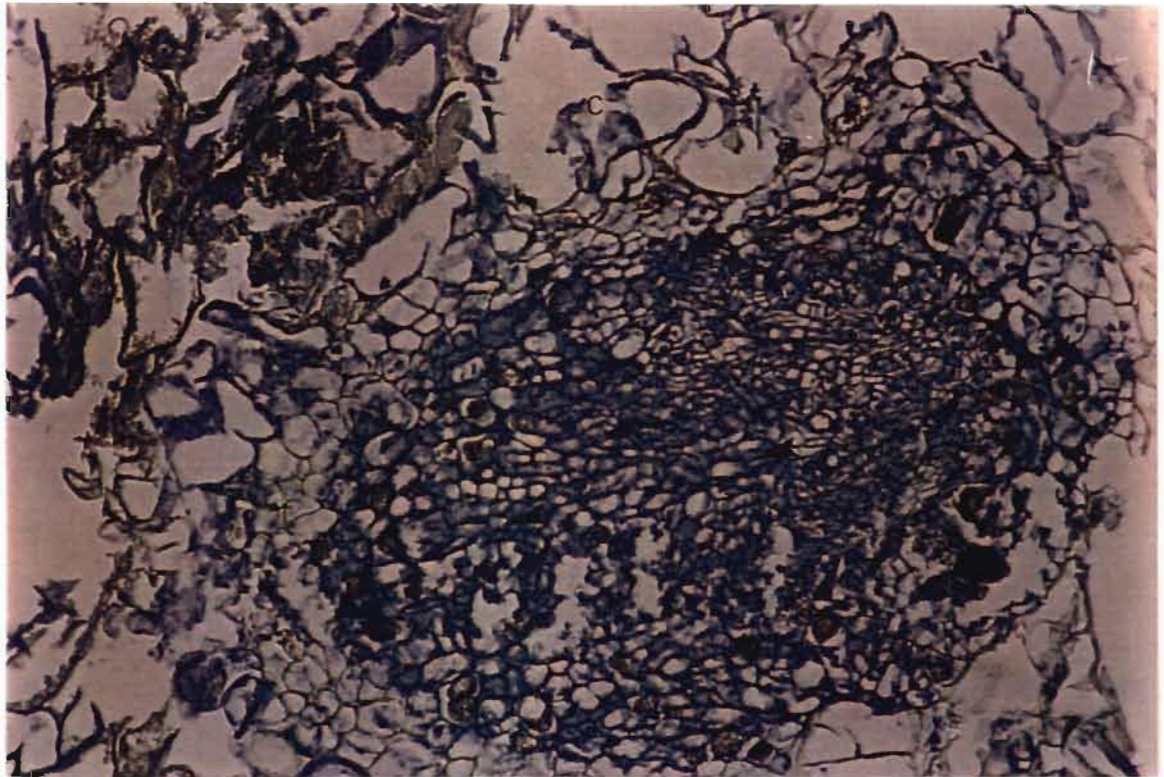
Fig.A : Embryoïde développé sur cal cotylédonaire d'*A. albida* au stade globulaire : l'embryoïde se trouve inclus dans la masse du cal constitué de grandes cellules très vacuolisées ; au sein de cette masse se différencie et s'organise une structure de forme globulaire constituée d'un ensemble de cellules de petite taille très colorées.

Ces cellules s'organisent autour d'un axe polarisé médian () qui déterminera ultérieurement le pôle caulinaire et le pôle racinaire. (Gr x 400)

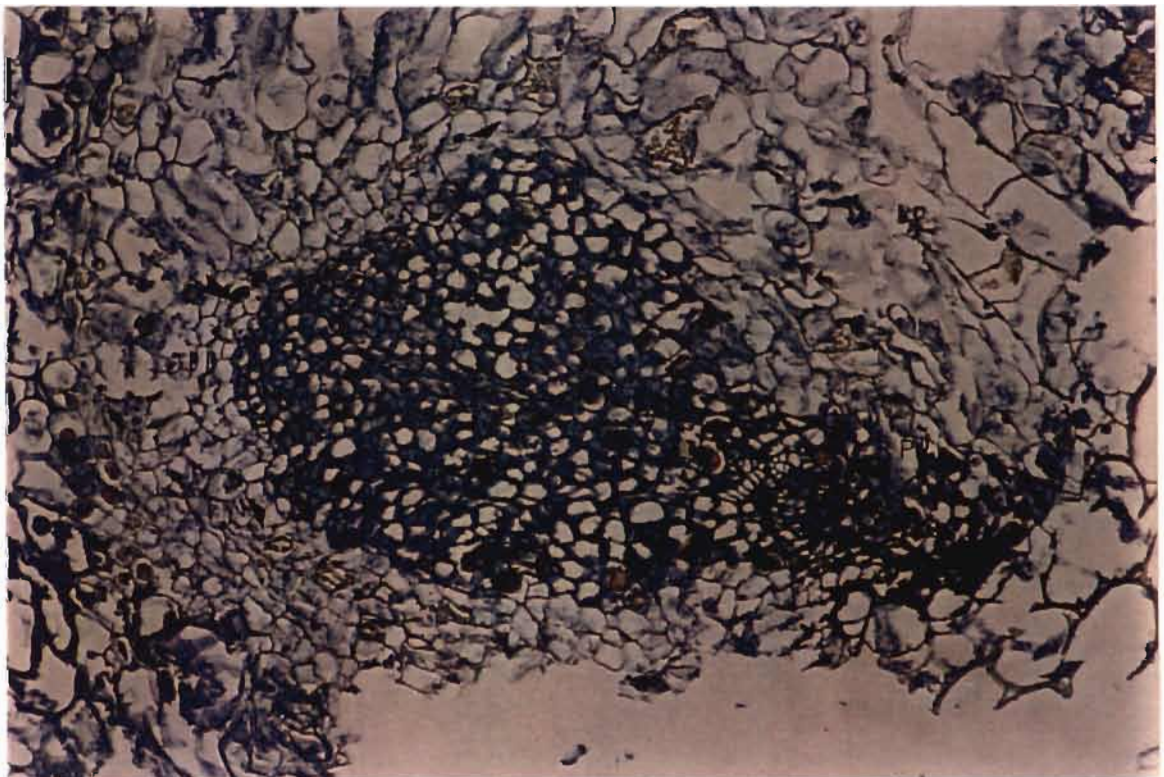
Fig.B : Structure embryoïde torpilliforme; la structure du pôle apical de tige est bordée par les deux lobes cotylédonaire, le pôle racinaire se forme.

PC : Pole caulinaire ; PR : Pole racinaire. (Gr. x400)

A



B



Tabl N°44 : Influence de l'âge et de la longueur de la racine principale d'*A. albida* sur l'aptitude à produire des bourgeons adventifs à partir d'explants racinaires cultivés sur milieu M-S/2 pendant 4 jours.

Longueur de la racine principale	age des explants (j)	Nbre explants total	Bourgeonnement		Nbre bourgeons/expl
			Nbre	%	
5-9,5 cm	12	71	11/71	15	1,7 b
10-17 cm	19	69	35/69	50,7	3,3 a
17-25 cm	27	44	24/44	54,5	2,51 a

Tabl N°45 : Influence du diamètre des explants sur le taux de bourgeonnement adventif à partir de segments de racines d'*A. albida* cultivés sur M-S/2 pendant 7 semaines .

Matériel	nbre	%	diamètre racin (mm)
racines caulogenes	23/59	38,9	2,04 a
racines acaulogenes	36/59	61	1,5 a

3- CULTURE DE RACINES EXCISEES

3-1) Description de l'apparition des bourgeons végétatifs adventifs

En réaction à la fragmentation de la racine et à l'ablation du méristème apical racinaire, les racines excisées développent au bout de 48 heures de nombreuses ramifications latérales. Au bout de 7 jours de culture des fissures apparaissent sur toute la longueur de l'explant racinaire. (pl N°17 fig A) Ces fissures laissent apparaître un tissu interne de couleur verte. En présence de lumière, les tissus racinaires originels d'*A. albida* non chlorophylliens se chargent en chlorophylle. A partir de ces tissus racinaires, des ébauches de points végétatifs émergent (pl N°17 fig B). Ces ébauches, souvent de couleur rouge, en raison de la présence de pigments anthocyaniques, évoluent en bourgeons bien individualisés puis en pousses feuillées (pl N°17 fig C).

3-2) Influence de la position de l'explant sur la racine

En numérotant les segments de racines en fonction de leur position initiale respective sur la racine (fig N° 22), on s'aperçoit que l'intensité de la réponse organogénétique décroît progressivement de la portion proximale vers la portion distale de la racine. En effet la portion proximale, proche du collet constituée des 3 premiers cm est la zone la plus organogène. La fréquence relative du nombre de bourgeons formés à cet endroit est la plus élevée (70%). Plus on se rapproche de l'apex racinaire, plus la fréquence décroît. Nous avons aussi noté que les bourgeons apparaissent sur toute la surface de l'explant racinaire que cette surface soit en contact ou non avec le milieu de culture mais très souvent à l'extrémité proximale) (pl N°18 fig N°A).

3-3) Influence de la longueur ou l'âge de l'explant

A la suite de la germination, les jeunes plantes sont pré-cultivées en tube sur un support de perlite /vermiculite imbibé de milieu minéral de M-S /2. La pré-culture d'une durée variable, favorise la croissance de la plantule qui développe un système racinaire pivotant et très allongé . Les fragments de racines d'une taille moyenne d'1,5 cm ont été prélevés sur ces plants pré-cultivés.

La pré-culture des racines pendant des durées variables (12 ; 19 et 27 jours après la germination) permet de différencier 3 catégories de plantules en fonction de la longueur de la radicule:

12 jours : longueur de racines comprise entre 5 et 9,5 cm

19 jours : " " 10 et 17 cm

Fig N°22 : Influence de la position du fragment de racine d'*A. albidus* sur l'aptitude à produire des bourgeons adventifs après 30 jours de culture sur milieu M-S

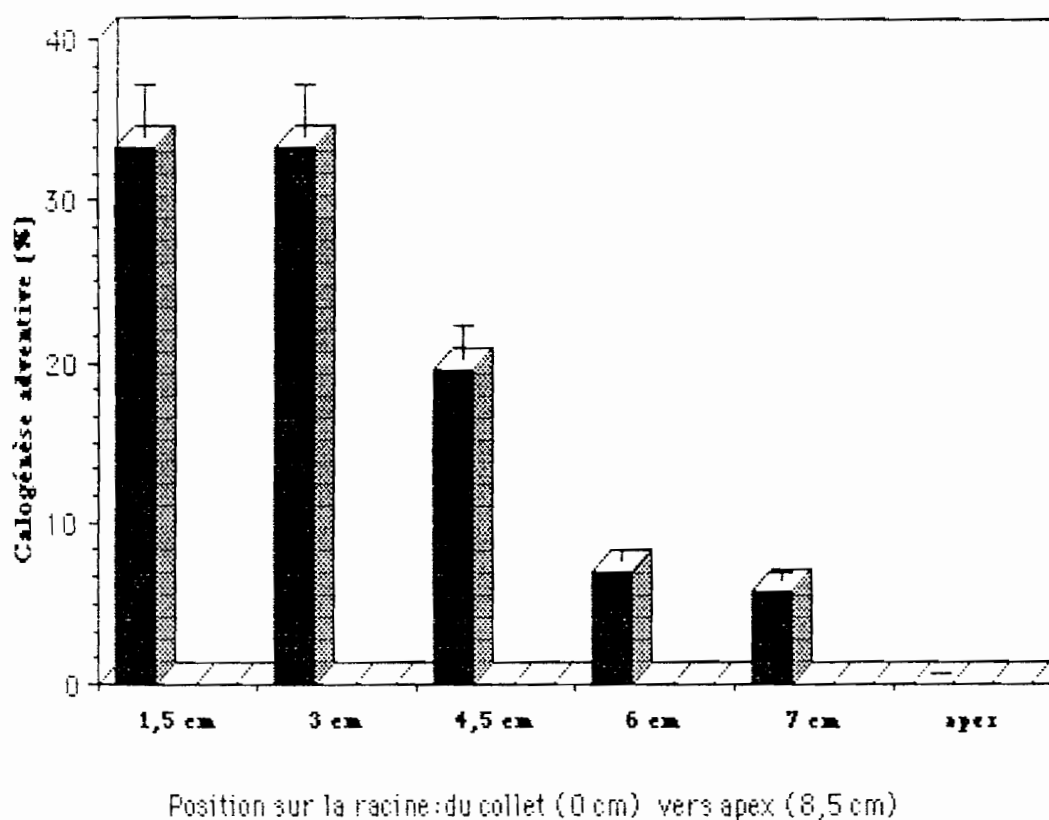
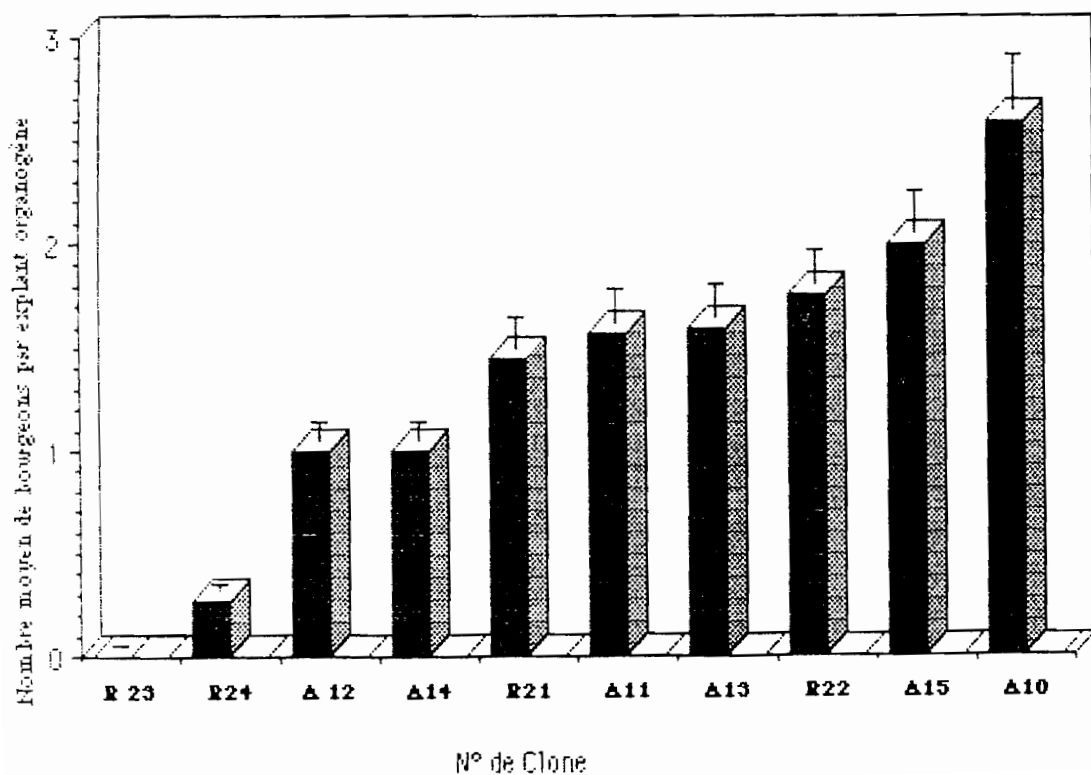


Fig N°23 : Variabilité de l'aptitude de différents clones d'*A. albidus* à produire des bourgeons adventifs à partir de racines excisées, cultivées sur milieu M-S/2 pendant 45 jours



27 jours : " " 17 et 25 cm

Lorsque la racicule mesure entre 5 et 9,5 cm, le taux de régénération est faible (15%) avec un nombre moyen de bourgeons par explant initial de 1,7. Avec l'augmentation de la durée de pré-culture (19 à 27 jours), le taux d'organogénèse s'accroît de manière significative (54,5 %) avec un nombre optimal moyen de 3,3 bourgeons par explant et certains explants présentent 8 à 10 bourgeons néoformés (tabl. N° 44). Il apparaît ainsi que l'augmentation de l'âge des explants primaires a un effet positif favorable sur l'expression des potentialités organogènes chez *A. albida*.

3-4) Influence du diamètre de l'explant

Les racines à diamètre élevé supérieur à 2 mm sont légèrement plus sensibles à l'induction caulogène que les racines à faible diamètre qui sont en majorité faiblement organogènes. Il nous est apparu que c'est à partir d'une certaine taille (1,5 mm) de la racine que l'explant racinaire répond à la stimulation caulogène (tab.45).

3-5) Influence du génotype de l'explant

Différents génotypes issus de graines d'*A. albida* et dont les racines ont été mises en culture, ont montré une grande variabilité dans l'aptitude à produire des bourgeons adventifs (fig N° 23). Le nombre moyen de bourgeons par explant de fragments de racines cultivés dans des conditions identiques, varie de 0,2 bourgeons par explant pour les génotypes peu réactifs à 2,7 pour les génotypes les plus caulogènes.

3-6) Influence de la composition des milieux de culture

Quatre milieux de culture ont été testés en association avec plusieurs combinaisons hormonales (tabl. N° 46,47 et 48 et fig N°24).

Les milieux M-S/2 favorisent un taux de caulogénèse élevé variant entre 57 et 90,5%. Quelle que soit la concentration en kinétine, le nombre moyen de bourgeons par explant demeure pratiquement constant.

Les milieux WPM ne favorisent pas l'expression morphogénétique de la totalité des explants mis en culture. En effet, 21 à 45 % seulement des explants racinaires produisent des bourgeons adventifs avec une intensité variant entre 1,2 et 1,8 bourgeon par explant. Les milieux B5 ne favorisent une expression morphogénétique optimale en présence d'une teneur en kinétine faible (0,5 mg/l) ; en effet on constate que 72,7 % des explants produisent en moyenne 2,57 bourgeons par explant racinaire lorsque les explants sont cultivés en présence de 0,05 mg/l de kinétine. Par contre, en présence de fortes concentrations, le taux de régénération est plus faible (33% et 36%).

Tabl N°46 : Influence de quatre milieux de culture associés à la kinétine 0,1/ANA 0.01 mg/L sur l'aptitude à produire des bourgeons adventifs à partir d'explants racinaires d'*A. albida* après 45 jours de culture

Milieux de base	Nbre total expl	expl organogenes		nbre moy bgeons par explant	Intensité caulogène
		Nbre	%		
MS/2	21	19	90,5	1,84 a	1,66
WPM	20	9	45	1,66 a	0,747
B5	25	9	36	1,44 a	0,518
BDA	26	19	73	1,15 a	0,839

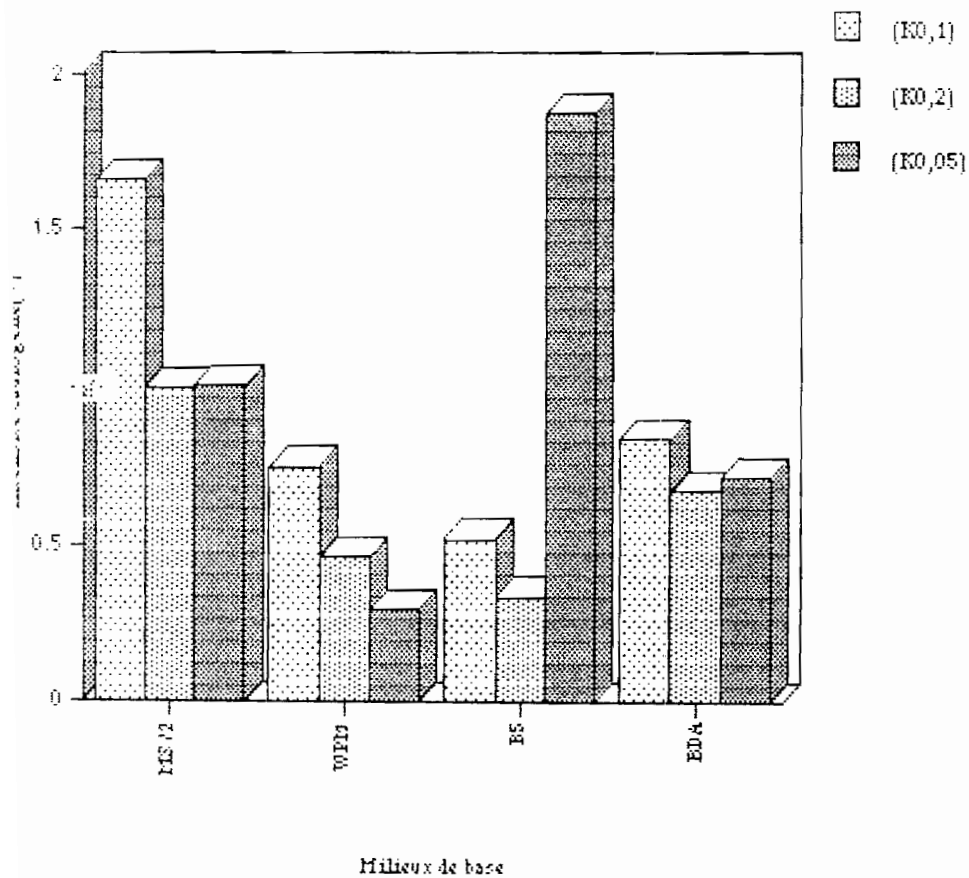
Tabl N°47 : Influence de quatre milieux de culture associés à la kinétine 0,2/ANA 0.01 mg/L sur l'aptitude à produire des bourgeons adventifs à partir d'explants racinaires d'*A. albida* après 45 jours de culture

MILIEUX de base	Nbre total expl	expl organogenes		nbre moy bgeons par explant	Intensité caulogène
		Nbre	%		
MS/2	16	9	57	1,75 a	0,997
WPM	13	5	38,5	1,2 a	0,462
B5	18	6	33,3	1a	0,333
BDA	18	11	61,1	1,1 a	0,672

Tabl N°48 : Influence de quatre milieux de culture associés à la kinétine 0,05/ANA 0.01 mg/L sur l'aptitude à produire des bourgeons adventifs à partir d'explants d'*A. albida* après 45 jours de culture

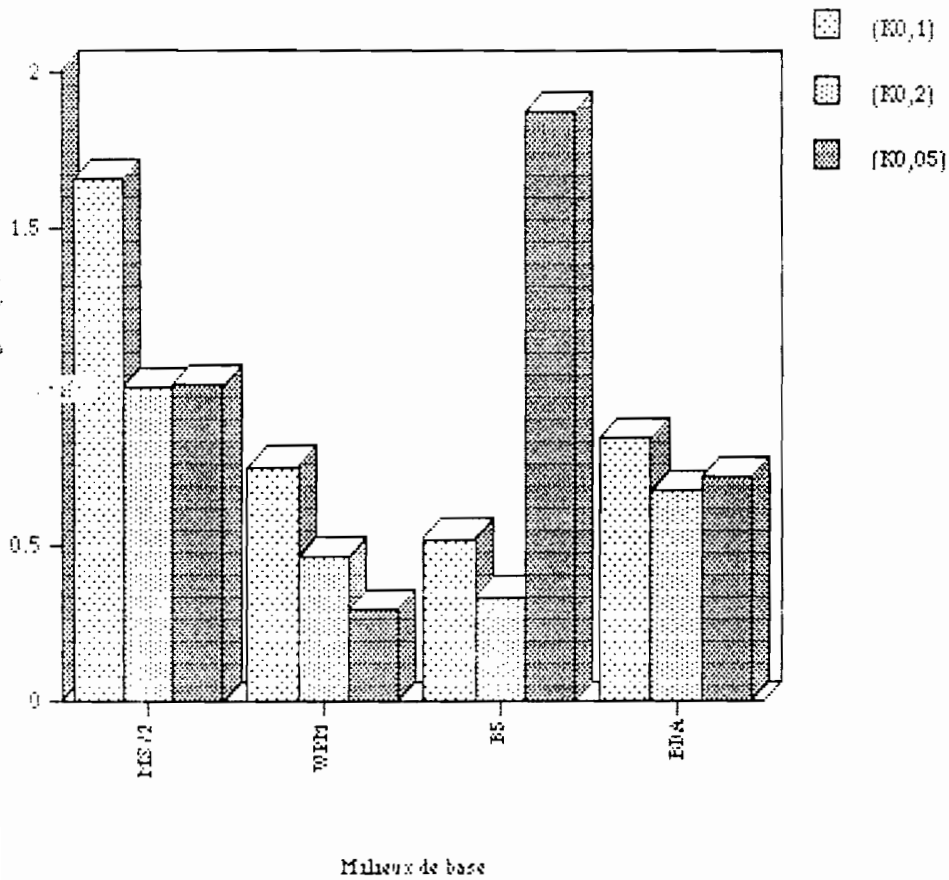
Milieux de base	Nbre total expl	expl organogenes		nbre moy bgeons par explant	Intensité caulogène
		Nbre	%		
MS/2	21	13	62	1,63 b	1,01
WPM	19	4	21	1,4 b	0,294
B5	11	8	72,7	2,57 a	1,868
BDA	21	12	57	1,26 b	0,718

g N°24: Influence de quatre milieux de culture associés à la kinétine (0,05 mg/l; 0,1 mg/l; 0,2 mg/l) et à l'ANA (0,01 %), sur l'intensité de la caulogénèse "in vitro" à partir de fragments de racines d'*A. zizanioides* après 45 jours de culture



Intensité de la caulogénèse = % explants ayant réagi à la stimulation x Nombre moyen de bourgeons formés par explant

N°24: Influence de quatre milieux de culture associés à la kinétine (0,05 mg/l; 0,1 mg/l; 0,2 mg/l) et à l'ANA (0,01 mg/l) sur l'intensité de la caulogénèse "in vitro" à partir de fragments de racines d'*A. alba* après 45 jours de culture



Intensité de la caulogénèse = % explants ayant réagi à la stimulation x Nombre moyen de bourgeons formés par explant

Tabl. N° 49 : Influence de différentes concentrations en auxine en l'absence de cytokinine sur la stimulation de la réponse organogène à partir de tissus racinaires chez *A. albida* après 30 jours de culture

concentrat (mg/l)	Nbre total explants	explants organogenes		nbre moy bourgeons par explant
		Nbre	%	
BAP 0 /ANA 0	19	7	36,8	1,28
BAP 0 /ANA 0,05	25	7	28	1,14
BAP 0 /ANA 0,1	24	5	20,5	1,00
BAP 0 /ANA 0,2	29	11	52	1,12

Tabl N°50 : Influence de la Zéatine (combinée avec l'ANA 0.01 mg/L) sur l'organogénèse "in vitro" à partir de racines excisées d'*A. albida* ; les résultats ont été obtenus après 35 jours de culture

concentrat (mg/l)	Nbre total explants	explants organogenes		nbre moy bourgeons par explant
		Nbre	%	
Zeal 0,1 mg/l	14	7	50,0	1 a
Zeal 1 mg/l	14	8	57,1	1,25 a
Zeal 5 mg/l	14	8	57,1	1,37 a

Tabl N°51 : Influence de la kinétine (combinée avec l'ANA 0.01 mg/L) sur l'organogénèse "in vitro" à partir de racines excisées d'*A. albida* ; les résultats ont été obtenus après 35 jours de culture

concentrat (mg/l)	Nbre total explants	explants organogenes		nbre moy bourgeons par explant
		Nbre	%	
Kinet 0,05	21	13	62	1,63 a
Kinet 0,1	21	19	90,5	1,84 a
Kinet 0,2	16	9	57	1,75 a
Kinet 5	16	11	68,7	1,45 a
kinet 10	14	5	35,7	1,2 a

Les milieux BDA sont favorables à la caulogénèse mais le nombre de bourgeons formés est en général faible.

En associant ces quatre milieux minéraux à 3 combinaisons hormonales, (Kin 0,05; Kin 0,1 g/l; Kin 0,2 mg/l) et en présence d'ANA 0,01 mg/l) on constate que (Fig 24):

- l'optimum de l'intensité caulogène sur milieu B5 n'est obtenue qu'en présence de la Kinétine 0,05 mg/l, ANA 0,01 mg/l. En effet, lorsque les concentrations hormonales augmentent, l'intensité caulogène diminue.
- Sur milieu M-S/2 quelles que soient les concentrations hormonales utilisées, l'intensité caulogène obtenue est supérieure à celle de la plupart des traitements.
- En présence des milieux WPM et BDA, l'intensité caulogène est souvent faible.

3 -7) Influence des substances hormonales

3-7-1) les Cytokinines et la caulogénèse

- Milieu témoin dépourvu de cytokinine

Nous avons constaté (Tabl 49) qu'en l'absence de toute stimulation hormonale de nature cytokininique exogène, les explants racinaires réagissent naturellement à l'excision de l'apex racinaire en produisant des bourgeons. Le pourcentage d'organogénèse est cependant faible, il varie entre 20 et 52% avec un nombre moyen de bourgeons qui dépasse rarement (1,2).

- Zéatine

Lorsque la concentration en zéatine (Tabl N° 50) varie entre 0,1 et 5 mg/l, le taux de caulogénèse ne varie pas alors que le nombre moyen de bourgeons augmente légèrement.

- Kinétine

La concentration optimale de kinétine (Tabl N° 51) permettant une meilleure expression de l'organogénèse "in vitro" chez *A. albida* est une concentration équivalente à 0,1mg/l où 90% des explants forment en moyenne 1,84 bourgeons par explant ; lorsque la concentration en kinétine augmente, l'intensité de la réponse diminue.

- BAP

Trois concentrations en BAP (5,10 et 15 mg/l) (Tabl N° 52) ont été testées sur l'organogénèse "in vitro" chez *A. albida*. L'optimum de réponse est obtenu en présence de 10mg/l où 100% des explants produisent une moyenne de 1,7 bourgeons par explant. Une forte teneur en BAP du milieu (15 mg/l) est inhibitrice de l'expression caulogène des racines d'*A. albida*.

Tabl N°52 : Influence de la BAP (combinée avec l'ANA 0.01 mg/L) sur l'organogénèse "in vitro" à partir de racines excisées d'*A. albida* ; les résultats ont été obtenus après 35 jours de culture

concentrat (mg/l)	Nbre total expl	expl organogenes		nbre moy bgeons par explant
		Nbre	%	
BAP 5	12	6	50	1 a
BAP 10	12	12	100	1,7 a
BAP 15	14	11	78,5	1,5 a

Tabl N°53 : Influence de ZiP (combinée avec l'ANA 0.01 mg/L) sur l'organogénèse "in vitro" à partir de racines excisées d'*A. albida* ; les résultats ont été obtenus après 35 jours de culture

concentrat (mg/l)	Nbre total expl	expl organogenes		nbre moy bgeons par explant
		Nbre	%	
ZiP 5	11	10	90,9	2,11 a
ZiP 10	13	4	30,7	2 a

Tabl N°54 Influence antagoniste des cytokinines sur la formation des racines latérales et sur la caulogénèse au moment de mise en culture des explants racinaires sur les différents milieux hormonaux

cytokinine	concentration	% caulogénèse	% racines latérales	nbre de racines par explant
Kinetine	5 mg/l	68,7	45	1,5 c
	10 mg/l	35,7	53,8	1,23 c
BAP	15 mg/l	78,5	7	0,07
	10 mg/l	100	36	0,63 c
	5 mg/l	50	0	0
2 iP	5 mg/l	90,9	60	2,1 b
	10 mg/l	30,7	92,30	2,3 b
zeatine	0,1 mg/l	50	69,20	3,84 a
	1 mg/l	57,10	75	4,33 a
	5 mg/l	57,14	30	0,7 c

- 2 iP

Nous avons testé deux combinaisons hormonales 5 et 10 mg/l de 2 iP (Tabl N° 53).

A 5 mg/l, 90% des explants produisent 2,11 bourgeons par explant ; lorsque la teneur en 2iP est élevée à 10 mg/l, le nombre d'explants qui forment des bourgeons diminue mais sur les explants réactifs, le nombre moyen de bourgeons formés est optimal (2,5).

La figure N° 25 résume l'influence de la concentration des diverses substances hormonales utilisées sur l'intensité de la caulogénèse exprimant le produit du nombre moyen de bourgeons formés par explants par le pourcentage de caulogénèse. On se rend compte que l'intensité caulogène maximale est obtenue en présence de 2iP 5mg/l.

D'une manière générale, la comparaison de ces diverses combinaisons hormonales à différentes concentrationsmontent (fig 25) que l'addition de 2iP à 5 mg/l favorise une intensité caulogène optimale.

3-7-2) Cytokinines et formation de racines latérales

Les cytokinines sont des hormones connues pour être des antagonistes de la rhizogénèse. Chez *A. albida*, l'action inhibitrice des cytokinines sur la formation de racines latérales après l'excision de l'apex, se manifeste de manière nette (tabl. N° 54) en présence de fortes concentrations de BAP où seul 0 à 0,63 racines en moyenne sont formées.

La kinétine présente elle-aussi un effet inhibiteur sur la formation de racines latérales bien que l'effet soit moindre par rapport à celui de la BAP.

L'action antagoniste de l'hormone 2iP sur la formation de nouvelle racines latérales est beaucoup moins importante que les deux précédentes substances hormonales (pl N°18 fig N°B). En effet, une moyenne de 2,1 à 2,3 racines par explant est formé au cours de la culture et les bourgeons se forment à l'aisselle des racines latérales.

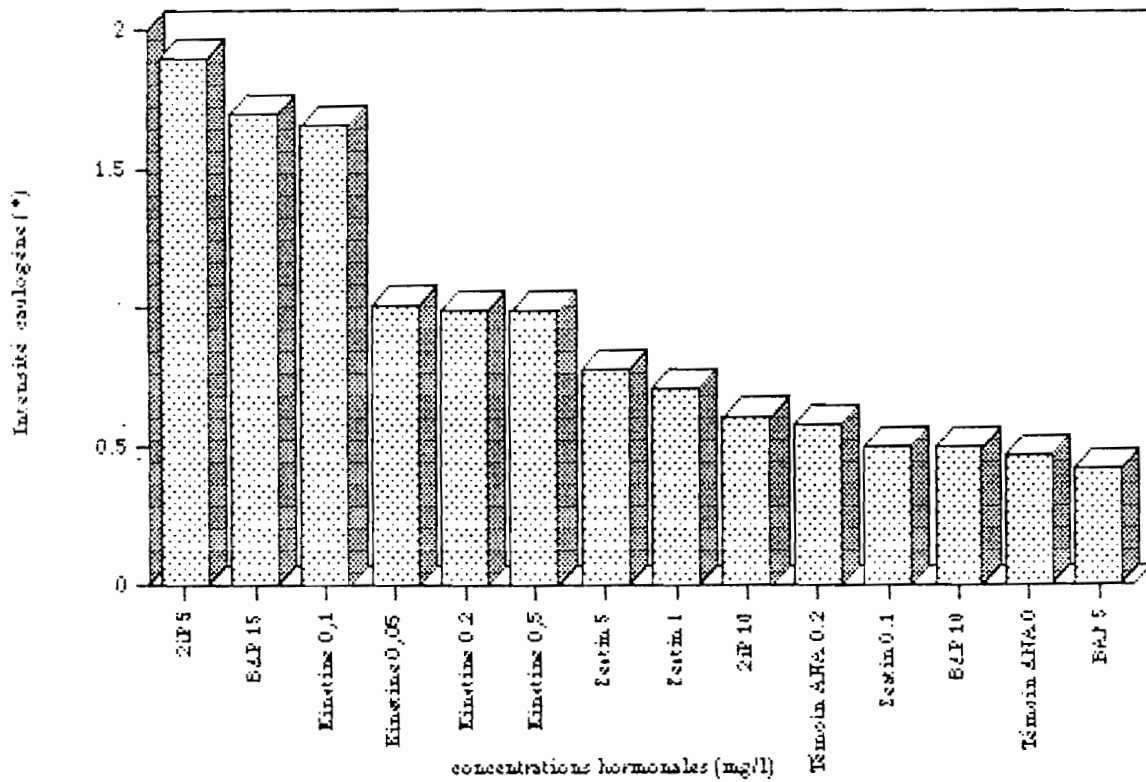
La zéatine à faible concentration (0,1 et 1mg/l) stimule la rhizogénèse adventive avec une moyenne de 3,8 à 4,3 racines par explant. Cependant lorsque la teneur en zéatine augmente (5 mg/l) on assiste à une inhibition du nombre d'explants développant des racines et du nombre moyen de racines formées.

3-8) Substances à action cytokinique

3-8-1) Phényl-urée

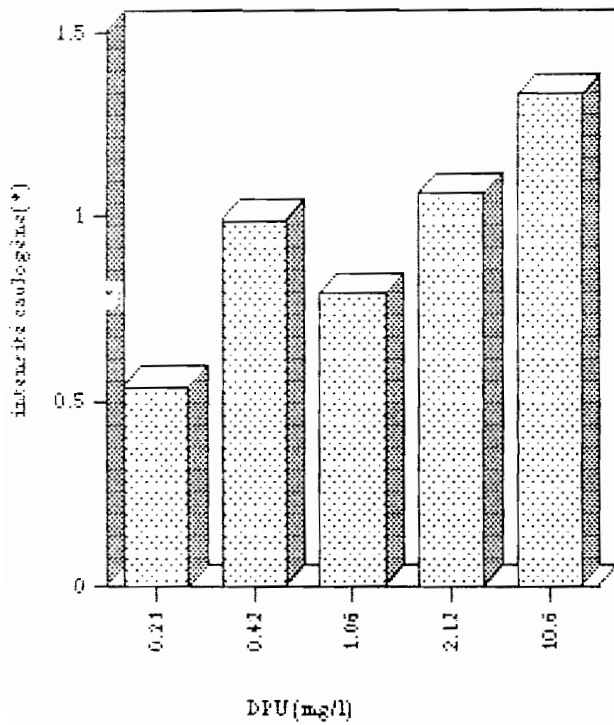
Des fragments de racines d'*A. albida* ont été mis en contact avec un milieu contenant de la 1-3 DPU à des concentrations variant de 1 à 50 μ M/L (Tabl. N° 55 ; Fig 26).

Fig. N°25: Influence de 4 cytokinines (zeatine, kinetine, Bap, 2iP) à diverses concentrations combinées à l'ANA (0,01 mg/l) sur l'intensité de la caulogénèse "in vitro" à partir de fragments de racines d'*A. alba* cultivés sur un milieu de base (MS/2) après 35 jours de culture. Le milieu témoin est dépourvu de cytokinine mais contient de l'ANA 0,2 mg/l



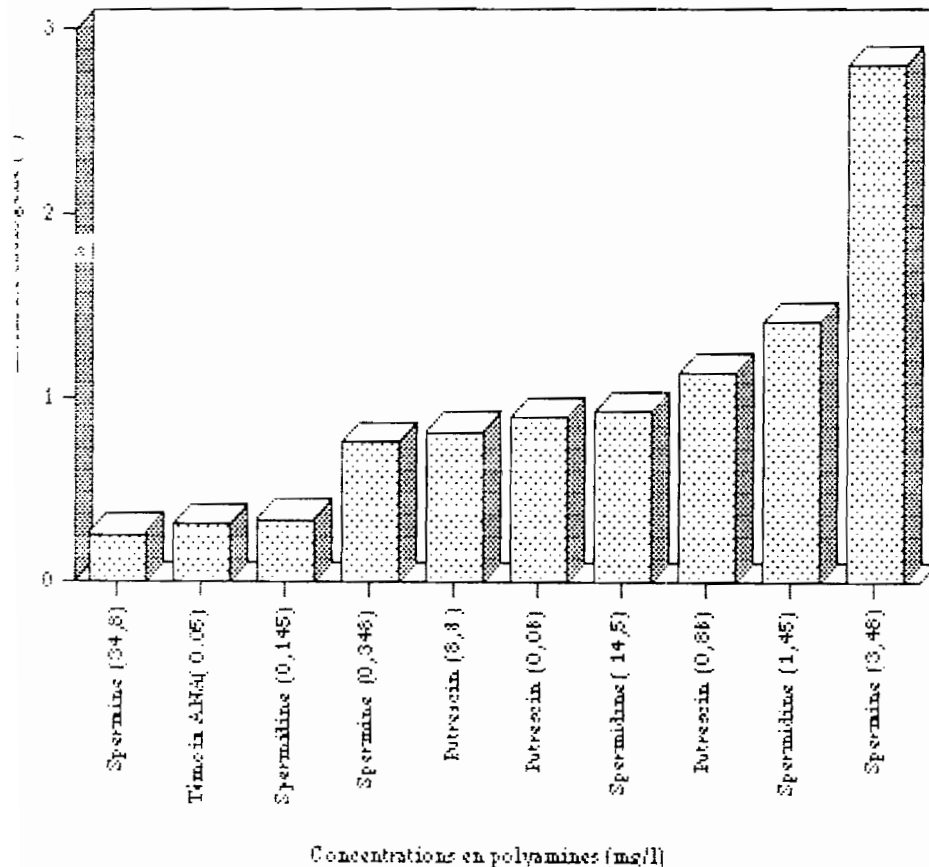
(*) Intensité de la caulogénèse = % d'explants ayant réagi à la stimulation x Nombre moyen de bourgeons formés par explant

Fig N°26 : Influence de la 1-3, Di-Phényl-Urée sur l'intensité de la caulogénèse "in vitro" à partir de fragments de racines excisées d'*A. Adansoni* cultivés sur milieu MS/2 pendant 25 jours.



Intensité de la caulogénèse = % d'explants ayant réagi à la stimulation x Nombre moyen de bourgeons formés par explant

Fig N°27: Influence de 3 polyamines (Putrescine Spermine et Spermidine) à diverses concentrations sur l'intensité de la caulogénèse à partir de fragments de racines excisées d'*A. Adansoni* cultivés pendant 45 jours



Intensité de la caulogénèse = % d'explants ayant réagi à la stimulation x Nombre moyen de bourgeons formés par explant

Fig N°28: Comparaison de l'efficacite relative des differentes substances de croissance utilisees (Cytokirines) sur l'aptitude caulogene des racines excisees d' *A. albida*

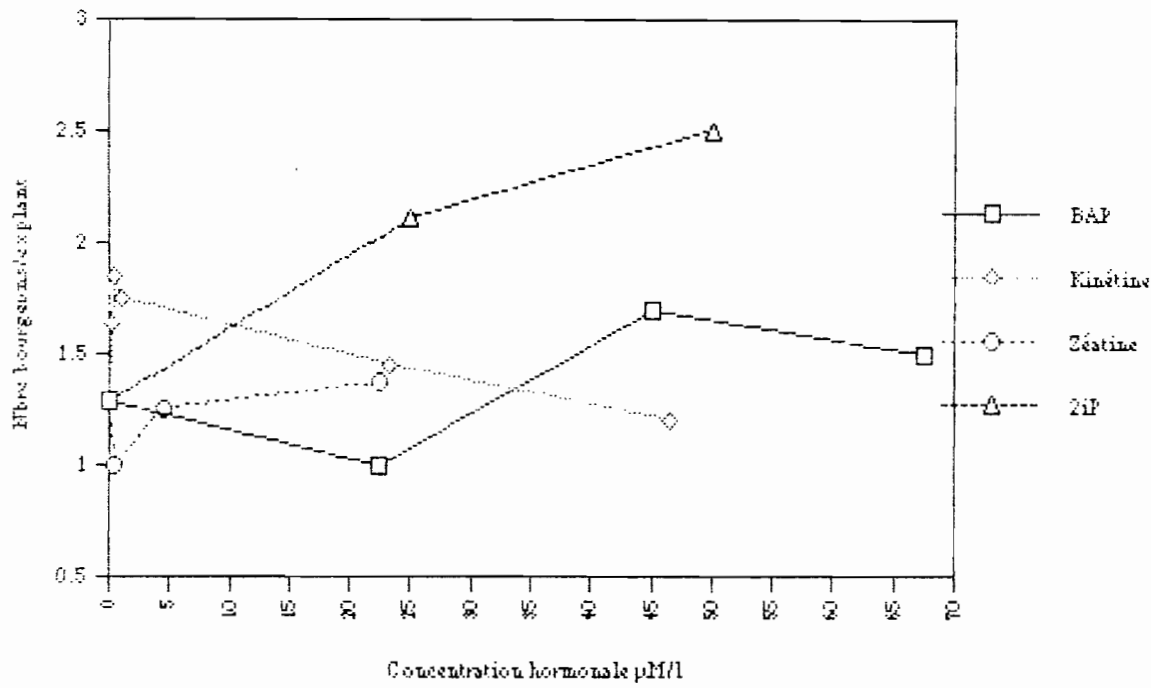
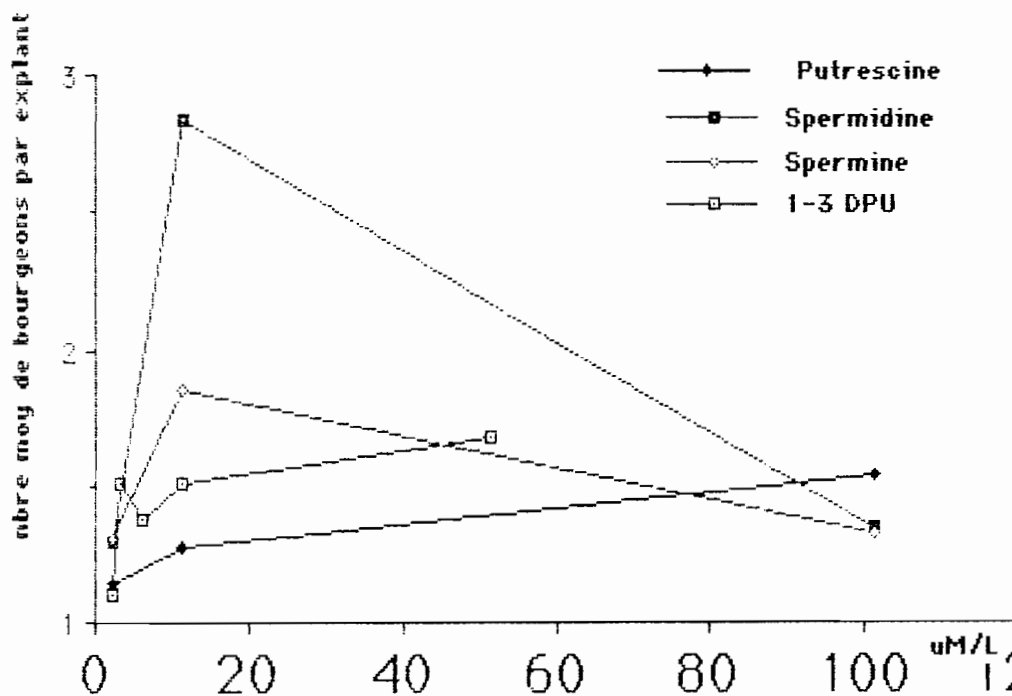


Fig N°29: Comparaison de l'efficacite relative des differentes substances de croissance utilisees (Polyamines, 1-3 DPU) sur l'aptitude caulogene des racines excisees d' *A. albida*



L'élévation de la teneur en 1-3DPU du milieu de culture favorise un accroissement du taux de caulogénèse. En effet, (fig N° 26) le pourcentage d'explants caulogènes passe de 50% en présence d' $1\mu\text{M}$ de DPU à 81,5% en présence de $50\mu\text{M}$. Le nombre moyen de bourgeons formés évolue dans le même sens avec une amplitude d'accroissement très faible.

3-8-2) Polyamines

Trois polyamines ont été testées (Tabl. N°56; fig 27) sur les capacités organogénétiques des racines d'*A. albida* "in vitro". Il est apparu que la culture en présence de spermidine et de putrescine à $10\mu\text{M}$ permet à la majorité des explants (100% et 93 % respectivement) (fig N° 27) de produire des bourgeons. Si on considère le nombre de bourgeons produits par explant racinaire, on constate qu'en présence de spermine $10\mu\text{M}$, un nombre optimal de 2,8 bourgeons est formé ; sur ce milieu il n'est pas rare de compter 8 à 10 néoformés par explant. Cependant certains bourgeons émergent à partir d'un cal abondant (pl N°18 fig C). La particularité intéressante notée sur ces bourgeons obtenus en présence de polyamines, demeure leur vigueur et leur croissance très rapide.

3-9) Efficiences des diverses substances à action cytokinique

L'efficacité relative des différentes substances utilisées sur les racines excisées d'*A. albida* est déterminée par l'intensité de l'expression morphogénétique (nombre de bourgeons formés par segment de racine).

Si on compare les cytokinines (fig N° 28) (BAP, kinétine, zéatine, 2iP), on constate que parmi toutes ces cytokinines utilisées le 2iP est la plus efficace sur la caulogénèse chez *A. albida* ; cette hormone agit à des doses variant entre 20 et $50\mu\text{M}$. Pour une efficacité similaire, la kinétine agit à de très faibles concentrations de l'ordre de 100 fois moindre que celle du 2iP ; l'augmentation de sa teneur réduit l'intensité de la réponse caulogène.

La BAP n'agit efficacement sur l'organogénèse chez *A. albida* que lorsqu'il est présent en forte concentration ($45\mu\text{M}$) ; la zéatine hormone naturelle est peu active sur la caulogénèse chez *A. albida*.

En comparant les polyamines et phényl-urées (fig N° 29) avec les cytokinines utilisées, on se rend compte que la DPU et la BAP ont des spectres d'action voisins (entre 50 et $100\mu\text{M/L}$) car la DPU agit à des doses proches de celles de la BAP. La kinétine par contre agit à des doses beaucoup plus faibles de l'ordre de $2\mu\text{M/L}$ pour une plus grande efficacité ; les polyamines spermine et spermidine sont très efficaces à $10\mu\text{M}$; à $100\mu\text{M}$ leur action devient inhibitrice de la caulogénèse puisque le nombre de bourgeons formés est réduit considérablement.

Tabl.N°55: Influence d'une phenyl-urée (1-3 DPU) associée à l'ANA 0.01mg/l sur l'intensité de l'organogénèse "in vitro" à partir de fragments de racines d'*A. albida*

	Nbre total explants	explants organogenes		nbre moy bourgeons par explant
		Nbre	%	
DPU 1µM/l	31	16	51,6	1,06 a
DPU 2µM/l	31	21	67,6	1,47 a
DPU 5µM/l	39	23	59	1,34 a
DPU 10µM/l	29	21	72,4	1,47 a
DPU 50µM/l	28	22	81,5	1,64 a

Tabl.N°56: Influence de 3 Polyamines associées à l'ANA 0.01mg/l sur l'intensité de l'organogénèse et le nombre de bourgeons adventifs formés "in vitro" à partir de fragments de racines excisées d'*A. albida* après 45 jours de culture

	Nbre total explants	explants organogenes		nbre moy bourgeons par explant
		Nbre	%	
Putrescin 10-4 M	11	6	54,5	1,5 b
Putrescin 10-5 M	14	13	93	1,23 b
Putrescin 10-6 M	11	9	82	1,1 b
Spermine 10-4	20	4	20	1,3 b
Spermine 10-5	19	19	100	2,8 a
Spermine 10-6	13	8	61,5	1,25 b
Spermidine 10-4	22	16	72,7	1,28 b
Spermidine 10-5	18	14	78	1,81 b
Spermidine 10-6	15	4	26,6	1,26 b

3-10) Maintien du pouvoir caulogène

A partir d'une racine, il est possible dans les conditions optimales de régénérer en moyenne 32 pousses enracinées au bout de 2 mois de culture. Après une induction de 7 jours sur un milieu riche en cytokinine, nous avons procédé à un transfert des segments de racines sur un milieu faiblement concentré en cytokinine pour éviter une éventuelle accumulation de cytokinine dans les tissus, qui inhiberait l'expression de la caulogénèse.

Par la suite de nos expériences, après avoir déterminé les conditions optimales de la caulogénèse, nous avons utilisé des milieux additionnés de BAP (5 mg/l) et de Spermidine $10\mu\text{M}$; les explants y sont placés en permanence durant toute la culture; nous n'avons jamais observé une inhibition de la caulogénèse sur ces explants. En effet, 90 jours après la mise en culture, après que les pousses allongées soient mises à enraciner, nous avons encore trouvé de nouveaux bourgeons qui se formaient au sein des tissus racinaires.

La mise en place permanente des explants sur un milieu inducteur, favorise une organogénèse continue ; à la suite de l'excision des premiers bourgeons formés qui ont évolué en pousses feuillées, d'autres bourgeons se forment à leur tour.

3-11) Enracinement

Les pousses développées sur les différents milieux de culture sont très vigoureuses (pl N°20 fig N°A) et leur croissance est rapide. Après excision et culture des pousses sur des milieux contenant des auxines à différentes concentrations (AIA 0,1 mg/L, AIB 0,1 mg/l et un mélange de AIA 0,05 mg/l et AIB 0,05 mg /l) (Tabl. N° 57). Le taux d'enracinement obtenu (87%) est identique sur les trois milieux utilisés ; le nombre moyen de racines formées est cependant variable puisque c'est le milieu contenant de l'AIB à 0,1 mg /l qui favorise la formation du nombre le plus élevé de racines adventives (pl N°20 fig N°B); les tiges produisent au bout de 14 jours des racines sans une formation de cal basal.

3-12) Histologie des bourgeons adventifs

Le fragment de racine mis en culture, dès la première semaine se fissure et se charge de chlorophylle ; l'émergence du bourgeon se fait à la suite de l'éclatement des tissus superficiels constitués par le rhizoderme ; le tissu cortical adjacent au rhizoderme, devient visible ; il est constitué de plusieurs assises de cellules parenchymateuses de grande taille. On distingue deux voies morphogénétiques de formation de bourgeons adventifs :

- Au sein du cortex interne, constituée de parenchyme fondamental, se différencient quelques cellules au contour arrondi, de petite taille et au contenu cytoplasmique dense.

Les tissus racinaires évoluent progressivement vers une structure de tige. En effet, le premier signe d'une évolution vers une structure caulinaire est le fait que la zone corticale interne, réduite aux cours des premiers jours, prend de plus en plus de l'importance, et se

Tabl. N° 57 : Influence des auxines (AIA et AIB) sur la rhizogénèse "in vitro" à partir de tigelles issues de bourgeons adventifs des racines excisées d'*A. albida* et cultivées pendant 30 jours sur milieu M-S/2 .

concentrat (mg/l)	Nbre total explants	explants organogenes		nbre moyen racines par explant
		Nbre	%	
AIA 0,1 mg/l	14	12	85,7	1,91 b
AIB 0.1 mg/l	14	12	85,7	4,6 a
AIA(0.5)+AIB (0,5)	16	14	87	3,4 a

développe considérablement au dépens de la zone corticale externe qui à son tour devient très réduite ; cette région est constituée de cellules parenchymateuses abondamment remplies de substances de réserves.

C'est au sein de ce parenchyme cortical qu'on distingue des amas de cellules de petite taille au contenu densément coloré qui se développent au dépens des tissus parenchymateux corticaux assimilateurs. Ce sont ces cellules méristématiques qui sont à l'origine du bourgeon adventif (Pl N° 21 Fig A et B). Leur agencement et le sens des divisions de ces cellules aboutissent à la formation d'une structure en forme de dôme bordé latéralement par deux masses méristématiques futurs primordia foliaires. Au dessus de ces cellules on peut observer de cellules de grande taille qui s'orientent tangentiellement pour former les bords d'un méristème en émergence.

- Sur certaines coupes, à la suite de la prolifération de quelques cellules du parenchyme fondamental, on distingue des nodules formés directement au sein des tissus du cortex sans connection vasculaire avec les tissus conducteurs de la racine (pl. N°22 fig A et A'); ces structures sont de type méristématique avec des cellules denses de petite taille au rapport nucléoplasmique élevé. Ces structures s'organisent en méristème végétatif avec le dôme central et les primordia foliaires latéraux (pl. N°22 fig B et B'). Le bourgeon végétatif se forme en développant un axe de tige et des ébauches de feuilles ; on note une parfaite continuité entre le parenchyme cortical de la racine et celui du bourgeon néoformé.

Cependant, il est intéressant de noter l'absence de connections vasculaires entre le bourgeon néoformé et le système vasculaire de la racine qui lui a donné naissance. C'est lorsque le bourgeon est bien développé qu'il met en place son propre système vasculaire.

3-13) Acclimatation

Les vitroplants issus de culture de racines excisées ont été acclimatés sur un support fait d'un mélange de perlite et de vermiculite; les explants recouverts d'un film en polyéthylène se trouvent dans une ambiance saturée en humidité; ils sont régulièrement arrosés à l'aide d'une solution nutritive de Hoagland et Arnon (1938).

Après une phase stationnaire qui dure environ 3 semaines où le vitroplant ne montre aucun signe de croissance, on observe un ou deux bourgeons situés à la partie terminale de la tige qui débourent ; la croissance est assez lente mais les explants survivent à la sortie du tube.

Il est apparu que chez *A. albida* le système racinaire mis en place au cours de la rhizogénèse "in vitro" n'est pas adéquat ; en effet un autre système racinaire s'installe "in vivo" à la suite de la nécrose des premières racines. Dès que le système racinaire fonctionnel est bien installé, les vitroplants se développent normalement.

3-14) Discussions

A- Age et origine des tissus racinaires

Chez *A. albida*, l'âge de la racine et l'origine du segment racinaire, se sont révélés influencer sur la fréquence et l'intensité organogénétiques.

En effet, on a constaté un gradient décroissant des potentialités de régénération à partir de la zone proximale vers la zone distale de la racine. La partie proximale est plus différenciée et contient des tissus plus âgés que la partie distale qui est plus jeune et surtout moins différenciée.

En général les potentialités morphogénétiques décroissent avec l'âge des tissus ; ceci est fréquemment observé au niveau des parties aériennes où les tissus immatures sont les plus réactifs ; en effet, plus le tissu est différencié donc déterminé dans son pattern morphogénétique et plus la réversion de son programme morphogénétique est difficile.

Selon Lazzeri et Dunwell (1984), cette réactivité serait liée à l'activité du péricycle mieux développé dans les zones proximales de la racines et qui serait à l'origine de la formation des bourgeons adventifs et des racines adventives. Mais chez *A. albida* les bourgeons néoformés n'ont pas une origine péricyclique mais corticale.

D'autre part, les racines d'*A. albida* âgées de 4 semaines se sont révélées plus réactives que les racines d'une semaine d'âge. Chez *Brassica oleracea*, la production de racines et de pousses adventives augmente lorsque l'âge des semis croît de 6 à 16 jours (Lazzeri et Dunwell, 1984).

Chez *Chondrella juncea* (Kefford et Caso, 1972) le potentiel organogénétique de racines est croissant jusqu'à 90 jours de culture. Au delà, les racines perdent leurs potentialités organogènes.

Il apparaît ainsi qu'avec l'âge croissant des plantules, et par suite de l'élongation de la racine principale, on assiste à une augmentation du nombre de sites morphogénétiques capables d'induire une réponse à la stimulation caulogène.

Nous avons aussi noté une corrélation positive mais non significative entre le diamètre des explants racinaires et le taux de caulogénèse chez *A. albida* ; ce phénomène a été constaté chez le pommier (Robinson et Swabe, 1977) où l'initiation des bourgeons s'accroît avec le diamètre de la racine liée à l'activité cambiale ; ainsi de nombreux auteurs ont démontré la nécessité d'avoir une taille seuil qui favorise la régénération "in vitro" (North, 1953 ; Peterson, 1975) .

B- Milieux et conditions de culture

Au cours de nos expériences il a été montré que les milieux MS/2 et B5 sont les plus favorables à une expression optimale de l'organogénèse "in vitro" à partir de segments racinaires chez *A. albida*.

Ces milieux sont caractérisés par leur complexité et par leur plus grande richesse ionique par rapport aux deux autres milieux utilisés. Les milieux agissent plus sur le nombre de pousses formées que sur le taux de régénération ; la forte concentration en azote de ces deux milieux démontre encore une fois le rôle prépondérant de l'azote sur la faculté de régénération "in vitro" (Lazzeri et Dunwell, 1984).

Chez *Dalbergia sisso*, le milieu B5 s'est avéré être le meilleur milieu pour la caulogénèse à partir de segments racinaires. Chez *Allocasuarina verticillata* les exigences sont différentes car l'espèce réagit mieux à un milieu moins compliqué tel que le milieu BDA (Allioux, 1990).

Sur un milieu dépourvu de cytokinine, *A. albida* est capable de former des bourgeons adventifs lorsque la composition minérale du milieu de culture n'est pas limitante. Cette faculté naturelle de produire des pousses feuillées à partir des racines est certainement à relier à la faculté de l'espèce de drageonner ce qui constitue une des voies naturelles adoptées par l'espèce en vue de sa propagation dans son habitat.

Généralement les auxines sont considérées comme des hormones qui inhibent la formation de bourgeons adventifs (Peterson, 1975). Cependant il a été rapporté (Bonnet et Torrey, 1965 ; Kefford et Caso, 1972) que de faibles concentrations en auxine peuvent stimuler la caulogénèse "in vitro" alors que de fortes concentrations l'inhibent.

Concernant les cytokinines utilisées, le 2 iP a permis d'obtenir un nombre optimal de bourgeons adventifs. Comme pour la BAP, elle n'est active qu'à une concentration très élevée proche de 50 μM . La kinétine par contre agit à des concentrations 100 fois plus faibles.

Des 3 substances testées (putrescine (di-amine) ; spermidine (tri-amine) et spermine (tetra-amine)), il est apparu que les tri et tétra amines (respectivement spermidine et spermine) sont les plus efficaces pour stimuler la néoformation de bourgeons sur les explants racinaires d'*A. albida*.

Ces substances agissent à des doses variant de 10 à 100 μM /L au delà de cette concentration la réactivité est moindre. Ces polyamines sont des substances naturelles stimulant la biosynthèse de l'ARN et de l'ADN (Evans et Malmberg, 1989) et qui agissent en tant qu'inducteurs morphogénétiques pour orienter ou pour accélérer le processus morphogénétique vers une voie déterminée. Les polyamines sont des substances qu'on associe généralement à la division cellulaire (Keves et al., 1985), et à l'embryogénèse somatique (Montagüe et al., 1978; Mengoli et al., 1989 ; Hadrami et al., 1989) ; mais chez *Medicago*

sativa, et *Hevea brasiliensis*, les polyamines ne stimulent pas l'embryogénèse somatique mais on pense plutôt que les polyamines sont impliquées dans le processus de reprogrammation des cellules vers une nouvelle voie de morphogénèse "in vitro".

Chez *Phaseolus* et *Vigna* (Jarvis et al., 1983), le tabac (Torrighiani et al., 1989), les polyamines sont responsables de l'initiation et du développement de racines adventives. Les résultats obtenus chez *A. albida* confirment le rôle de régulateur de croissance d'un type nouveau dévolu à ces substances.

La 1-3DPU utilisée à des concentrations croissantes de 1 à 50 μ M ne favorise pas une expression optimale de l'organogénèse des racines d'*A. albida*. Cependant les composés phényl uréidiques sont considérés comme des substances ayant un effet cytokinique très important sur une large gamme d'espèces et en particulier aux espèces qui répondent favorablement aux cytokinines classiques. Le tidiazuron est une phényl-urée qui stimule la prolifération de pousses de nombreuses espèces de ligneux du genre *Acer* et *Malus* (Mok et al., 1987).

C- Plasticité et conformité morphogénétiques

La régénération de plantes entières à partir racines excisées, de drageons prélevés sur des arbres adultes et à partir de boutures "in vivo" de racines d'*A. albida* (Nikiema et Tolkamp, 1992; Danthu, 1992) démontre l'important potentiel de morphogénèse que possèdent les racines de cette espèce.

Les bourgeons émergent et se forment à partir des tissus corticaux chez *A. albida*. Ce sont ces cellules situées au niveau du cortex interne, qui, à la suite d'une déchirure des tissus épidermiques superficiels, laissent apparaître des dômes de cellules méristématiques qui évoluent plus tard en bourgeons puis en pousses feuillées. Comme chez de nombreuses espèces, les bourgeons adventifs ont souvent une origine superficielle épidermique ou sous-épidermique chez *Pinus sylvestris* (Jelaska, 1987) et *Picea abies* (Bornman, 1987) ou au niveau des assises superficielles du mésophylle chez *Pinus pinaster* (Jelaska, 1987)

Si on considère que chez *A. albida*, ce sont les mêmes groupes de cellules qui sont aussi bien capables de se dé-différencier pour former des structures de racines latérales, de pousses feuillées et de nodules fixateurs d'azote, on peut souligner l'importance de la plasticité morphogénétique que présente cette espèce.

Généralement les plants obtenus à partir d'apex ou directement régénérés à partir de feuilles (Kartha et al., 1977), ne présentent aucune variation; par contre de nombreux auteurs ont pu montrer qu'une grande variabilité est présente lorsque les plants sont régénérés à partir de cal (Sibi, 1979; Evans et Sharp, 1983; Sibi, 1982; Evans, 1986). Ces modifications se manifestent au niveau de l'aptitude à l'organogénèse et plus tard, au niveau des plants différenciés (taux de croissance, morphologie, production de métabolites, phyllotaxie, résistance partielle aux maladies etc...).

La durée de la culture "in vitro" et en particulier la longueur de la phase non morphogène est souvent apparue comme un facteur de variabilité (Demarly et Sibi, 1989). Le nombre de sub-cultures aussi s'est révélé être un des principaux facteurs induisant une variabilité somaclonale (Mc Coy et Philipps, 1982).

Chez *A. albida*, les bourgeons se forment directement sur les racines sans formation préalable de cal. Cette absence de cal présente un intérêt évident dans la mesure où les cellules qui sont à l'origine du bourgeon adventif ne subissent pas de remaniement chromosomique susceptible d'affecter l'expression du génotype ; ces cellules initiales corticales racinaires n'étant pas initialement destinées à produire des bourgeons, ont soit subi une dé-différenciation suivie d'une reprogrammation de leur pattern génétique, soit ce sont des cellules ayant gardé un certain degré de totipotence leur conférant une grande plasticité morphogénétique.

En l'absence des facteurs favorisant la variation somaclonale (organogénèse directe sans passage par un stade de cal, délai court d'organisation des cellules corticales en méristèmes caulinaires, absence de phases de sub-cultures), il est légitime de penser que les plants issus de racines excisées d'*A. albida* présentent un taux de conformité satisfaisant à une micropropagation clonale.

Le taux de multiplication obtenu par voie racinaire, est largement supérieur à celui obtenu par voie aérienne. Ceci confirme l'extrême réactivité des tissus racinaires (Chaturvedi et Sinha, 1979), la vigueur et la rapidité de croissance des pousses qui en sont issues. Il est dès lors permis d'envisager d'utiliser les tissus racinaires pour explorer les voies de régénération à partir du matériel végétal adulte qui demeure toujours très récalcitrant à de nombreuses méthodes de propagation.

De plus la culture de racines excisées nécessite très peu de matériel végétal, un fragment de 1,5 cm est capable de générer dans les conditions optimales 8 pousses feuillées ; cependant, comme cela a pu être démontré chez certaines espèces (Keyes et al., 1980), l'impact du génotype sur la réussite de la culture chez *A. albida* est un facteur fondamental dont il faut tenir compte. La possibilité de cultiver aseptiquement et de cloner "in vitro" les racines d'*A. albida* (Ahée et Duhoux, 1994), ouvre des perspectives prometteuses dans l'utilisation de racines excisées sélectionnées en vue de la régénération de plantes entières.

PLANCHE N°17

CULTURE DE RACINES EXCISÉES D'*A. albida*

Fig.A : Fissuration du rhizoderme dès le 5^{ème} jour de culture. (Gr x 20)

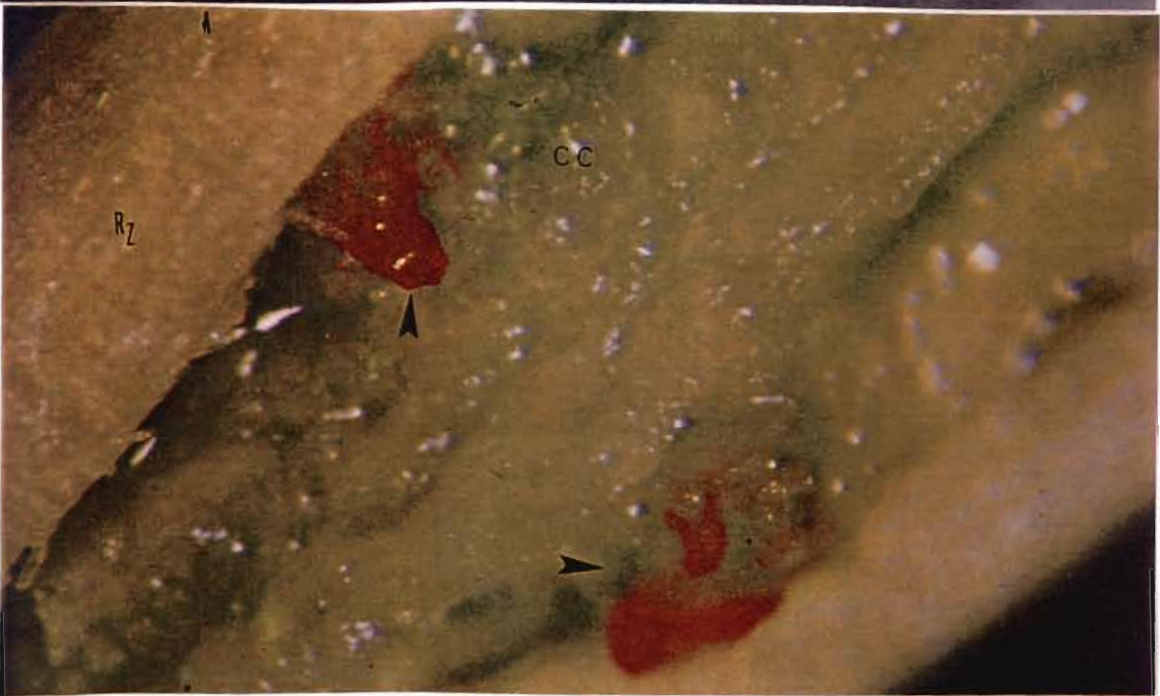
Fig.B : A la suite de la culture en présence de lumière, le tissu cortical sousjacent au rhizoderme est devenu chlorophyllien et développe des ébauches de bourgeons. Noter la pigmentation rouge des bourgeons révélatrice de la présence de pigments anthocyaniques. Au bout de 15 jours de culture, on peut noter l'apparition d'un tissu cortical chlorophyllien portant les ébauches de bourgeons adventifs () (CC Cellules corticales; Rz : Rhizoderme). (Gr. x 50)

Fig.C : Développement du bourgeon adventif et formation des ébauches foliaires (Gr. x 50)

A



B



C

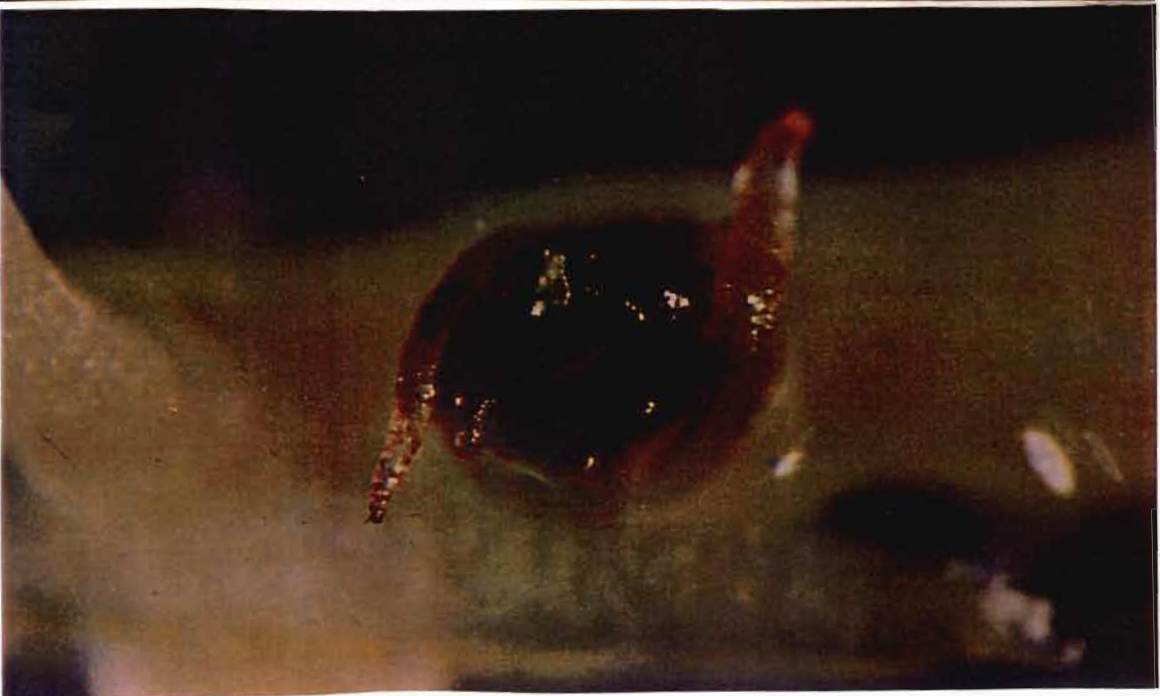


PLANCHE N° 18

Organisation de bourgeons adventifs sur les fragments de racines excisées

Les bourgeons se développent soit :

Fig.A : à une extrémité de la racine, généralement l'extrémité proximale sans callogénèse préalable.

(Gr. x 10)

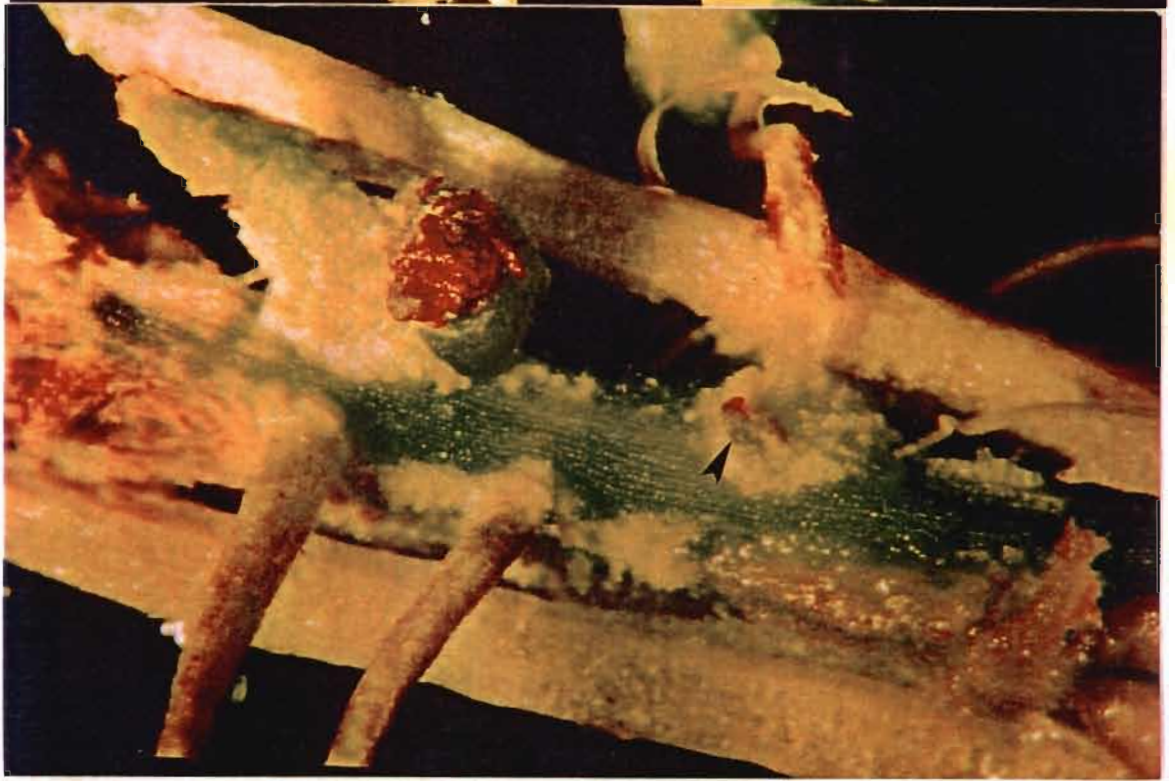
Fig.B : sur toute la longueur de la racine ; noter sur cette photo l'apparition d'un bourgeon adventif à l'aisselle d'une racine latérale (Gr. x 20)

Fig.C : Sur certains individus, en présence de Spermidine (10^{-6} M) la racine développe une masse de cal abondante à partir de laquelle émergent des bourgeons adventifs (Gr. x 25).

A



B



C

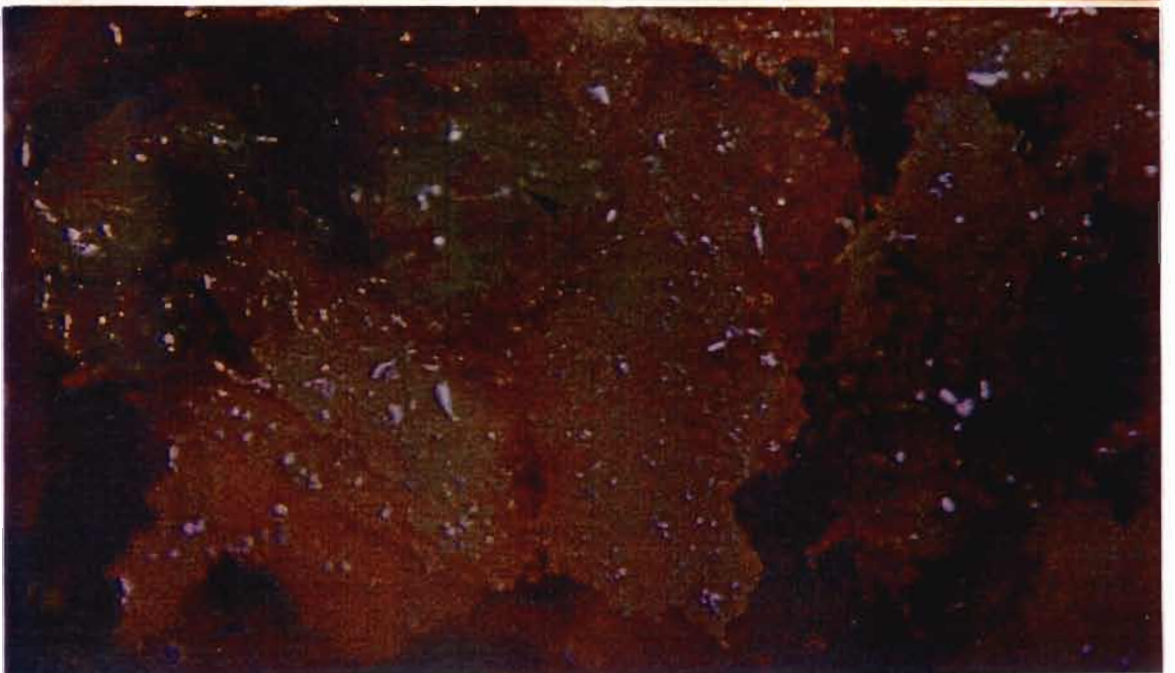


PLANCHE N° 19

Organogénèse des bourgeons à partir de tissus racinaires d'*A. albida*

Fig.A : La formation des bourgeons est un phénomène progressif qui s'effectue en 5 stades évolutifs :

- 1) protubérance non encore chlorophyllienne non encore organisée
- 2) protubérance dont quelques cellules centrales se chargent en chlorophylle
- 3) Protubérance entièrement constituée de tissus chlorophylliens
- 4) bourgeons adventifs
- 5) tigelle issue de l'élongation du bourgeon adventif

(Gr. x 20)

Fig.B : Elongation du bourgeon adventif qui se développe en s'accroissant et en formant de nouvelles ébauches foliaires(Gr. x 25)

Fig.C : Certains explants sont très caulogènes, il n'est pas rare d'observer des fragments de racines formant 8 à 10 bourgeons en une seule culture (Gr. x 20).

A



B



C

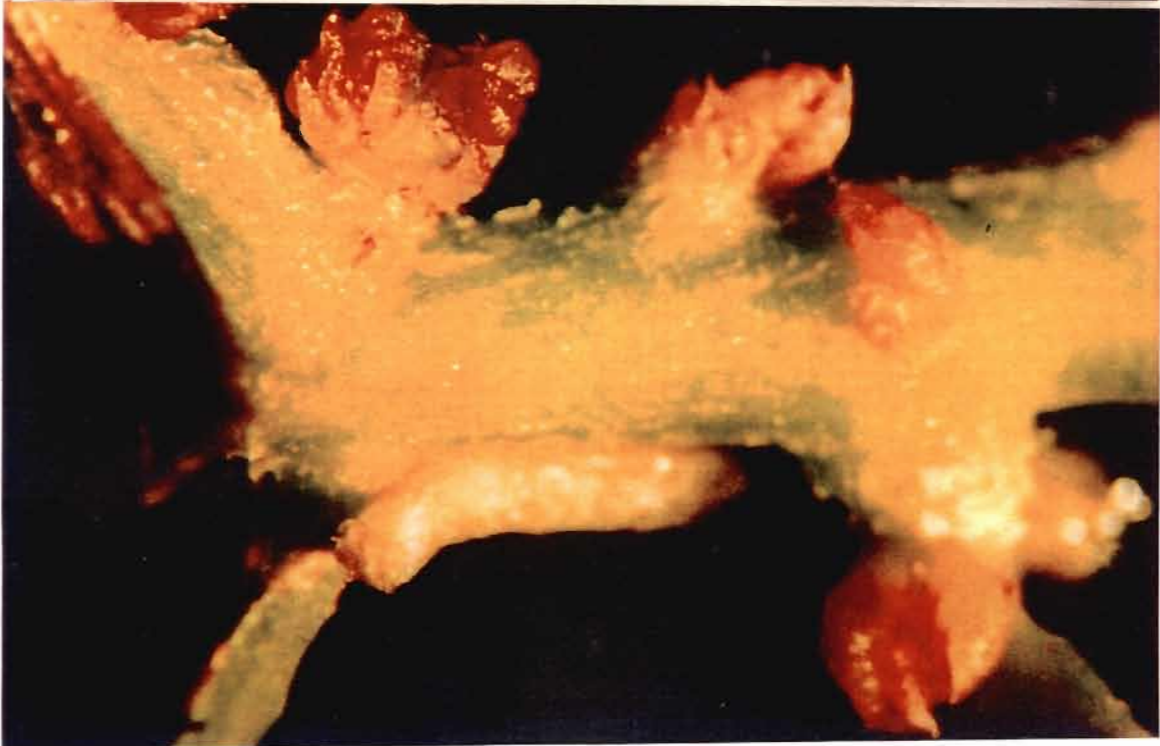


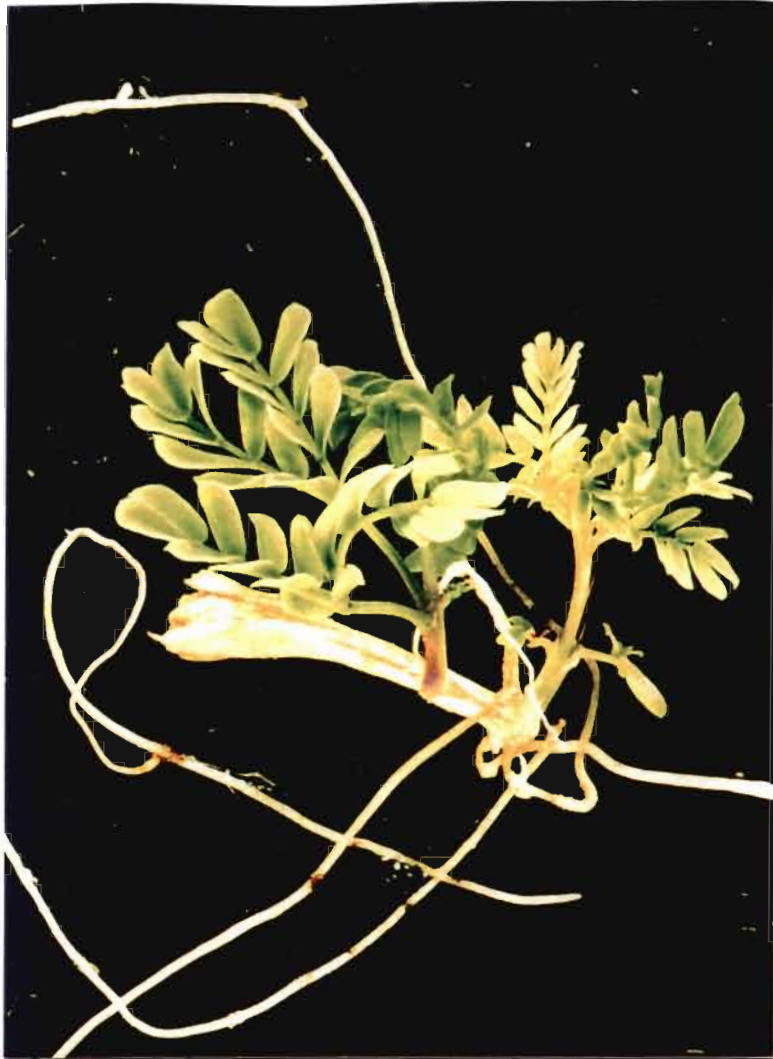
Planche N°20

Développement des bourgeons issus de culture de racines excisées

Fig.A: Bourgeon allongé en pousse feuillée très vigoureuse. Noter le développement concomitant des racines latérales qui s'allongent dans le milieu de culture (Gr. x 10)

Fig.B : Enracinement d'une pousse feuillée issue de bourgeon adventif sur un milieu contenant de l'AIB (0,1 mg/l) (Gr. x 10).

A



B



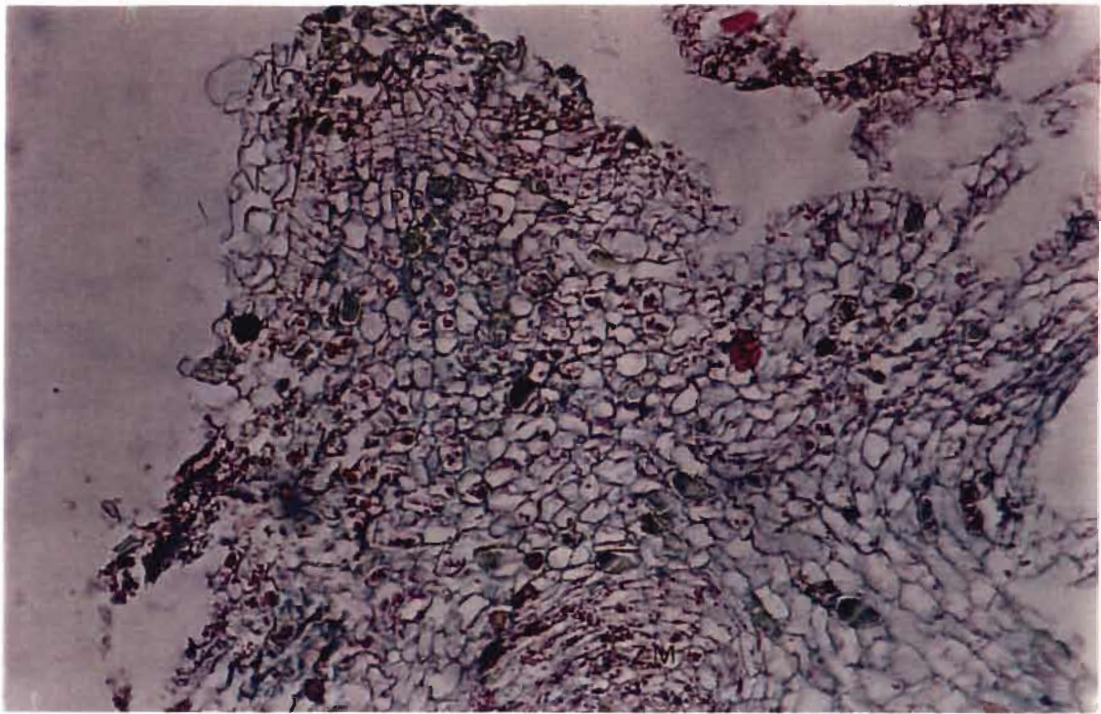
PLANCHE N°21

Histologie des bourgeons adventifs

Fig. A : Coupe transversale au niveau d'une protubérance chlorophyllienne; l'origine des bourgeons est corticale superficielle. (Pc : parenchyme cortical)
(Gr. x 250)

Fig.B : Vue détaillée de la protubérance ; noter la présence d'une assise procambiale() qui limite les cellules du parenchyme fondamental en division.
(Pc : parenchyme cortical)
(Gr. x 400).

A



B

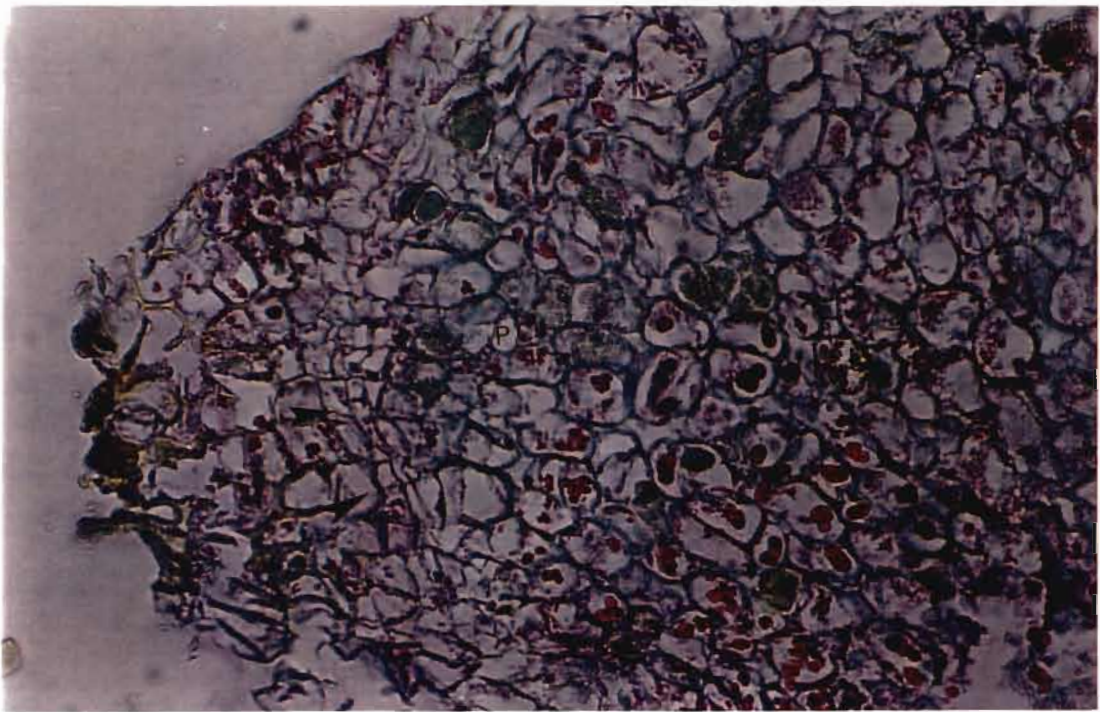


PLANCHE N° 22

Histologie des nodules méristématiques initiateurs des bourgeons adventifs à partir de tissus racinaires d'*A. albida*

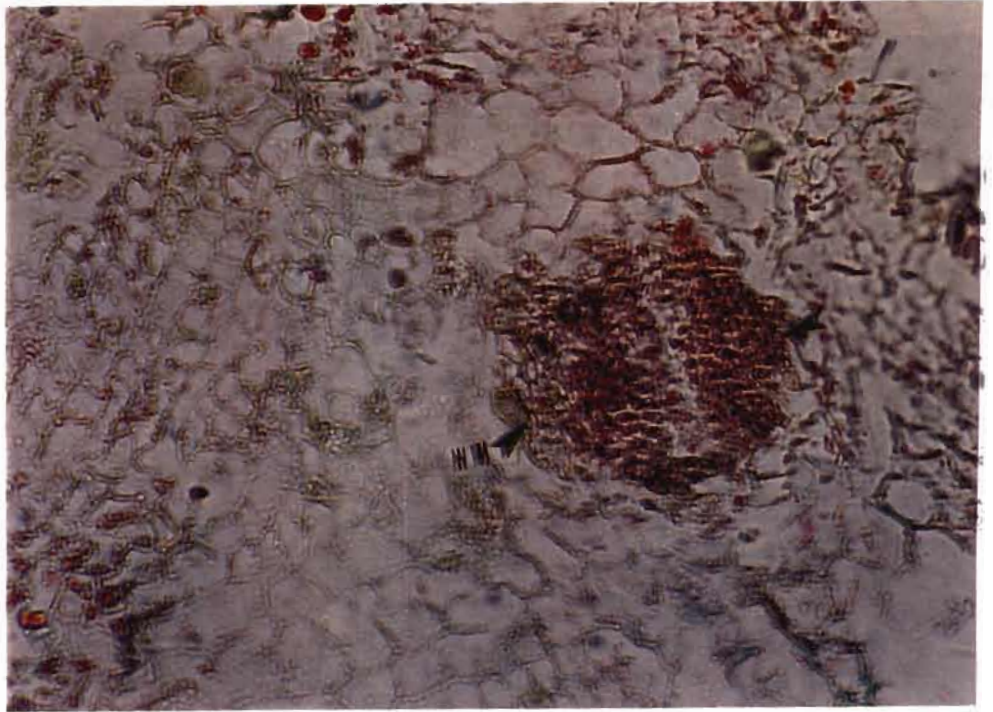
Fig.A-A': Au sein du tissu parenchymateux cortical externe, s'individualisent deux amas de cellules densément colorées à rapport nucléoplasmique élevé formant des nodules méristématiques(N.m.). Ces deux amas sont les premières ébauches du futur méristème organogène (▶). (Fig A : Gr. x 50; Fig A' : Gr. x 125)

Fig.B-B': Ces nodules évoluent en bourgeon; on distingue la zone axiale (Z.a.) constituée de petites cellules méristématiques et un primordium foliaire(p.f.) bien différencié . (Fig B : Gr. x 125; fig B' :Gr. x 250)

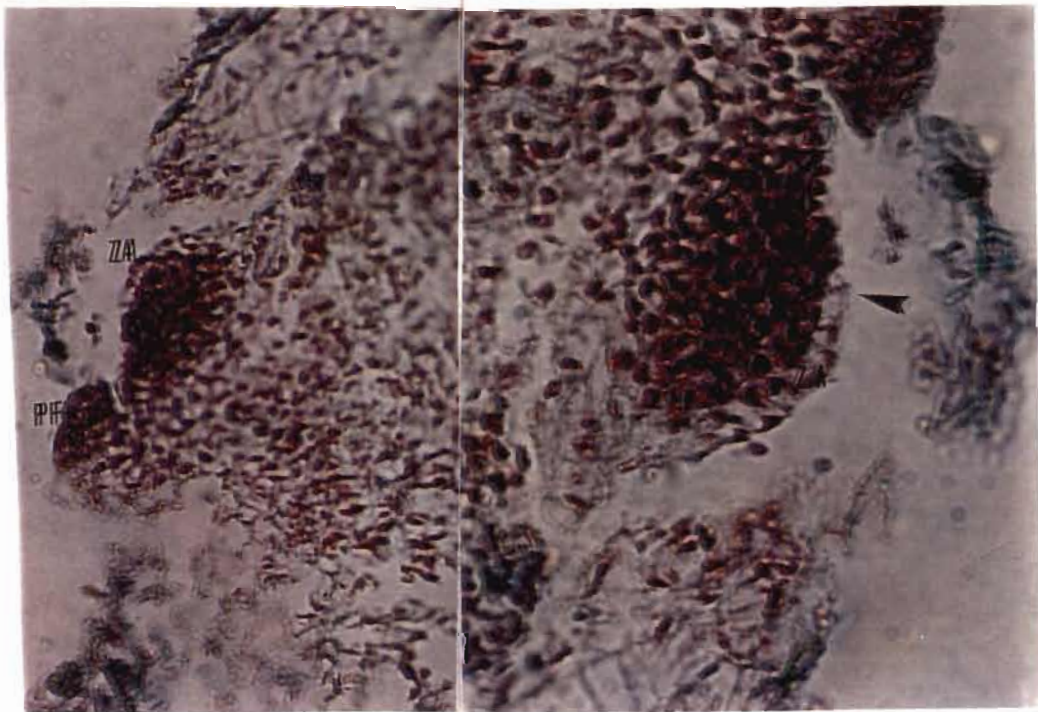
Ai



A'



B'



B

**SYMBIOSE FIXATRICE
D'AZOTE**

Tabl. N° 1 : composition minérale et organique des substrats utilisées

	pH	C (ppm)	N (ppm)	C/N
SN	8,35	3,91	0,47	8,30
CM	8,43	2,31	0,29	7,97

	Phosphate total ppm	Phosp assim ppm	Ca meq/100 g	Mg meq/100 g	Na meq/100 g	K meq/100 g	somme meq/100 g	V
SN	0,871	225,4	2,82	2,43	0,181	0,39	5,82	5,57
CM	0,521	151,8	2,08	1,79	0,316	0,424	4,61	4,1

D) ETUDE DE LA SYMBIOSE FIXATRICE D'AZOTE ATMOSPHERIQUE

1) INFLUENCE DU SUBSTRAT DE CULTURE

Le test effectué a porté sur l'étude du substrat ; 2 types de substrat ont été utilisés : un substrat siliceux pauvre en éléments nutritifs et un substrat riche en matières humiques et en éléments minéraux.

A) Croissance et morphogénèse

Le substrat SN riche en éléments nutritifs (tabl. N°58), favorise la croissance de la partie aérienne aussi bien chez les plants inoculés que chez les plants non inoculés. Les valeurs de croissance obtenues entre plants inoculés et non inoculés ne sont pas significativement différentes ; l'effet de l'inoculation semble ici négligeable, c'est plutôt la nature du substrat qui joue le rôle prépondérant.

Sur le substrat SN, il se développe un chevelu racinaire très important qui en se déployant, colonise la quasi totalité du substrat ; dans ces conditions le pivot est généralement court, de nombreuses racines latérales sont formées ; les ramifications augmentant, le chevelu racinaire devient très dense.

Par contre sur le substrat siliceux CM, le pivot est généralement beaucoup plus long, il se développe peu de racines secondaires et par conséquent, le chevelu racinaire est beaucoup moins dense.

B) Nodulation

Il est apparu au cours de cette expérience que le substrat siliceux pauvre en matière organique favorise la nodulation. Dans ces conditions, les nodules formés sont gros, multilobés et s'installent soit au niveau du collet soit sur les ramifications latérales. La comparaison des moyennes par le Test de Fischer, permet de déceler des différences significatives au seuil de 5% entre les deux traitements du point de vue nodulation.

Cependant, cette bonne nodulation n'est pas positivement corrélée avec une bonne croissance des parties aériennes.

C) Teneur en éléments nutritifs du substrat

En considérant la dynamique des éléments nutritifs du substrat, une analyse aux temps T0 avant l'inoculation et Tf après deux mois de culture (tabl. N°59), au moment où les plants ont été sacrifiés, on note une différence d'évolution des teneurs en éléments nutritifs dans les deux traitements.

abl. N° 58 :Influence de la nature du substrat sur la croissance et la nodulation de plants d'*A. albida* au out de 2 mois

N : Sable noir riche en éléments minéraux et organiques

M : Sable blanc pauvre en éléments minéraux et organiques

	Long Partie Aér (cm)	Long Partie Rac (cm)	Nombre nodules
Inoculés SN	18,66 a	12,37 b	10,5 b
Inoculés CM	12,12 b	17,75 a	16,87a
non Inoculés SN	15,66 a	9,32 b	
non Inoculés CM	11,5 b	11,5 b	

Tabl. N° 59 :Evolution des valeurs des différents paramètres physico-chimiques des deux substrats utilisés (CM et SN) en début de culture (T initial) et en fin de culture (T final)

parametre	traitement	T initial	T final	Variation
pH	SN	8,3	8,4	
	CM	8,43	8,51	
C (meq)	SN	3,91	4,26	+8,90%
	CM	2,31	1,76	-2,90%
N (meq)	SN	0,47	0,4	
	CM	0,29	0,21	-27%
C/N	SN	8,3	10,65	+ 28%
	CM	7,97	9,26	+16,10%
P (meq)	SN	0,871	0,828	
	CM	0,521	0,324	-37,80%
P assim (meq)	SN	225,4	285,2	+26%
	CM	151,8	78,2	-48%
Ca (meq)	SN	2,82	3,07	+9,50%
	CM	2,08	1,58	-24,50%
Na (meq)	SN	0,181	0,304	+67,90%
	CM	0,316	0,325	+ 2,8%
K (meq)	SN	0,39	0,67	+71,70%
	CM	0,424	0,22	-48,10%
S (meq)	SN	5,82	8,2	+ 40,8%
	CM	4,61	3,37	-26,80%

Sur un substrat squelettique et pauvre, on peut observer une tendance régressive vers un épuisement rapide du sol car les prélèvements en éléments nutritifs de la plante en réduisent de façon sensible la teneur en particulier en N, P assimilable, K et Ca.

Par contre, sur un substrat riche en éléments nutritifs, la tendance est vers la stabilisation et l'enrichissement des éléments minéraux; les capacités d'échanges ioniques sont améliorées avec des augmentations de 26% en Phosphore assimilable, 71,7% en Potassium et 67,9% en Sodium et 9,5% en Calcium.

Aucune tendance régressive dans la teneur en éléments nutritifs n'est constatée.

D)Discussions

Là nature du substrat agit sur la nodulation et sur l'architecture de la plante. Lorsque les conditions sont limitantes (sol pauvre en éléments nutritifs), la plante développe un pivot puissant, allongé avec très peu de racines latérales. A l'inverse, face à des conditions de sol enrichi, l'architecture de la plante se modifie pour développer à la place d'un pivot long, un système plus court plus ramifié et présentant un chevelu racinaire plus dense qui arrive à coloniser la totalité du substrat et mobiliser ainsi tous les éléments nutritifs disponibles dans le sol. Ceci est lié principalement à l'effet de l'environnement immédiat racinaire notamment la présence de P assimilable d'N, K et S qui favorise le développement de la plante entière en maintenant un équilibre adéquat tout en évitant les pertes.

Il est apparu que le développement de la plante au cours de ces deux mois de culture, est tributaire de la disponibilité et des apports en éléments nutritifs du sol. Dans ces conditions, l'inoculation n'a pas d'effet sur la croissance des plants. Les différences non significatives entre les témoins non inoculés et les plants inoculés cultivés tous deux sur un substrat riche en éléments nutritifs, montrent que lorsque les éléments nutritifs sont disponibles en quantité suffisante, la plante choisit la voie de l'assimilation plutôt que la voie de la symbiose.

En effet, la présence d'un système racinaire abondant colonisant la totalité du substrat associée à une assimilation efficace des éléments nutritifs, permettent d'obtenir un rendement élevé de la transformation en biomasse (Danso et al., 1991).

D'autre part, comme l'ont montré Sougoufara et al., (1989) l'aptitude à fixer l'azote et l'aptitude à assimiler l'azote provenant du sol constituent deux modalités de prélèvement de l'azote totalement indépendants l'un de l'autre. La teneur du sol en éléments nutritifs constitue le principal facteur orientant le métabolisme azoté vers une assimilation racinaire ou vers une symbiose.

Chez les légumineuses en général, l'assimilation de l'azote soit directement à partir du sol ou bien à partir des produits de la symbiose fixatrice d'azote dépend de la disponibilité du sol en nitrate et en ammonium et des conditions de l'environnement (pH, Température, etc...). Chez *A. albida* il a été établi (Sanginga et al., 1990) que seule une faible proportion de l'azote (20% de l'azote total) provient de la fixation et par conséquent l'espèce se développe en privilégiant la voie de l'assimilation des réserves azotées du sol.

Marriotti et al., 1992, sur *Casuarina équisetifolia* a fait la même déduction à partir de l'estimation de l'azote fixé en présence d'azote combiné dans le sol; il semble que *Casuarina* comme la plupart des espèces fixatrices d'azote préfère utiliser l'azote combiné du sol lorsqu'il est disponible plutôt que de recourir à l'azote issu de la symbiose.

Par contre chez *Leucaena leucocephala* une importante proportion 52 à 64% de l'azote est issu de la fixation lorsque la souche utilisée est effective (Sanginga et al., 1985).

On sait aussi que les nodules sont de grands consommateurs d'énergie (Salsac et al., 1984); l'effet dépressif constaté de la nodulation sur les paramètres de croissance, serait dû au détournement d'une grande partie des métabolites vers les racines et les nodules au détriment des parties aériennes.

Sur un substrat squelettique et pauvre, on a pu observer une tendance régressive vers un épuisement rapide du sol liés aux prélèvements en éléments nutritifs de la plante. Par contre, sur un substrat riche en éléments nutritifs, nous avons constaté qu'entre le temps T_0 initial et le temps T_f Final, le sol a pu accumuler des éléments minéraux révélant un enrichissement avec une amélioration des capacités d'échanges ioniques.

Ce phénomène d'enrichissement du substrat que nous avons constaté, trouve une explication dans le fait qu'en présence d'une activité microbologique plus intense dans le sol riche en éléments nutritifs (Charreau et Vidal, 1965), la décomposition et le recyclage des racines fines induisent une restitution rapide au sol des éléments minéraux.

Ces constatations renforcent l'hypothèse déjà émise par Brouwer et al., 1992 sur la pré-existence des micro-sites favorables à l'installation et au développement d'*A. albida*. En effet Brouwer et al., (1992) suggèrent que l'"effet albida" se caractérisant par une augmentation des rendements à l'approche de la canopée ne serait pas totalement liée à l'arbre mais plutôt au fait que l'arbre choisit et s'implante préférentiellement sur des micro-sites favorables. Ces micro-sites qui sont d'anciennes termitières sont des zones très riches en matière organique et éléments minéraux qui participent activement à la croissance et au développement des plants d'*A. albida*.

2) INFLUENCE DE L'INOCULATION AVEC DIFFERENTES SOUCHES DE RHIZOBIUM

2-1) Expérience menée en serre

Plusieurs souches de *Bradyrhizobium* 47.6.4 , 45.6.1 et 47.6.3 (isolées sur *A. albida*) et BAYE IR (isolées sur *A. mangium*) ont été comparées avec des souches de *Rhizobium* à croissance rapide Pj12 (isolée sur *Prosopis juliflora*) et Tal 1405 (isolée sur *Leucaena leucocephala*).

Après 14 semaines de culture, les paramètres de hauteur de poids sec des parties aériennes poids sec des parties racinaires ARA, SARA, Azote total ont été mesurés.

Le nombre de nodules n'a pas été mesuré car selon de nombreux auteurs, la biomasse nodulaire en particulier le poids sec des nodules est un critère plus fiable pour estimer l'intensité de la nodulation (Sougoufara et al., 1989).

A) Croissance et biomasse

On constate un effet positif de l'inoculation car en l'absence de tout apport azoté, les plants témoins non inoculés présentent une mauvaise croissance aussi bien des parties aériennes que des parties racinaires. L'aspect végétatif dénote une carence en azote avec des feuilles petites et chlorosées. Les plants inoculés avec les différentes souches sont d'aspect vert et présentent une croissance vigoureuse.

L'inoculation avec la souche Baye IR améliore sensiblement la croissance en hauteur; le gain de croissance est estimé à 58% par rapport au témoin non inoculé (fig N° 30).

En considérant la biomasse des parties aériennes (fig N° 31), on constate que la souche Baye IR est la plus performante puisqu'en sa présence, le poids sec des parties aériennes est le plus élevé. Cette souche est suivie dans le classement par les souches natives d'*A. albida*; les souches à croissance rapide sont les moins performantes.

Lorsqu'on considère la biomasse racinaire (fig N° 32), la souche Baye IR reste la plus performante avec un poids sec moyen des racines significativement différent de ceux obtenus en présence des autres souches; les souches natives sont intermédiaires alors que les plus faibles valeurs sont observées avec la souche de *Rhizobium* à croissance rapide Tal 1405. Néanmoins la souche Pj 12 présente des performances moyennes.

Le poids sec des nodules est élevé pour la souche Pj12 à croissance rapide (fig 33); les nodules sont nombreux et de très petite taille; par contre, les souches de *Bradyrhizobium* à croissance lente (Baye IR et 47.6.4) produisent peu de nodules mais les nodules formés sont gros et multilobés.

B) ARA et SARA

Fig N°30: Hauteur totale de plants d'*A. albida* inoculés en serre avec 2 souches de Rhizobium (marquées par astérisques) et 4 souches de Bradyrhizobium après 15 semaines de culture en pots

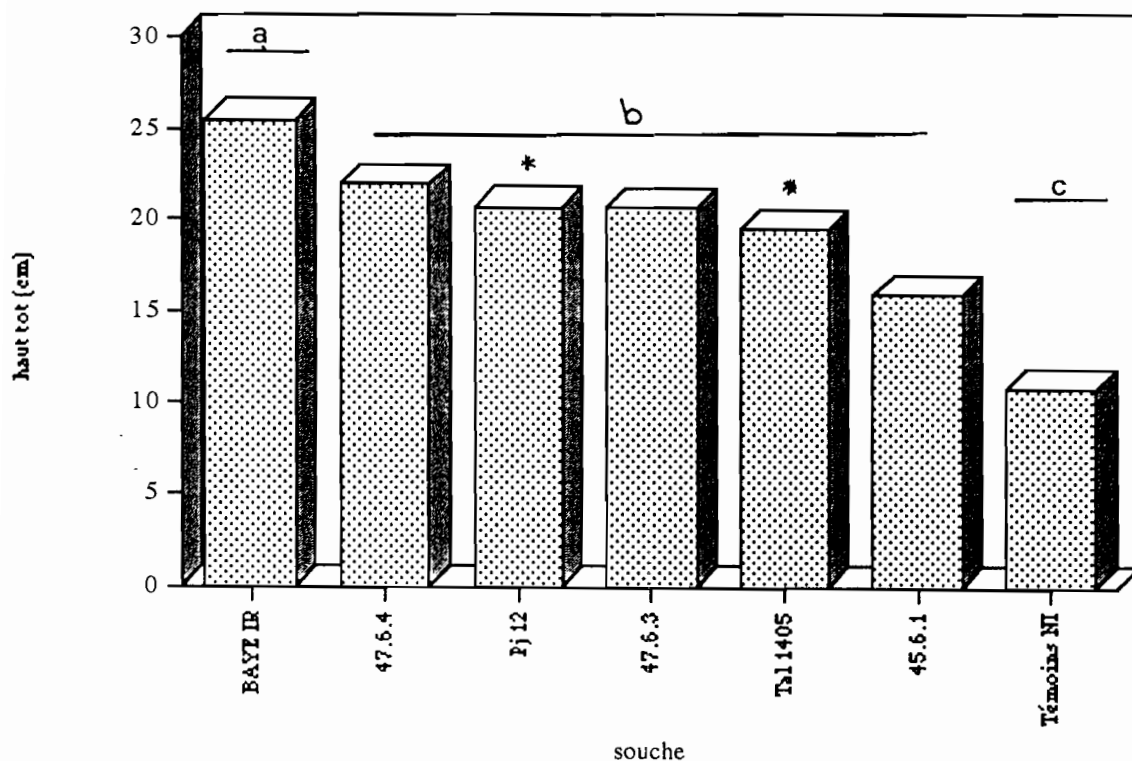


Fig N°31 : Poids sec des parties aériennes de plants d'*A. albida* inoculés en serre avec 2 souches de Rhizobium (marquées par astérisques) et 4 souches de Bradyrhizobium après 15 semaines de culture en pots

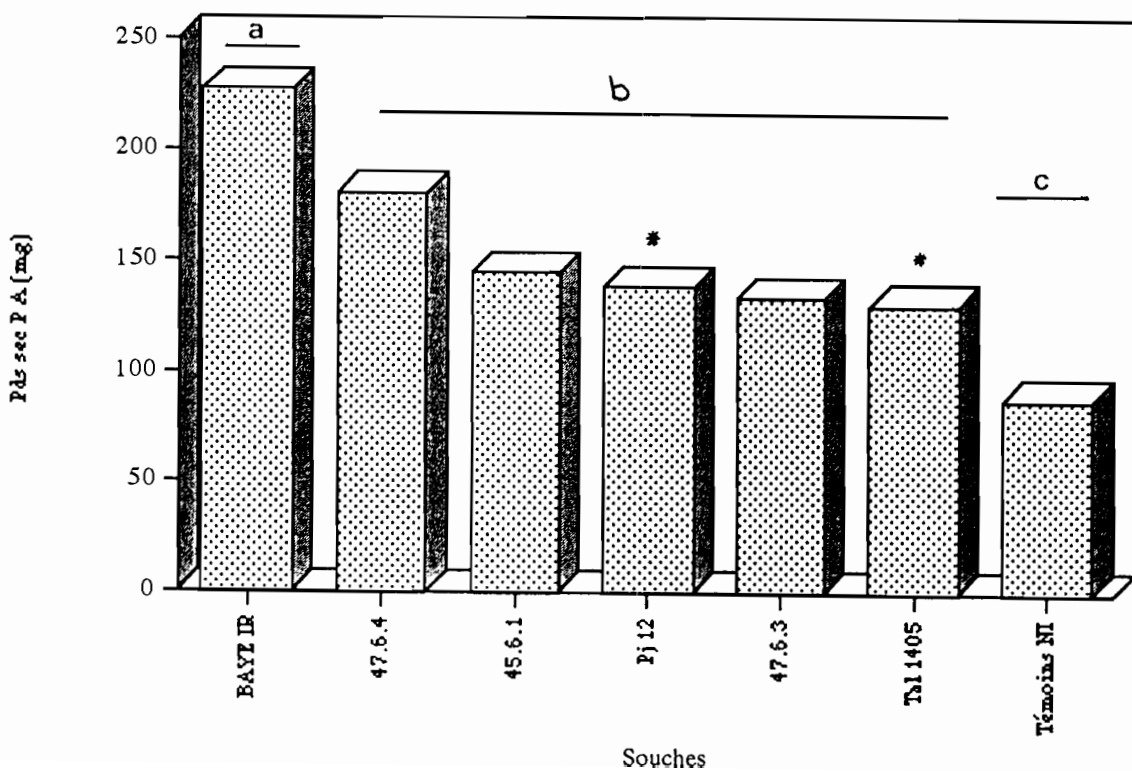


Fig N°32 : Poids sec des parties racinaires de plants d'*A. albida* inoculés en serre avec 2 souches de Rhizobium (marquées par astérisques) et 4 souches de Bradyrhizobium après 15 semaines de culture en pots

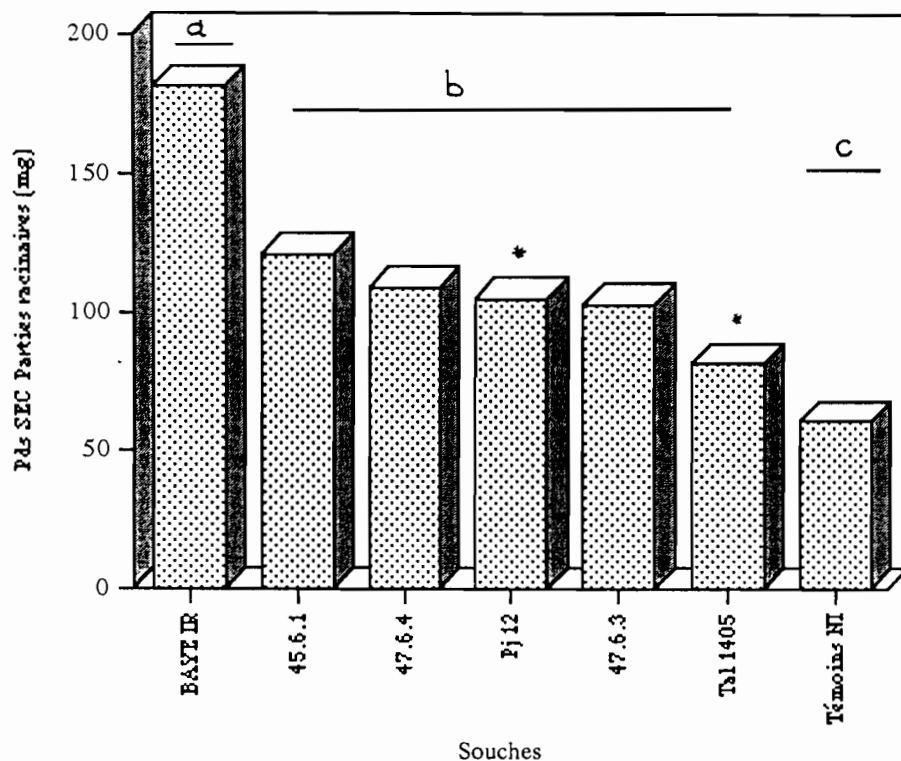


Fig N°33 : Poids sec des nodules de plants d'*A. albida* inoculés en serre avec 2 souches de Rhizobium (marquées par astérisques) et 4 souches de Bradyrhizobium après 15 semaines de culture en pots

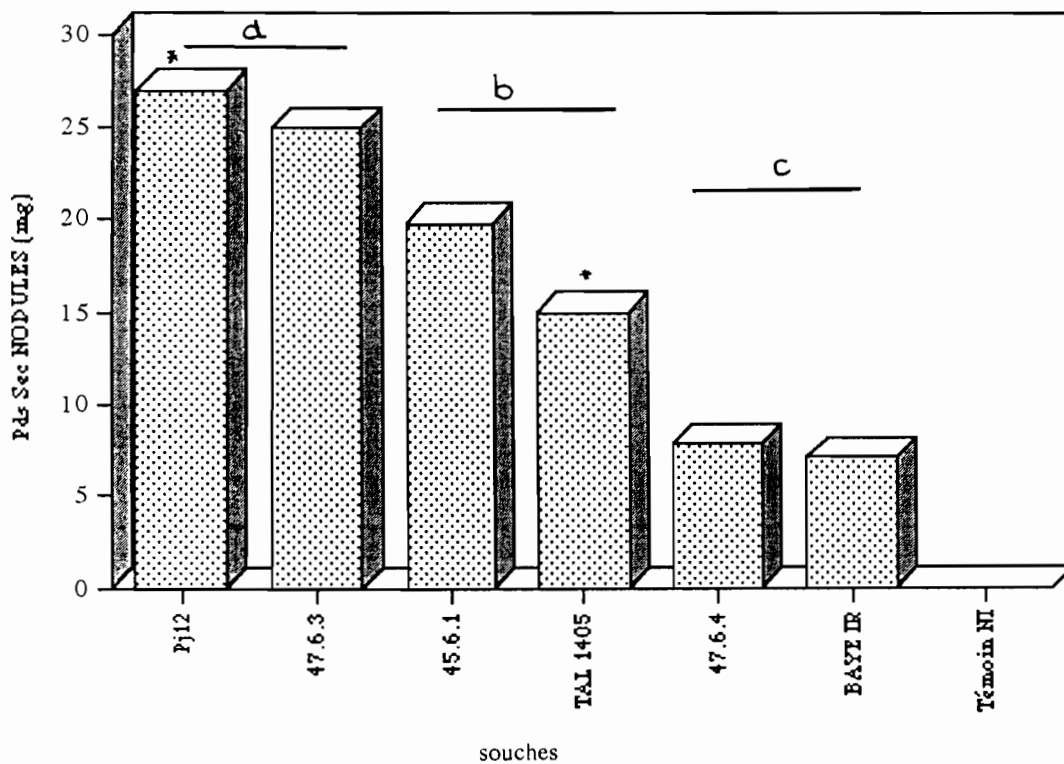


Fig N°34 : Activité réductrice d'acétylène (ARA) de plants d'*A. albida* inoculés en serre avec 2 souches de Rhizobium (marquées par astérisques) et 4 souches de Bradyrhizobium après 15 semaines de culture en pots

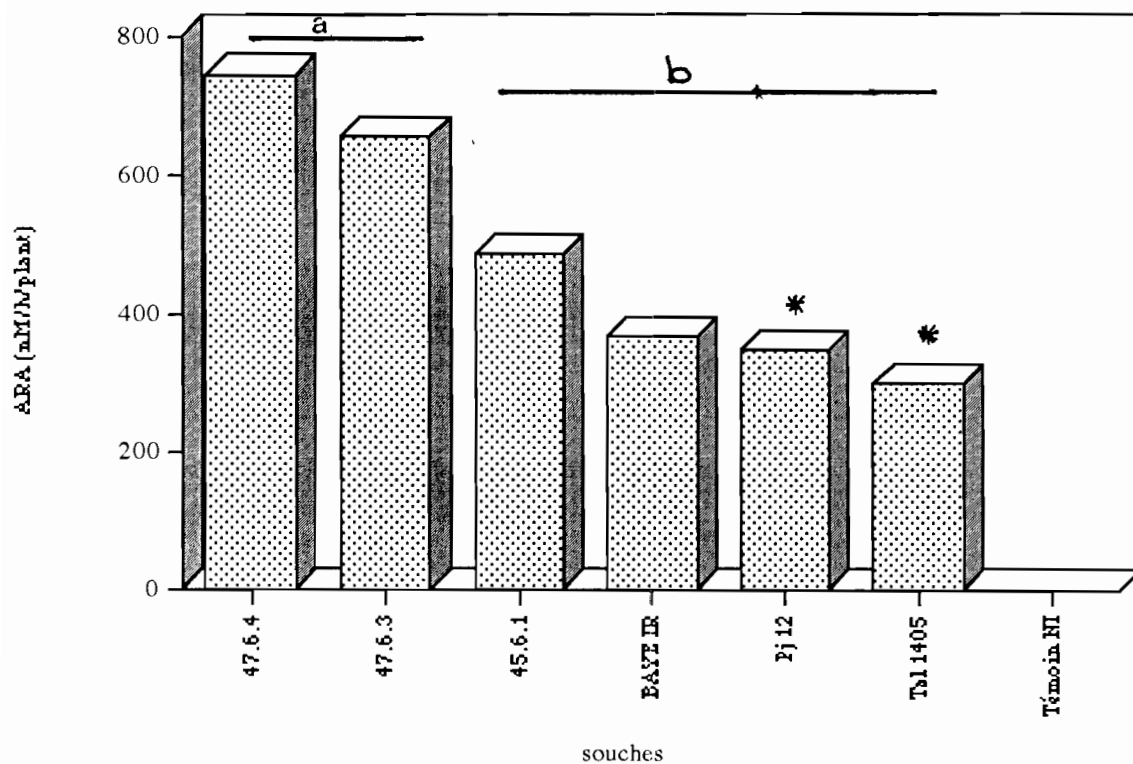
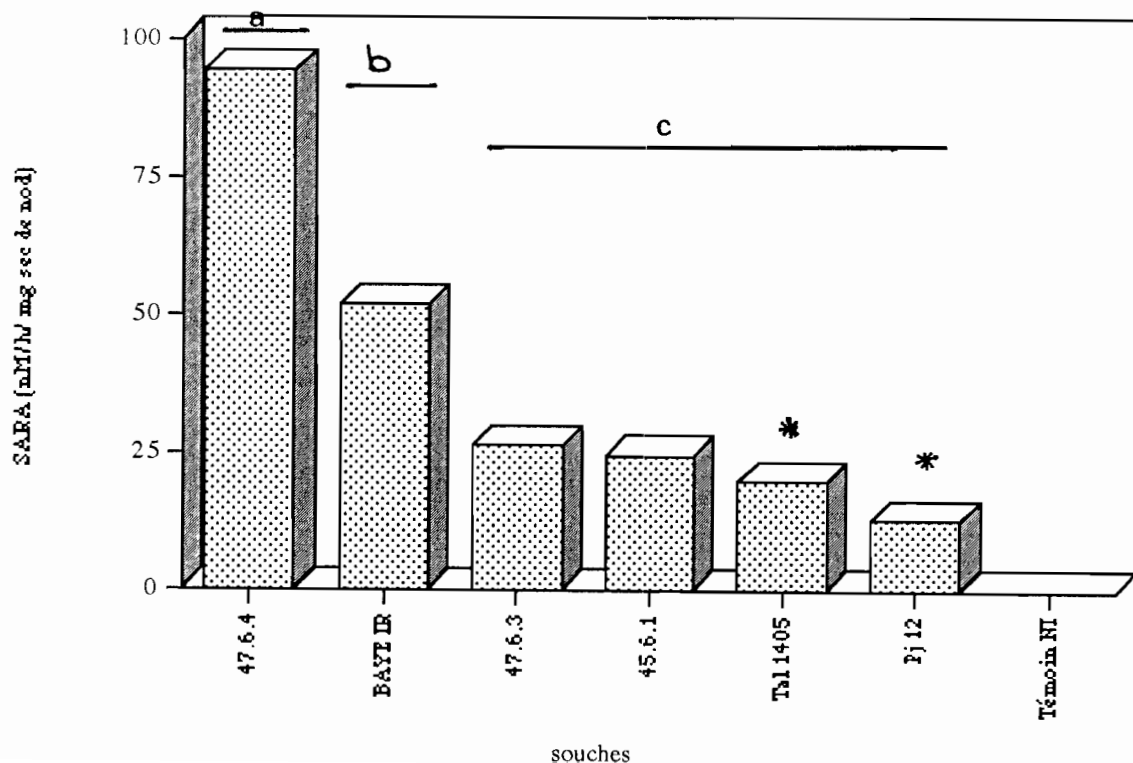


Fig N°35 : Activité réductrice d'acétylène spécifique (SARA) de plants d'*A. albida* inoculés en serre avec 2 souches de Rhizobium (marquées par astérisques) et 4 souches de Bradyrhizobium après 15 semaines de culture en pots



L'activité réductrice d'Acétylène qui permet une estimation instantanée de la quantité d'azote fixée par unité de temps et par plant, fournit des indications fiables lorsqu'on cherche à comparer l'efficacité de différentes souches. Sur la figure N°34 les souches sont classées par ordre décroissant de l'activité nitrogénasique; les souches de *Bradyrhizobium* se trouvent en tête de classement alors que les souches de *Rhizobium* à croissance rapide ont des valeurs d'ARA plus faibles.

L'ARA spécifique ou SARA est, pour une plante ou une souche donnée, une valeur d'Activité Réductrice d'Acétylène rapportée au poids sec des nodules formés; il donne une indication de l'efficacité nodulaire; d'après les valeurs de SARA (fig N° 35), on constate que les nodules formés à partir de la symbiose avec les souches natives ont une efficacité plus marquée que les nodules formés en présence des souches non natives (Baye R) et des souches de *Rhizobium* à croissance rapide (Pj12 et TAL 1405).

C) Azote total de la plante

La méthode d'estimation de l'azote fixé par la différence d'azote total entre plants inoculés et plants témoins non inoculés dans des conditions de sol dépourvu d'azote constitue une bonne méthode de quantification de l'azote fixé (fig N° 36) et (tabl.N°60). La souche BAYE IR fixe une quantité d'azote significativement plus importante par rapport aux autres souches (4,96 mg d'azote par plant); la souche 47.6.4 est parmi les souches natives d'*A. albida* la plus efficace (2,95 mg d'azote par plant); les autres souches ne présentent pas de différence significative entre elles.

D) Corrélation entre les différents paramètres étudiés

L'étude de la matrice de corrélation des variables mesurées (tabl. N°61) montre que l'azote total est un critère corrélé de manière significative à la hauteur (0,934) au poids sec des parties aériennes (0,958) et au poids sec des parties racinaires (0,844). Par conséquent, ces paramètres de biomasse sont des paramètres discriminants à prendre en compte lors de l'estimation de l'efficacité de la symbiose.

D'autre part, il existe une bonne corrélation positive entre la biomasse des parties aériennes et la biomasse des parties racinaires; ainsi la souche qui améliore la croissance des parties aériennes améliore en même temps le développement du système racinaire.

Par contre, il n'existe aucune corrélation significative entre les paramètres de croissance, de biomasse, d'azote total et les paramètres d'activité nitrogénasique (ARA et SARA).

2-2) Etude de l'effectivité des souches en tube de culture

Tabl. N°60: Effet de l'inoculation de plants d'*A. albida* inoculés en serre avec 2 souches de Rhizobium (marquées par astérisques) et 4 souches de Bradyrhizobium sur la quantité d'azote total et d'azote fixé (évaluée d'après la méthode par différence) après 15 semaines de culture en serre

traitements	Tal 1405*	47.6.3	45.6.1	BAYE IR	47.6.4	Pj12*	Témc
Azote total/plant (mg)	5,17	4,98	4,29	7,8	6,02	5,09	3,0
Azote fixé/ plant (mg)	2,1	1,91	1,22	4,73	2,95	2,02	0

Tabl. N° 61 : Matrice de corrélation des paramètres mesurés sur les plants d'*A. albida* inoculés en serre avec 2 souches de Rhizobium et 4 souches de Bradyrhizobium après 15 semaines de culture en pots

Matrice de corrélation pour les variables : X₁ ... X₇

	HT	PSPA	PSPR	ARA	SARA	P sec nod	N total
HT	1						
PSPA	,859	1					
PSPR	,753	,927	1				
ARA	,585	,478	,351	1			
SARA	,374	,426	,145	,79	1		
P sec nod	,261	-,087	,044	,414	-,085	1	
N total	,934	,958	,864	,404	,315	-,044	1

*Ht= hauteur totale (cm)

*PSPA = Poids sec des parties aériennes (mg)

*PS PA = Poids sec des parties racinaires

*P sec nod= Poids sec des nodules (mg)

*ARA = Activité réductrice d'Acétylène (nM/h/plant)

*SARA= Activité réductrice d'Acétylène spécifique (nM/h/mg de nodule sec)

*N total = azote PA+Azote PR +Azote nod (mg)

Fig. 14.30 : Azote total des plants de *A. tuberosa* inoculés en serre avec 2 souches de Rhizobium (marquées par astérisques) et 4 souches de Bradyrhizobium après 15 semaines de culture en pots

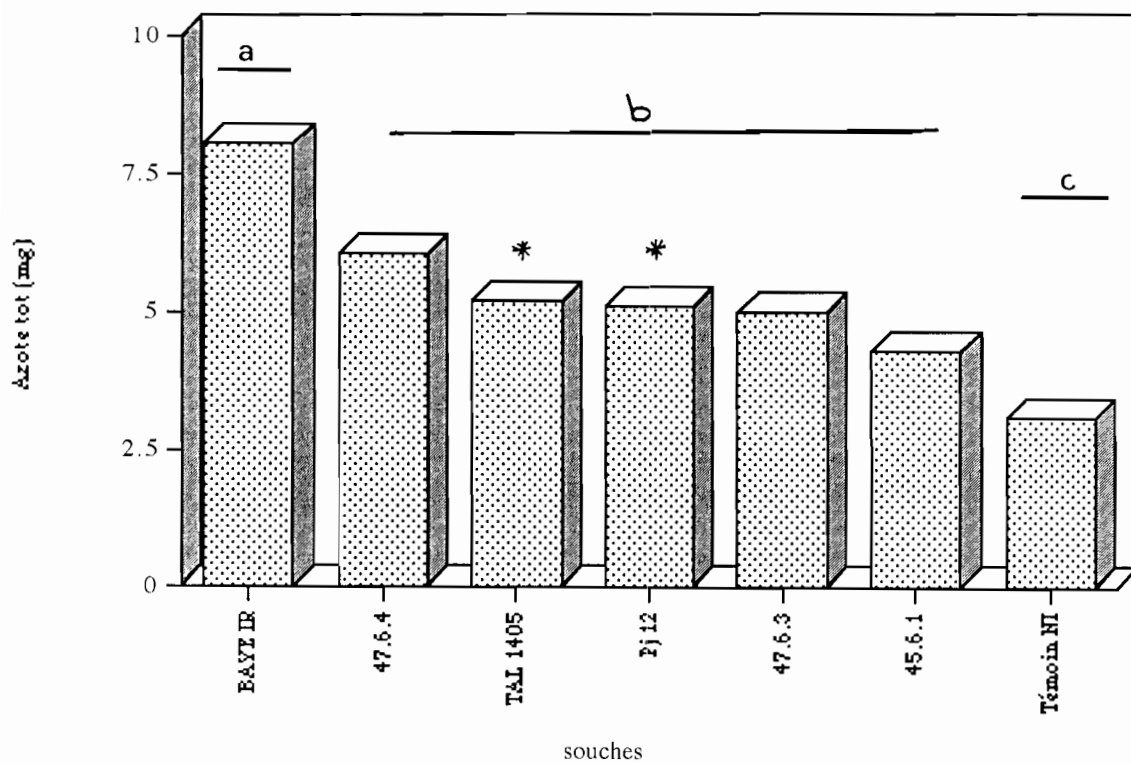


Fig N°37: Cinétique de la formation des nodules d' *A. albidae* en fonction des souches utilisées (Baye IR ; 47.6.4 ; Pj 12^a) au cours de 5 semaines suivant l'inoculation

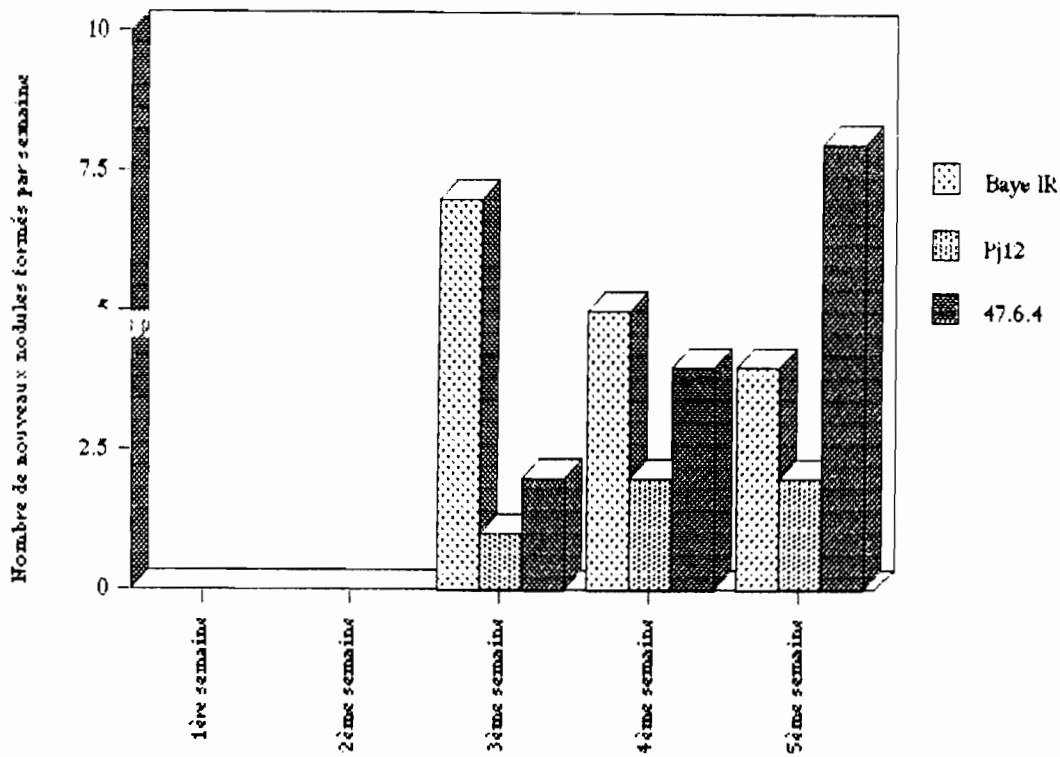
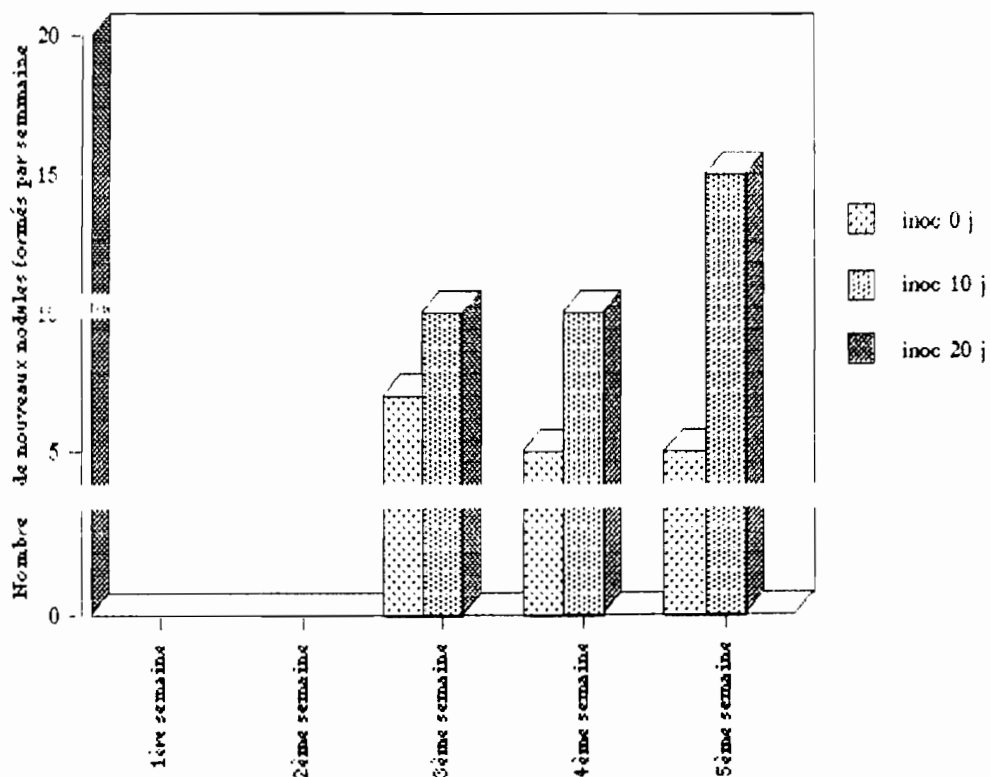


Fig N°38: Cinétique de la formation des nodules en tubes au cours de 5 semaines suivant l'inoculation ; les plants ont été inoculés "in vitro" avec la souche 47.6.4 à 0 jour, 10 jours et 20 jours après la mise en place des plants en tube (T0).



L'inoculation des jeunes plantules d'*A. albida* a été effectuée avec différentes souches de Rhizobium (47.6.4, Baye IR et PJ 12) (Tabl. N°62); ces trois souches sont identifiées comme très différentes du point de vue de leurs origines respectives, et ont déjà montré des différences très nettes dans la réponse à l'inoculation en serre.

A) Efficienc e des souches

L'analyse de variance du caractère hauteur totale de la partie aérienne révèle des différences significatives entre les traitements. Le traitement témoin en l'absence de toute inoculation et de toute contamination se différencie des autres traitements ; l'analyse de critères de hauteur totale, poids sec des nodules et quantité d'azote totale montre une nette supériorité de la souche de Bradyrhizobium native 47.6.4 isolée sur *A. albida*.

Lorsqu'on considère le poids sec des parties aériennes et racinaires la souche Baye IR souche de Bradyrhizobium isolée sur *A. mangium*, se comporte aussi bien que la souche native 47.6.4.

L'azote total dosé par méthode Kjehdal révèle une plus forte accumulation d'azote dans les tissus en présence de la souche native. Il est ainsi démontré que si la souche Baye Ir est aussi infective que la souche native, l'exploitation du potentiel de fixation est optimisée en présence de la souche 47.6.4.

Comme cela a été démontré auparavant sur les plantes inoculées en serre, *A. albida* est nodulé aussi bien par les souches de Rhizobium à croissance rapide que par les souches de Rhizobium à croissance lente (*Bradyrhizobium*); l'efficienc e de la fixation est optimisée en présence de Bradyrhizobium, et en particulier lorsqu'on utilise une souche native. Les performances "in vitro sont plus faibles par rapport à celles observées en serre ; en effet les valeurs obtenues en serre sont 2 à 3 fois plus élevées que celles obtenues en tubes pour une durée de culture plus courte.

B) Dynamique de la nodulation par les différentes souches en tube

Les plants cultivés en tubes ont été suivis pendant 45 jours et le nombre de nodules formés a été noté jour après jour. Pour des raisons de commodité il a été défini 3 périodes à partir de la 3ème semaine (date où les premiers nodules apparaissent "in vitro") ; ces périodes vont de la 3ème à 4ème semaine puis de la 4ème à la 6ème semaine

à partir de la date de l'inoculation (fig N° 37).

- la souche BAYE IR est très infective, l'intensité maximale d'infectivité est obtenue au bout de la première semaine où un nombre maximal de nodules est formé ; l'infectivité chute progressivement à 15 et 30 jours

- la souche 47.6.4 souche de Bradyrhizobium native d'*A. albida* répond à l'inoculation par une courbe d'infectivité ascendante qui suit la croissance du système racinaire

SYMBIOSE FIXATRICE D'AZOTE CHEZ *A. albida*

Planche N° 23

Inoculation en tube de jeunes plants d'*Acacia albida*

Fig. A : Inoculation dans les tubes de culture de plants d'*A. albida* ayant subi une excision de l'apex de racine et cultivé sur motte Milcap. Les nodules se forment sur les racines latérales (▶) .(Gr. x 2,5)

A



Tabl N° 62: Influence de la nature de la souche sur la croissance , la biomasse et la quantité totale d'azote par plant chez *A. albida* inoculé avec 2 souches de Bradyrhizobium et une souche de Rhizobium (marqué par astérisques) après 3 mois de culture "in vitro"

souches	hauteur totale (cm)	Poids Sec nodules (mg)	Poids Sec Partie aeriene (mg)	Poids Sec Partie racinaire (mg)	Azote total par plant (mg)
BAYE IR	13 b	3,2 b	100,8 a	17,5 a	3,07 b
PJ 12 *	13 b	3,5 b	76,3 b	20 a	3,63 b
47.6.4	15,2 a	4,12 a	116,6 a	22,9 a	5,85 a
T non Inoculé	8,4 c	0	64,9 b	17,5 a	2,7 b

Tabl N° 63: Influence de la date d'inoculation avec la souche 47.6.4 sur la croissance la biomasse et sur la quantité d'azote total par plant chez *A. albida* après 3 mois de culture "in vitro"

DATE INOCUL	hauteur totale (cm)	Poids Sec nodules (mg)	Poids Sec Partie aeriene (mg)	Poids Sec Partie racinaire (mg)	Azote total par plant (mg)
0 J	14,8 a	5,8 a	89,2 a	24,1 a	3,51 a
10 J	15 a	5,11 a	78,3 a	12,8 b	3,18 a
20 J	10,08 b	0	70,8 a	11,9 b	2,3 a

- la souche Pj 12 de Rhizobium à croissance rapide produit peu de nodules avec *A. albid*a au cours de la première semaine et leur nombre reste stationnaire et faible.

2-3) Influence de la date de l'inoculation

Nous avons cherché à déterminer la date optimale pour une bonne réponse à l'inoculation. 3 périodes d'inoculation ont été choisies : 0 jour, 10 jours et 20 jours après germination. L'inoculation a été faite avec la souche 47.6.4 dans des tubes de culture.

l'analyse des résultats (tabl.63) montre que les plants inoculés entre 0 et 10 jours se développent mieux que les plants inoculés à 20 jours ; en effet l'inoculation effectuée au moment de la mise en culture favorise une bonne croissance des parties aériennes et racinaires ; les critères de poids sec des nodules et d'azote total par plant ne se différencient pas pour les deux traitements 0 jours et 10 jours.

Par contre, lorsque l'inoculation est effectuée après 20 jours la nodulation est presque absente, la croissance des plants est ralentie, les plantules jaunissent et présentent un aspect rabougri.

En suivant la cinétique de formation des nodules on constate que (fig N° 38):

- l'inoculation à 0 jour produit des nodules nombreux, l'expression de l'infectivité est maximale durant la première semaine ; le nombre de nodules décroît durant les semaines suivantes.

- Par contre lorsque l'inoculation est effectuée 10 jours après la germination, la formation des nodules est continue et croissante. L'inoculation à 10 jours est la période optimale pour obtenir un grand nombre de nodules "in vitro". L'infectivité est très importante, lors des 15 premiers jours (10 nodules en moyenne sont formés par semaine); cette expression de l'infectivité s'accroît lors des deux semaines suivantes.

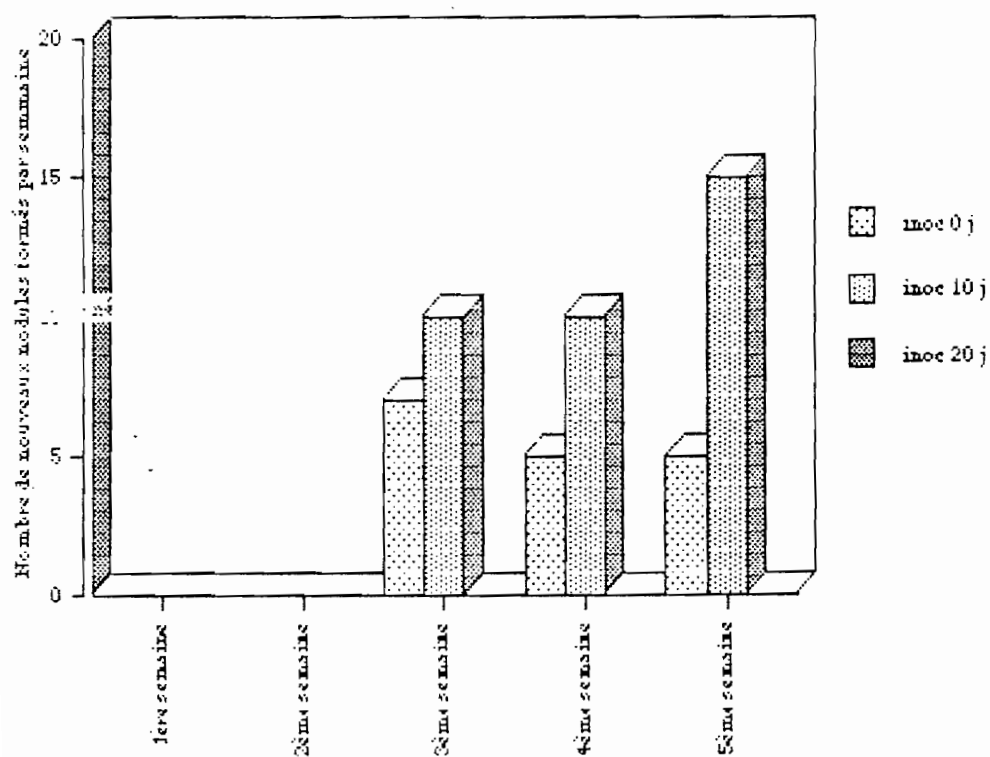
2-4) Discussion

A) Spécificité de l'association Rhizobium (s.l.) / *Acacia albid*a

Cette expérience de criblage de souches vient confirmer les constatations établissant que *A. albid*a nodule aussi bien en présence des souches de Rhizobium à croissance rapide qu'avec les souches à croissance lente, Bradyrhizobium (Galiana et al.,1990; Gueye, 1992).

*A. albid*a est une espèce très peu spécifique (promiscuous) puisque l'espèce nodule et fixe l'azote indifféremment avec des souches de Rhizobium PJ 12 et TAL 1405 ; cependant, il faut remarquer la petite taille des nodules et leur grand nombre en présence de souches de Rhizobium s.s. . Par contre lorsque l'inoculation est effectuée avec des souches de

Fig N°38: Cinétique de la formation des nodules en tubes au cours de 5 semaines suivant l'inoculation ; les plants ont été inoculés "in vitro" avec la souche 47.6.4 à 0 jour, 10 jours et 20 jours après la mise en place des plants en tube (T0).



bradyrhizobium, les nodules formés sont gros, de forme sphérique ou ellipsoïdale et surtout, moins nombreux.

Nous avons ainsi montré au cours de cette expérience que l'espèce *A. albida* est aussi bien nodulé par des souches de Bradyrhizobium que par des souches de Rhizobium mais l'association avec les souches de Bradyrhizobium est la plus efficiente.

Cette absence de spécificité dans la nodulation en fait une espèce à faible potentiel fixateur (Dommergues, 1987) comme la plupart des espèces sahéliennes d'*Acacia* bien adaptées au climat aride. Cette non spécificité ("promiscuous") et l'ubiquité des souches nodulant *A. albida* constitue un avantage puisque l'inoculation n'est pas toujours nécessaire, en revanche, la réponse à l'inoculation est peu spectaculaire et à la limite elle est souvent insignifiante; par contre *Leucaena leucocephala* qui est une espèce très spécifique dans ses associations symbiotiques, ne peut noduler et fixer l'azote de manière efficace qu'en présence de la souche adéquate de Rhizobium à croissance rapide (Sanginga et al., 1988). *Acacia mangium* est aussi une espèce très spécifique qui ne forme des nodules effectifs qu'en présence de certaines souches de Bradyrhizobium sp. (Galiana 1990). Par contre *Acacia auriculiformis* tout comme *Arachis hypogaea*, est classée dans le groupe "promiscuous and effective" puisqu'elle nodule de manière effective avec un grand nombre de souches.

Malgré cette absence de spécificité chez *A. albida*, on a montré que la réponse à l'inoculation est très variable en fonction des souches. La variabilité dans l'effectivité des souches de Bradyrhizobium a été démontré chez *Acacia mangium* (Galiana et al., 1990).

Il apparaît au vu de nos résultats, que l'optimisation de la quantité d'azote fixée ne pourra être réalisée que lorsque les souches les plus efficaces sont utilisées pour l'inoculation. En effet, chez *Acacia albida*, l'efficacité dans la symbiose fixatrice d'azote est accrue lorsque les souches les plus efficaces sont utilisées en particulier la souche Baye IR et la souche native 47.6.4. Ainsi la nécessité de sélectionner les souches les plus performantes s'affirme de plus en plus afin d'améliorer le potentiel fixateur.

Les expériences menées aussi bien en serre qu'en tubes ont montré une similarité de réponse dans les deux conditions de culture. Les souches les plus performantes en serre (47.6.4 et Baye IR) se sont avérées être les meilleures en tube.

L'absence de spécificité d'*A. albida* vis-à-vis des souches à croissance rapide et des souches à croissance lente se retrouve sur les résultats en tubes.

D'autre part, en examinant la dynamique d'infection des racines par les différentes souches, on remarque que les souches ont des stratégies d'infection qui varient ; la souche BAYE IR est très infective si on considère la rapidité avec laquelle elle infecte la plante alors que la souche 47.6.4 a une infection progressive dans le temps.

Cela suppose une mobilité plus grande et/ou un mécanisme de reconnaissance entre la bactérie et la cellule de la plante-hôte plus performant chez la souche Baye Ir que chez la souche 47.6.4.

Cependant, la diminution du nombre de nodules formés au cours des semaines suivantes à la suite de l'inoculation avec la souche Baye IR, révélerait un dysfonctionnement de la symbiose fixatrice d'azote résultant de la non adéquation de la souche, phénomène que la plante aura tendance à réduire en limitant et en inhibant la formation ultérieure des nodules. Il est aussi probable que la plante par un mécanisme de régulation diminue le nombre de nodules formés pour permettre aux nodules déjà formés de se développer comme cela a été montré chez *A. mangium* (Galiana et al., 1990).

Inversement lorsqu'il s'agit de la souche native moins rapide, la reconnaissance prend place plus tardivement, mais la formation ultérieure des nodules n'est pas inhibée.

Cette aptitude à noduler en présence de souches de *Rhizobium* et de *Bradyrhizobium* démontre parfaitement que les deux phénomènes reconnaissance et activité symbiotique fixatrice d'azote sont deux phénomènes distincts. L'absence de spécificité pose le problème de la reconnaissance entre plante et bactérie qui se situerait à trois niveaux: l'absence de spécificité pourrait être liée soit à des mutations au niveau des gènes Nod spécifiques responsables de la spécificité du spectre d'hôte soit à l'émission de nombreuses molécules (flavonoides) par la plante-hôte qui seraient reconnues par un grand nombre de micro-organismes, soit à l'existence d'une grande variabilité au niveau des sites moléculaires de reconnaissance et d'attachement (probablement les lectines). Les études moléculaires sur les gènes induisant des signaux extra-cellulaires entre la bactérie et la plante et des signaux intra-cellulaires, ont permis d'identifier quelques gènes NOD responsables de la spécificité dans la reconnaissance. Chez certaines lignées de soja le gène *nolA* est le gène responsable de la spécificité de la reconnaissance entre la lignée de soja et une souche de *Rhizobium*. La plupart des souches de *R. léguminosarum* qui nodulent les pois européens ne nodulent pas le pois d'Afghanistan. Un seul gène localisé au niveau de la plante régule cette reconnaissance restrictive (Lie 1974). Il existe une souche de *R. leguminosarum* qui est capable de surmonter cette restriction et de noduler effectivement avec les pois d'Afghanistan. Cette souche possède un seul gène le gène *nodX* qui est supposé modifier les facteurs Nod pour qu'ils soient reconnus par la plante.

En utilisant la voie de la transformation génétique et l'intégration de nouveaux gènes, des auteurs ont pu montrer que les lectines racinaires sont des facteurs déterminants dans la reconnaissance spécifique entre Légumineuses et *Rhizobium*. En effet, en raison de nombreuses similarités structurales avec les facteurs NOD, en particulier les hexosamine-oligosaccharides (Lis et Sharon, 1986), les lectines abondants au niveau de l'apex racinaire pourraient constituer une partie intégrante du complexe signal facteur NOD/ récepteur (Lugtenberg et al., 1991).

B) Activité fixatrice d'azote

Les témoins non inoculés n'ont pas subi de contamination. Aucun d'eux n'a nodulé; le substrat étant arrosé avec une solution nutritive dépourvue d'azote, tout l'azote dosé au niveau de la plante entière provient du métabolisme à partir des réserves cotylédonnaires. En l'absence de toute interférence liée à l'âge des plantes et au recyclage des racines fines mortes (l'expérience a été arrêtée au bout de 14 semaines), l'azote total des plants témoins non inoculés constitue une valeur fiable à partir de laquelle on peut valablement déduire la quantité d'azote apportée par la symbiose (Danso et al., 1991).

Langinga et al., (1990) en utilisant des plants d'*A. albida* inoculés, avait constaté que l'effet de l'inoculation n'était décelable qu'à partir de 24 et 36 semaines de culture. Au cours de notre expérience, nous avons montré que sur un substrat synthétique (perlite et vermiculite) arrosé avec une solution nutritive sans azote, il est possible d'observer une réponse suffisamment nette à l'inoculation chez *A. albida* avant la 14^{ème} semaine de culture.

Au cours des premiers stades de développement, la performance au point de vue fixation d'azote estimée en terme de la quantité d'azote fixée, est directement reliée à la productivité en biomasse végétale chez *A. albida*; en effet les performances observées (croissance, biomasse aérienne et racinaire) qui sont nettement plus importantes en présence de la souche Baye IR, bien qu'elles ne soient pas significativement corrélées avec l'activité nitrogénasique constatée au niveau des nodules, sont bien corrélées avec l'azote total. Comme chez *Casuarina equisetifolia* (Sougoufara et al., 1989), où les critères de sélection à privilégier sont la biomasse aérienne racinaire et nodulaire, nous avons montré que chez *A. albida*, les critères de biomasse aérienne et racinaire, qui sont des paramètres simples à déterminer et reflètent bien l'efficacité de la symbiose fixatrice d'azote.

En présence d'une bonne corrélation positive (0,927) entre la biomasse aérienne et la biomasse racinaire, la souche qui améliore la biomasse aérienne améliore en même temps la biomasse racinaire; en définitive le paramètre poids sec des parties aériennes donne une bonne indication de l'efficacité de la symbiose.

C) Influence de la date de l'inoculation sur la nodulation

Une inoculation effectuée entre 0 et 10 jours est plus favorable à la nodulation; il apparaît en effet qu'à cette période la plupart des organes sont en formation, les racines principales commencent à former des ramifications secondaires; la présence de racines secondaires favoriserait l'initiation de poils absorbants jeunes qui constituent les sites privilégiés d'infection par la bactérie (Nutman, 1956). Au bout de 20 jours de culture sur milieu axénique, l'inoculation à cette période ne produit aucun nodule bien que les ramifications secondaires soient en place. Il est probable que des modifications de la

composition du milieu de culture notamment le pH, la faible mobilité des bactéries, les modifications structurales des parois des cellules des poils entraîneraient une absence de nodulation.

Comme cela a été démontré chez *A. mangium* (Galiana et al., 1990), lorsque l'inoculation survient entre 0 et 15 jours, on obtient une nodulation abondante ; les nodules se forment en particulier au niveau du collet; par contre lorsque l'inoculation est retardée à 30 et 45 jours, la réponse à la nodulation est beaucoup plus réduite et par conséquent la fixation est moins bonne. L'étude de la cinétique de la nodulation chez *Acacia mangium* avait mis en évidence l'existence de deux pics de nodulation le premier entre 15 et 30 jours, le second à partir du 60^{ème} jour; ces deux pics de nodulation sont séparés d'une phase -plateau, période au cours de laquelle les nodules augmentent de taille.

Contrairement à *A. mangium* où les plants peuvent être cultivés en tubes de culture pendant 5 mois sans perturber leur capacité de développement (Galiana et al., 1990), l'utilisation d'un dispositif axénique en chambre de culture où tous les paramètres physico-chimiques peuvent être contrôlés, ne constitue pas pour *A. albida* un dispositif optimal favorisant la croissance et le développement des différents organes de la plante. En effet, les racines ont besoin d'un espace suffisant pour se déployer en un pivot puissant qui peut atteindre en quelques mois une longueur d'1 mètre (Alexandre et Ouedraogo, 1992) ; le volume du container étant limité, le développement du système racinaire est réduit. La partie aérienne n'arrive pas à se déployer et assez vite on constate que l'apex arrive à la limite du tube et la tige s'enroule sur elle-même.

Il faut noter aussi que les conditions de culture (faible quantité de lumière apportée par les néons ; modifications du pH du milieu liquide ; milieu de culture absolument dépourvu d'azote) peuvent entraîner une atténuation ou une absence de réponse à la fixation de l'azote. Cet état physiologique déficient se traduit par une mauvaise croissance et une chlorose des feuilles.

3) INFLUENCE DE LA MORPHOLOGIE DU SYSTEME RACINAIRE

Chez *A. albida*, le système racinaire est généralement pivotant sur sol sableux et profond avec une racine principale longue et quelques racines secondaires alors que sur sol hydromorphe ou argileux, la morphologie est tout à fait différente avec un système racinaire superficiel et traçant (Alexandre et Ouedraogo 1992). En décapitant l'apex racinaire 3 jours après la germination et en inoculant aussitôt après, nous avons cherché à déterminer l'influence de la morphologie racinaire (traçant et superficiel ou pivotant et profond) sur le potentiel de fixation biologique de l'azote.

Par ailleurs, des observations préliminaires, nous ont permis de constater que l'infection s'effectuait au niveau d'un poil absorbant situé à proximité de l'intersection entre la racine principale et la racine secondaire. L'ablation de l'apex racinaire pourrait être une méthode simple d'augmenter la capacité de nodulation et la quantité d'azote fixée qui sont très faibles chez *A. albida* comparée à d'autres espèces telles que *Acacia seyal* et *A. senegal* (Badji et al., 1992) et *Leucaena leucocephala* (Sanginga et al., 1989).

3-1) Expérience menée en serre

L'ablation de l'apex racinaire a pour effet de supprimer la dominance liée à la présence de l'apex racinaire et d'augmenter le nombre de racines latérales ; en effet de nombreuses ramifications latérales se développent à la place du pivot principal.

La biomasse sèche des racines n'est cependant pas significativement différente au seuil de 5% de celle obtenue avec les plants dont les racines sont intactes (tabl.N°64).

L'analyse de variance des mesures d'ARA et de la quantification par azote total de la plante ne montrent pas de différence significative entre les deux traitements seul l'ARA est significativement différente au seuil de 5%.

De la même manière, le nombre de nodules formés et leur poids sec ne sont pas affectés par l'ablation de l'apex. L'estimation de l'activité nitrogénasique par réduction d'acétylène montre que les plants qui n'ont pas subi d'ablation présentent une activité réductrice d'acétylène plus élevée que les plants ayant subi une ablation (tabl.N°65).

La quantification de l'azote l'estimation de l'azote total par plante, montre une légère diminution de la quantité d'azote fixée lorsqu'on enlève l'apex racinaire.

3-2) Expérience menée en tubes de culture "in vitro"

A) **Efficience nodulaire**

Le tableau N°66 représente l'influence de l'excision de l'apex racinaire sur les paramètres de croissance et d'efficience de la fixation d'azote révèle que l'ablation de la racine avant la culture et l'inoculation n'a pas d'effet significatif sur la croissance en hauteur et les poids sec des nodules des parties aérienne et racinaire. En effet, en nous basant sur l'analyse de variance et la comparaison des moyennes par le test de Fischer, les différences observées entre plants entiers et plants ayant subi une ablation de l'apex racinaire ne sont pas statistiquement significatives. Par contre les deux traitements se différencient par la teneur en azote total par plante.

B) **Cinétique de la formation des nodules "in vitro"**

Tabl N° 64: Influence de l'ablation de l'apex racinaire sur la croissance de plants d'*A. albida* inoculés : la souche 47.6.4 après 12 semaines de culture. L'excision de l'apex survient 3 jours après la germination au moment de la mise en place des semis en pots.

Traitements	Hauteur totale (cm)	Poids Sec nodules (mg)	Poids Sec Part aeriene (mg)	Poids Sec Part racinaire (mg)	Azote total par plant (mg)
Apex entier	20.55 a	235.5 a	194.5 a	14.36 a	9.6 a
Apex coupé	26.18 a	216.47 a	165.62 a	14.7 a	6.93 a
Témoin NI	15,8 b	147,8 b	72,7	0	0

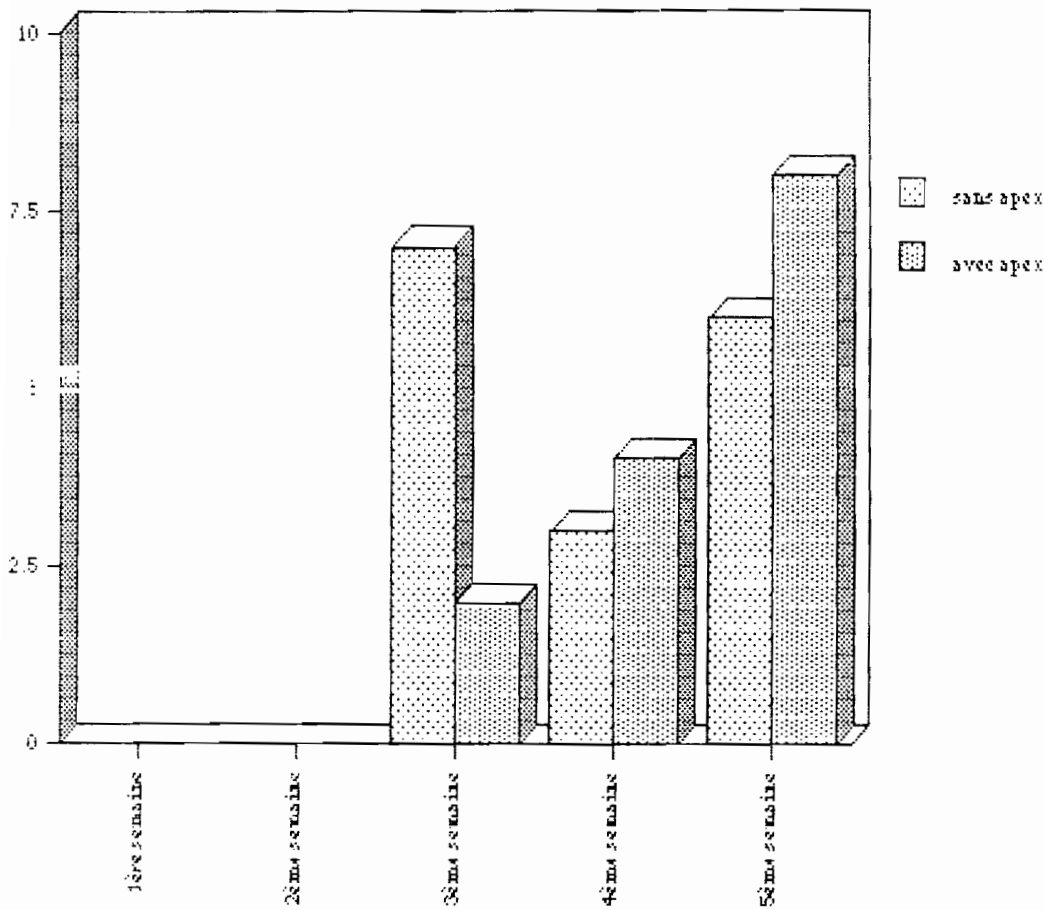
Tabl N° 65: Influence de l'ablation de l'apex racinaire sur l'azote fixé et sur l'azote contenu dans les différentes parties de plants d'*A. albida* inoculés avec la souche 47.6.4 après 12 semaines de culture. L'excision de l'apex survient 3 jours après la germination au moment de la mise en place des semis en pots.

Traitements	ARA ($\mu\text{M}/\text{h}/\text{plant}$)	SARA $\mu\text{M}/\text{h}/\text{mg}/\text{plant}$	Azote Partie aeriene (mg)	Azote Partie racine (mg)	Azote nodules (mg)	Azote Total (mg)
Apex entier	514.9 a	71.45 a	6.04 a	2.45 a	0,415 a	8,905 a
Apex coupé	312.2 b	50.61 b	5.6 a	3.05 a	0,297 a	8,947 a
Témoin non inoc	0	0	3,23 b	1,47 b	0	4,7 b

Tabl N° 66: Influence de l'ablation de l'apex racinaire sur la croissance la biomasse et sur la quantité d'azote total par plant chez *A. albida* inoculé avec la souche 47.6.4 après 3 mois de culture "in vitro"

Traitements	haut tot (cm)	Poids Sec nodules (mg)	Poids Sec Partie aeriene (mg)	Poids Sec Partie racinaire (mg)	Azote total par plant (mg)
ablation apex	14,77 a	4,33 a	90,8 a	18,19 b	3,36 b
apex intact	15,2 a	4,12 a	116,6 a	22,9 a	5,85 a
Témoin N Inoc	8,4 b	0	64,89 b	17,5 b	2,7 b

139: Cinétique de la formation des nodules d'*A. sativae* en tube en fonction de l'ablation ou non de l'apex au cours de 3 périodes suivant l'inoculation. L'excision de l'apex et l'inoculation avec la souche 47.6.4 ont lieu au moment de la mise en place des plants en tube (T0)



Avec l'ablation de l'apex racinaire (fig N° 39), les nodules se forment sur les racines latérales nouvellement mises en place (Pl 23 Fig A) durant la première semaine ; leur apparition subit un ralentissement au cours de la deuxième semaine puis reprend au cours de la dernière quinzaine. A l'inverse des plants n'ayant pas subi d'ablation, le nombre de nodules formés est croissant avec le temps.

3-3) Discussion

La question que nous sommes posés en mettant en place ce dispositif expérimental est la suivante : le nombre de nodules peut-il être modifié par le nombre de racines latérales ?

Chez *A. albida* le système racinaire est souvent pivotant avec une racine principale très longue et seulement quelques racines secondaires. En décapitant l'apex racinaire, avant la transplantation en pot (3 jours après la germination), nous avons cherché à déterminer l'influence de la morphologie du système racinaire (un seul pivot ou bien plusieurs racines latérales) sur l'aptitude des plants à noduler et à fixer l'azote.

Certains auteurs se sont particulièrement intéressés à la morphologie du système racinaire d'*A. albida*.

Alexandre et Ouedraogo (1992) ont montré que *A. albida* présente une plasticité morphogénétique au niveau de son système racinaire qui se développe en un pivot puissant sur sols sableux où la nappe est très profonde et qui peut avoir une configuration superficielle et tracante occupant les 20 premiers cm du sol lorsque le sol est hydromorphe.

Selon Alexandre et Ouédraogo l'effet améliorant de l'espèce serait limité lorsque les conditions de sols sont défavorables à un type d'enracinement pivotant.

Des manipulations en serre par ablation de l'apex racinaire pour éviter l'enroulement du pivot principal après 3 mois de culture se sont révélées défavorables à la croissance de la plante (Cazet, 1987) ; en effet à la suite de l'ablation de l'apex racinaire, il s'ensuit une faible émission de racines latérales et une moins bonne absorption d'eau et d'éléments nutritifs et par conséquent une croissance réduite.

A l'opposé Louppe et Ouédraogo, 1992 ont montré que l'ablation de l'apex racinaire par dessèchement aérien, favorise la formation de nombreuses racines secondaires fines (51% de plus par rapport au témoin n'ayant pas subi d'ablation de l'apex) et la formation de nodules (28%). La croissance de la partie aérienne n'est pas affectée par l'ablation de l'apex racinaire.

Nous avons constaté au cours de notre expérience que le nombre de nodules formés ne varie pas si on augmente artificiellement le nombre de sites potentiels de nodulation.

Libbenga et Bogers, (1974), en confirmant la relation physiologique entre les nodules et les racines latérales, avaient montré que les nodules des légumineuses se forment essentiellement au niveau des zones possédant des poils absorbants en élévation et fréquemment à l'aisselle des racines latérales; ainsi, l'excision de la racine principale favorise aussi bien la nodulation que le nombre de racines latérales. Ils ont par conséquent déduit de ces observations que les nodules apparaissent au niveau de points récents d'activité méristématique en particulier au niveau de point d'émergence de racines latérales.

Il apparaît ici que la manipulation du système racinaire bien qu'elle agisse sur la suppression de la dominance apicale en augmentant le nombre de ramifications latérales, n'augmente ni le nombre de sites d'infection ni la biomasse racinaire ni la quantité d'azote totale contenue dans les tissus de la plante. Comme cela a été montré par Vasse et Truchet 1993, il est ainsi permis de penser que la plante régule elle-même la quantité de nodules formés en fonction de ses besoins propres.

4) INFLUENCE DES RÉSERVES COTYLÉDONAIRES SUR LA CROISSANCE ET LA FIXATION D'AZOTE

Nous avons cherché à savoir si, d'une part les cotylédons et d'autre part l'addition d'azote starter étaient indispensables à la croissance initiale des plantes inoculées et par conséquent si les réserves azotées cotylédonaires pouvaient jouer un rôle d'azote starter pour la plante.

4-1 Paramètres de croissance

Les plants ont été cultivés sur un substrat synthétique formé d'un mélange de perlite et de vermiculite ; la solution d'arrosage (Jensen) est diluée au 1/4 est dépourvu d'azote. Les résultats obtenus (Tabl. N°67) nous ont permis de constater une nette supériorité des plants inoculés par rapport aux plants non inoculés ainsi que l'effet favorable de l'inoculation sur le développement du système racinaire qui présente une importante biomasse et une bonne nodulation chez les plants inoculés.

Le rapport partie aérienne sur partie racinaire est équilibré pour les plants inoculés (0.9 à 1) alors que l'absence d'inoculation déséquilibre ce rapport au détriment des parties racinaires (3.2).

L'ablation totale ou partielle des cotylédons affecte de manière sensible la croissance en hauteur des plants avec 26,5 cm pour les plants entiers et seulement 16,3 cm pour ceux qui ont subi une ablation (fig N° 40).

Fig N°40 : Influence de l'ablation totale ou partielle des cotylédons sur la croissance en hauteur de plants d'*A. albida* cultivés en serre avec la souche 47.6.4 après 15 semaines de culture.

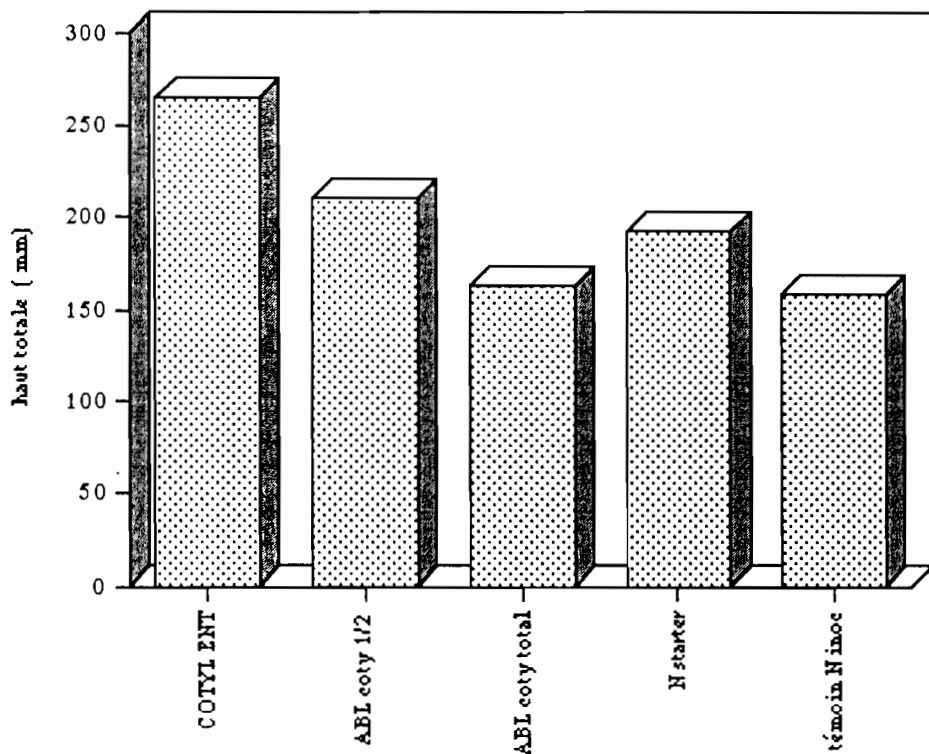
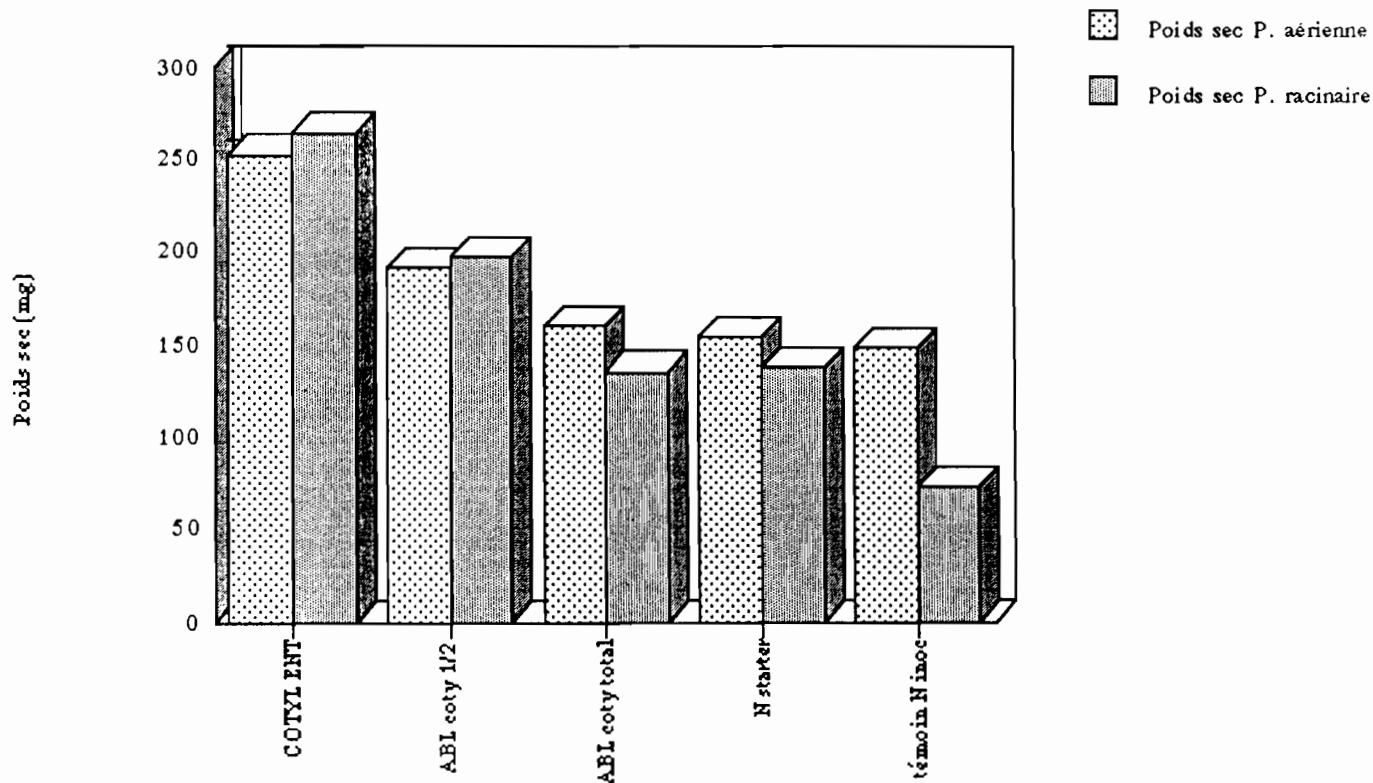


Fig N°41 : Influence de l'ablation totale ou partielle des cotylédons sur la biomasse de plants d'*A. albida* cultivés en serre avec la souche 47.6.4 après 15 semaines de culture.



Tabl N° 67 : Influence de l'ablation des cotylédons d'*A. albida* et de l'addition d'azote starter sur la biomasse produite au niveau des différentes parties de plants d'*A. albida* inoculés avec la souche 47.6.4 après 15 semaines de culture.

Traitements	Hauteur Tot (cm)	Pds sec Partie Aérienne (mg)	Poids sec Partie rac.(mg)	Poids sec nodules (mg)	Ratio PA/PR
cotyl entiers	26,5 a	252 a	263,9 a	11,9 a	0,9
coty 1/2	21,1 a	190,9 b	197,5 b	7,9 b	0,96
sans cotyl	16,3 b	159,2 b	135 b	4,8 c	1,17
Azote starter	19,33 b	153,4 b	136,6 b	6,12 b	1,12
Témoin Non Inoculé	15,8 b	147,8 b	72,7 c	0	3,2

Tabl N° 68 : Influence de l'ablation des cotyledons et de l'addition d'azote starter sur la teneur en azote total des différentes parties de plants d'*A. albida* inoculés avec la souche 47.6.4 après 15 semaines de culture.

traitements	ARA(nMole/h/pl)	SARA(nMole/h/mg /pl)	Azote Partie aer.(mg)	Azote Partie rac.(mg)	Azote nodule (mg)	Azote tot / plant (mg)
cotyléd entiers	426 a	39,8 b	6,04 a	4,62 a	0,512	11,17
coty 1/2	263,3 b	32,4 b	3,34 b	3,35 b	0,351	7,05
sans cotyl	286 b	66,19 a	4,7 a	2,7 b	0,1708	7,57
Azote starter	394 a	64,13 a	4,4 a	2,45 b	0,46	7,31
témoin Non Inoculé	0	0	3,23 b	1,47 c	0	4,7 c

De même par rapport à la productivité en biomasse déterminée par les poids secs des parties aériennes et racinaires, les cotylédons semblent indispensables à un bon développement (fig N° 41). En effet, l'excision des cotylédons affecte la croissance des tiges et des racines, la chute de la biomasse racinaire et aérienne est respectivement de 24.6 et de 36.9 % pour une ablation partielle et une ablation totale.

Nous avons pu constater que la présence des cotylédons exerce une influence directe sur la formation des nodules puisque leur poids sec diminue de façon sensible avec l'ablation des cotylédons.

Un apport d'une quantité relativement faible d'azote 7 jours après l'inoculation aux plants entiers ayant conservé leurs cotylédons, n'améliore pas les paramètres de croissance par rapport au traitement où les cotylédons sont intacts mais qui n'ont pas reçu d'engrais azoté. On note un effet dépressif sur les paramètres de croissance en hauteur et sur les paramètres de biomasse végétale (poids sec des parties aériennes et des racines).

4-2) Quantité d'azote fixée

Les valeurs d'activité réductrice d'Acétylène (fig N° 42) sont significativement plus élevées en présence des plants entiers n'ayant pas subi d'ablation des cotylédons (Tabl.N° 8).

L'ARA spécifique (SARA) qui détermine la quantité d'azote fixée par mg de nodule sec donc la valeur de l'ARA rapportée au poids sec des nodules formés, est beaucoup plus élevée chez les plants ayant subi une ablation totale des cotylédons (66,19) que chez les plants entiers (39,8) et les plants ayant subi une ablation partielle (32,4).

4-3) Azote total

Si la méthode par réduction d'Acétylène constitue un bon outil de comparaison du pouvoir fixateur des différents traitements, le dosage de la quantité d'azote contenue à l'intérieur des tissus est un critère de choix pour compléter la mesure de l'efficacité de la fixation. Les paramètres tels que le poids sec des racines, l'azote des racines et l'azote total par plant discriminent bien les différents traitements entre eux (fig N° 43).

Les plants entiers présentent une biomasse racinaire importante, une bonne nodulation, et une teneur en azote des racines élevée (4.62 mg). Le témoin entier mais non inoculé présente une teneur en azote total de 4.7 mg /plant ; le milieu d'arrosage étant totalement dépourvu d'azote ainsi que le substrat de culture, cette quantité d'azote dosée

Fig N°42 : Influence de l'ablation totale ou partielle des cotylédons sur la quantité d'azote fixé (ARA) de plants d'*A. alba* inoculés en serre avec la souche 47.6.4 après 15 semaines de culture.

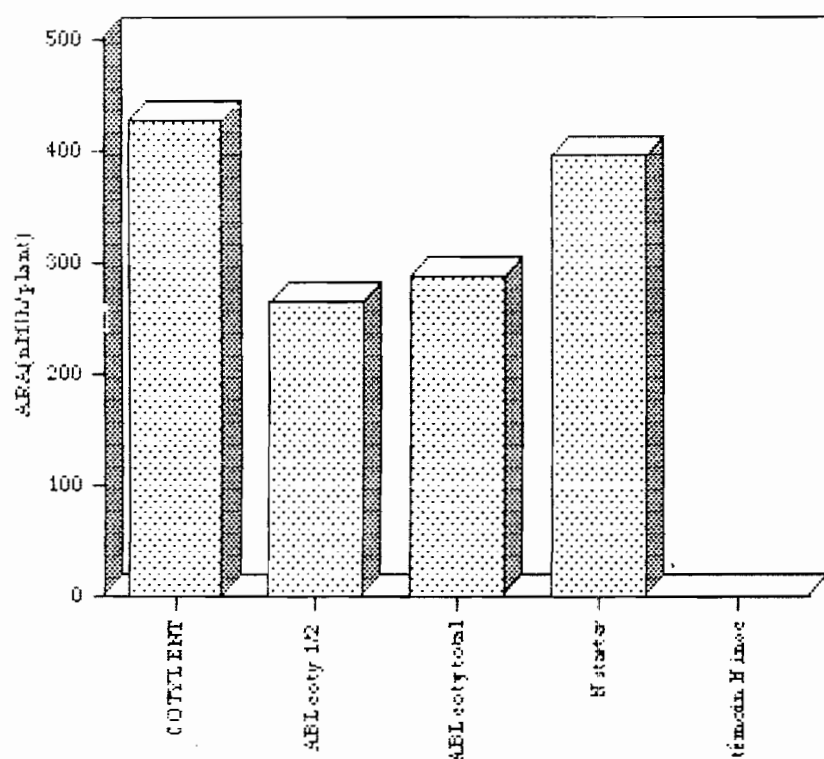
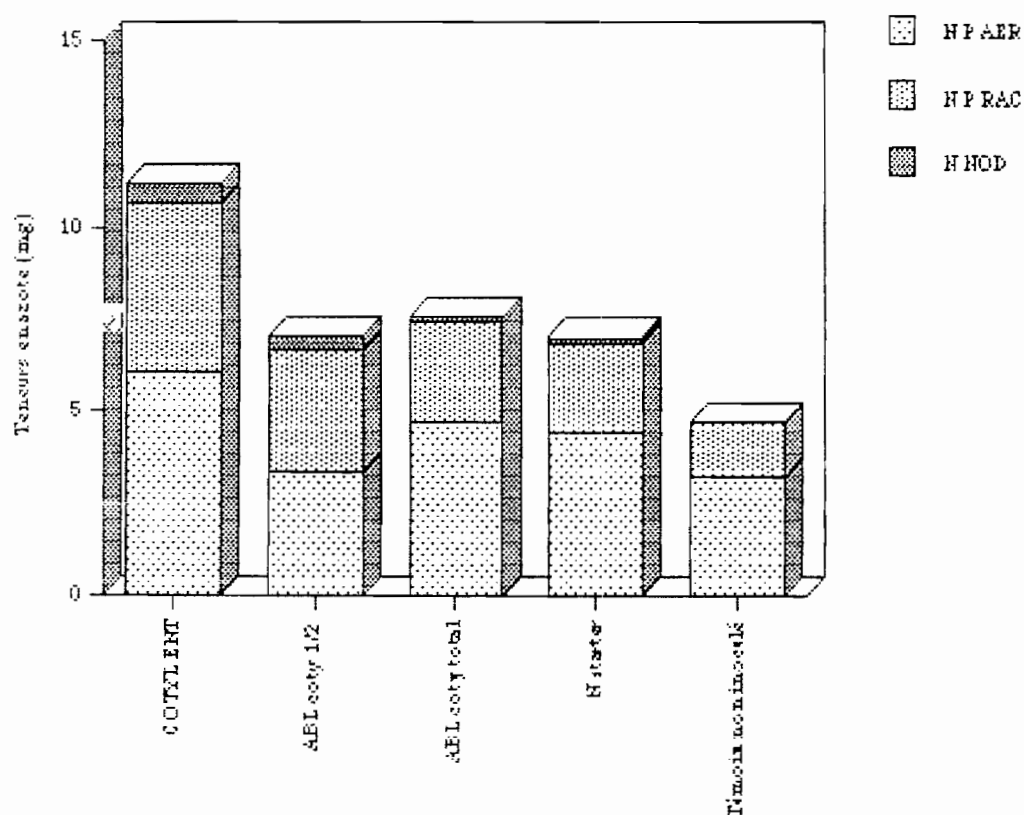


Fig N° 43: Influence de l'ablation totale ou partielle des cotylédons sur la quantité d'azote fixé totale de plants d'*A. alba* inoculés en serre avec la souche 47.6.4 après 15 semaines de culture.



Tabl. N° 69 :Matrice de corrélation des paramètres mesurés concernant l'influence de l'ablation totale o partielle des cotylédons de plants d'*A. albida* inoculés en serre avec la souche 47.6.4 après 15 semaine de culture.

Matrice de corrélation pour les variables : X₁ ... X₁₀

	haut tot	PS PA	PS Pr	PS nod	ARA	SARA	AZ PA	AZ PR
haut tot	1							
PS PA	,95	1						
PS Pr	,95	,95	1					
PS nod	,93	,88	,98	1				
ARA	,69	,56	,74	,86	1			
SARA	,1	6,61E-4	,25	,42	,78	1		
AZ PA	,67	,7	,68	,72	,77	,51	1	
AZ PR	,93	,94	,99	,98	,77	,31	,76	1
AZ nod	,94	,94	1	,97	,72	,23	,64	,99
AZ tot	,87	,9	,92	,92	,8	,4	,91	,96

*Ht= hauteur totale (mm)

*PSPA = Poids sec des parties aériennes (mg)

*PS PA = Poids sec des parties racinaires

*PS nod= Poids sec des nodules (mg)

*ARA = Activité réductrice d'Acétylène (nM/h/plant)

*SARA= Activité réductrice d'Acétylène spécifique (nM/h/mg de nodule sec)

*AZ PA= Azote des parties aériennes (mg)

* AZ PR= azote des parties racinaires (mg)

*AZ nod= Azote des nodules (mg) AZ total = azote PA+AZ PR +AZ nod (mg)

vient essentiellement des cotylédons. Sur les plants entiers inoculés, le dosage de l'azote ne des valeurs de 11,17 mg d'azote total / plant ; la différence entre plants inoculés et ts non inoculés liée à la fixation d'azote est de 6,47 mg .

Si on compare les valeurs obtenues pour les plants inoculés entiers (11,17 mg) et plants inoculés mais totalement dépourvus de cotylédons (7,57 mg), on constate que la érence due à la présence des cotyledons est de 3.6 mg ; on retrouve une valeur tres che (4.7 mg) en présence du temoin entier non inoculé.

L'apport d'azote provenant de la fixation et à celui contenu dans les nodules est ici de .7 mg alors que l'azote apporté par les cotylédons est évalué à environ 4.7 mg.

autre part il n'est pas tout à fait exclus que la présence des cotylédons n'exerce pas une luence directe sur la formation et l'efficience des nodules car leur poids sec, l'ARA ninuent de façon sensible en l'absence des cotyledons.

s valeurs obtenues en matière de quantité d'azote total par plante à la suite de l'addition azote starter, ne sont pas significativement différentes de celles obtenues dans le cas d'une lation partielle ou totale des cotylédons ; en effet l'apport d'azote a un effet dépressif et nibiteur sur la nodulation et la quantité d'azote fixée par les plantes.

es paramètres d'azote total et d'azote des différentes parties sont positivement corrélés avec eux des biomasses aérienne, racinaire et nodulaire ; à l'inverse les valeurs d'ARA et de ARA ne sont pas significativement corrélées avec celles relatives à la biomasse et à l'azote ontenu dans les tissus de la plante (Tabl.N°69).

4-4) Discussions

A) Influence des cotylédons

L'inoculation favorise un rapport partie aérienne / partie racinaire très équilibré lors que l'absence d'inoculation déséquilibre ce rapport au détriment du système racinaire.

L'inoculation, en créant un environnement favorable au système racinaire induit une éponse positive se traduisant par une augmentation de la biomasse racinaire.

On pourrait voir là un effet adaptatif de *A. albida* à un environnement sahélien très sec au sol appauvri (Duhoux et Dommergues, 1988) ; la survie de l'espèce dans ces conditions dépend principalement de sa capacité à mettre en place et à développer un système racinaire suffisamment important et puissant qui lui permet d'aller puiser les éléments nutritifs (eau, hydrates de carbone, éléments minéraux) là où ils se trouvent (Dreyfus et Dommergues, 1988; Alexandre et Ouédraogo, 1992)). C'est ce qui explique que très souvent lorsque *A. albida* s'implante, il développe en priorité son système racinaire.

Très peu de travaux ont été réalisés sur le rôle que joueraient les cotylédons en tant qu'organes de réserves azotées. On peut citer les travaux de Matthews et al., (1987) effectués sur des mutants non nodulants de soja qui ont montré que l'ablation totale des cotylédons ne permet pas de lever l'inhibition. Chez *A. senegal*, (Badji, 1986), en comparant la teneur en azote des parties aériennes des plants inoculés et celle des plants non inoculés et qui n'ont pas reçu d'apport exogène d'azote, il apparaît que 56% de l'azote contenu dans les tissus aériens proviennent des cotylédons.

Les observations effectuées à partir de nos expériences nous amènent à constater que les cotylédons chez *A. albida* agissent doublement :

- directement sur la croissance par la mobilisation des substances de réserves et la mise en place des structures et organes végétatifs (Matthews et al., 1987).

Les cotylédons d'*A. albida* contiennent une forte proportion d'azote (4,5%) ce qui constitue un des taux les plus élevés par rapport aux autres espèces telles que *A. nilotica*, *A. sieberiana* et *A. tortilis* (Reed et al., 1992). Les cotylédons assurent la nutrition azotée pendant les 3 à 4 premières semaines de croissance de la plante ; en effet nous avons constaté qu'à partir de la 4^{ème} semaine, les cotylédons deviennent plats et minces, jaunissent, s'enroulent sur eux-mêmes et finissent par se détacher et tomber. La quantité de substances de réserves, contenues dans les tissus cotylédonaires et libérées à la germination et au cours des premières étapes du développement de la plante, est suffisante pour assurer à celle-ci une croissance optimale.

La mobilisation des réserves cotylédonaires est aussi sous le contrôle des gibbérellines qui en activant certaines enzymes, des hydrolases, amylases, β - Glucanase, Phosphatase-acide, ribonucléase etc..., synthétisent des produits qui migrent vers l'embryon et plus tard vers la plantule où ils seront utilisés pour l'édification des structures et la satisfaction des besoins énergétiques (Heller, 1991).

Il apparaît ainsi que chez *Acacia albida*, les cotylédons jouent un rôle essentiel dans le développement de la plante au cours des premiers stades de croissance. Ils agissent aussi bien sur le développement de la partie aérienne, du système racinaire que des nodules.

La bonne croissance des plants n'ayant pas subi d'ablation est liée principalement à la présence des cotylédons ; à l'inverse l'absence de cotylédons entraîne une mauvaise croissance des plants.

- indirectement en stimulant probablement grâce aux phytohormones synthétisées ou accumulées (Torrey, 1986; Hirsch, 1992), la nodulation et par là l'accumulation d'azote dans les tissus de la plante. Les cotylédons influent sur la nodulation puisque le poids sec de nodules diminue à la suite de l'ablation. Cette influence se traduit ici par des valeurs de l'ARA plus élevées lorsque les cotylédons sont intacts.

On peut noter une interaction très nette entre cotylédons, nodulation et la croissance lorsqu'on considère la biomasse (Poids sec parties aérienne, Poids sec des parties racinaires), l'ARA et l'azote total par plant.

B) Influence de l'addition d'azote starter

De faibles quantités d'azote utilisé comme azote starter (Rigaud, 1981) sont souvent apportées afin de satisfaire les besoins en matière azotée durant la période où les réserves cotylédonaires sont déjà utilisées et la fixation d'azote n'est pas encore effective ; en effet durant cette phase de durée variable, le développement de la plante est tributaire de la disponibilité en éléments minéraux fondamentaux en particulier l'azote; les nodules en phase de croissance ne sont pas encore suffisamment effectifs pour apporter à la plante tout l'azote dont elle a besoin; d'autre part les sols étant en général carencés en azote, l'addition d'une faible quantité d'azote est souvent nécessaire pour permettre à la plante de surmonter cette phase critique.

Chez *Leucaena leucocephala*, l'addition d'azote starter est indispensable à une bonne croissance et une bonne fixation (Sanginga et al., 1988).

L'addition de sulfate d'ammonium chez des plants d'*A. albida*, une semaine après l'inoculation, à la dose de 1,3 mM/l, n'améliore pas les paramètres de croissance par rapport au traitement avec cotylédons et sans azote starter ; on note un effet dépressif sur les facteurs de croissance et de biomasse . Les valeurs obtenues en matière d'azote total des plantes à la suite de l'addition d'azote ne sont pas significativement différentes de celles qu'on obtient à la suite d'une ablation partielle des cotylédons ; en fait l'apport d'azote a un effet inhibiteur sur la nodulation et la quantité d'azote fixée.

Notre expérience arrêtée au bout de 14 semaines, a montré que les réserves cotylédonaires sont suffisantes jusqu'à cette période pour assurer une bonne croissance des plants d'*A. albida* et que l'azote starter apporté une semaine après l'inoculation n'est pas nécessaire à la croissance et induit un effet dépressif sur la fixation d'azote.

5) ETUDE DES PREMIERS STADES DE L'INFECTION RACINAIRE PAR BRADYRHIZOBIUM SP. CHEZ A. ALBIDA

Nous avons effectué des observations sur une vingtaine de fragments de racines d'*A. albida* 10 jours après l'inoculation avec une souche de *Bradyrhizobium* 47.6.4 ; après éclaircissement à l'hypochlorite de sodium et coloration au bleu de méthylène (Truchet et al.1989), les observations au microscope en contraste de phase nous ont permis de visualiser les tout premiers stades de l'infection.

La présence de la bactérie induit une réaction typique d'enroulement en crosse dite "de Shephard" d'un poil absorbant très court (Pl. N°24 fig A).

Le nombre de poils infectés est très faible par rapport au nombre total de poils absorbants formés sur la racine ce qui limite leur observation; on discerne facilement les autres poils absorbants non déformés qui sont en doigt de gant et surtout colorés en rose alors que les poils déformés sont colorés par le bleu de méthylène en raison de la présence d'un cordon d'infection .

Au centre du poil, dans la région interne de la courbure, on distingue un point plus coloré que le reste, qui détermine le point d'entrée de la bactérie. Le cordon d'infection qui est coloré en bleu se déplace verticalement vers la base du poil, au niveau de la cellule corticale adjacente au poil ; puis il s'oriente horizontalement parallèlement au grand axe des cellules parenchymateuses corticales (Pl. N°24 fig B).

A quelque distance du poil infecté, se forme un primordium nodulaire (Pl. N°25 Fig B) : des cellules situées tout contre les cellules adjacentes aux vaisseaux conducteurs au sein du cortex interne, entrent en division active pour donner un amas de cellules de petite taille en forme de dôme qui évoluent plus tard vers un nodule méristématique. Le cordon d'infection continue sa migration en direction du méristème nodulaire (Pl. N°25 fig A et B) qu'il envahira plus tard en déversant son contenu à l'intérieur des cellules nouvellement formées.

Sous la loupe, il est possible d'observer l'émergence du nodule qui se fait au dépens des tissus du cortex après fissuration de l'épiderme supérieur (Pl 26 Fig A) . Ici on peut noter l'émergence de trois massifs méristématiques.

Sur les jeunes nodules, (agés d'une vingtaine de jours) nous avons observé une structure nodulaire sphérique (Pl 26 Fig B) constituée d'une zone périphérique parenchymateuse contenant les vaisseaux conducteurs, d'un cortex avec des cellules vacuolisées et d'un tissu central constitué de petites cellules uninuclées envahies par les rhizobium à côté de cellules non envahies : les cellules interstitielles (Pl 28 Fig A et B).

Cette morphologie et structure sont caractéristiques de nodules de type déterminé tel qu'on l'observe chez le soja (Newcomb ,1981).

Cette morphologie et structure sont caractéristiques de nodules de type déterminé tel qu'on l'observe chez le soja (Newcomb, 1981).

Lorsque le nodule devient âgé (1 à 2 mois), il s'allonge et se ramifie très souvent (Pl 26 Fig B). La persistance de nombreux pôles méristématiques favorise une activité continue et par la suite des divisions successives, de nouveaux lobes apparaissent; ce qui donne la morphologie allongée et multilobée des nodules d'*A. albida* (Pl 27 Fig A, B et C).

Sur ces nodules plus âgés, la structure se modifie, le nodule de forme sphérique devient plus allongé et présente plusieurs lobes qui représentent chacun un pôle méristématique. Les cellules infectées se situent au centre du nodule, en face de ces pôles méristématiques (Pl 28 Fig C).

DISCUSSIONS

L'interaction entre la bactérie et les tissus racinaires de la plante aboutit à la formation d'un nodule. Chez *A. albida*, la première réaction visible de reconnaissance entre la souche et la plante est la déformation en crosse d'un poil absorbant très court; par cette voie, la bactérie est emprisonnée dans une boucle et pénètre la cellule du poil après invagination de la membrane plasmique du poil.

L'invasion et l'infection par poils absorbants concerne un nombre très faible de poils (sur 20 000 poils seuls 2,8% se trouvent être infectés par chez le pois (Herack, 1964); il n'est pas étonnant que les études structurales après fixation et inclusion, ne puissent pas toujours révéler le début de l'invasion. La plupart des études menées dans ce sens utilisent le microscope à contraste de phase qui permet d'observer les poils absorbants infectés et colorés de manière spécifique (Dart, 1977; Newcomb, 1981), car la probabilité pour que la coupe passe au niveau d'un poil absorbant infecté dans un angle de coupe permettant de l'identifier de manière certaine est certainement faible.

Il est à noter que chez *A. albida* aussi (Dupuy, 1993), les poils absorbants infectés sont très peu nombreux, raison probable du faible nombre de nodules observés chez cette espèce par rapport aux autres espèces de légumineuses.

Normalement un poil absorbant est généralement rectiligne et possède une forme en doigt de gant; l'inoculation avec une culture pure de *Rhizobium* produit une déformation et un enroulement en crosse.

Ce modèle d'infection, où le développement du nodule débute avec l'invasion d'un poil racinaire par le *Rhizobium*, est assez courant et se rencontre chez de nombreuses espèces de légumineuses tropicales comme tempérées.

La crosse de Shephard est caractéristique de la plupart des légumineuses tempérées (Dart, 1974; Callaghan et Torrey, 1980; Bauer, 1981) et de certaines légumineuses tropicales telles que le soja (Turgeon et Bauer 1985; Newcomb et al., 1979;) le *Leucaena*

leucocephala (Chen et Rolfe, 1988) l'*Acacia senegal* (Badji, 1991) et *Acacia mangium* (Prin et Reddell, 1994).

Un important travail de cytologie a été effectué par Dupuy (1993) afin d'élucider le processus de l'infection ainsi que la morphogénèse du nodule chez *A. albida* ; en effet l'auteur a identifié, à partir de coupes de racines d'*A. albida*, des Rhizobium enchassés dans un cordon d'infection et se développant dans des poches intercellulaires au niveau de l'assise corticale. Ces cellules corticales ont un aspect hypertrophié et possèdent une base élargie en une sorte d'ampoule ; le point de contact d'une cellule corticale hypertrophiée avec la cellule épidermique adjacente délimite un espace ou une poche au niveau de laquelle les bactéries sont emprisonnées par le cordon d'infection.

Le cordon est initié au niveau de cette cellule corticale hypertrophiée, progresse vers la base du poil absorbant en empruntant les ponts cytoplasmiques (Dupuy 1993).

Pour notre part, les racines d'*A. albida* inoculées que nous avons observées montrent nettement le poil absorbant très court enroulé en crosse. Comme cela a été démontré chez *A. senegal* et *Leucaena leucocephala*, la présence de la souche de Rhizobium induit une réaction de déformation et d'enroulement du poil typique. C'est au centre de la courbure au niveau d'un point réfringent que se trouvent enfermées les bactéries. La fonction biologique essentielle de l'enroulement du poil absorbant réside dans l'enchassement et le confinement des Rhizobia dans cette poche située entre les parois de la cellule du poil (Bauer, 1985).

S'agirait-il de deux processus d'infection différents mis en place par l'espèce, le premier étant de nature intercellulaire alors que le second serait intra-cellulaire ?

A notre avis, ces observations à partir de coupes réalisées sur les racines infectées, bien qu'elles n'excluent pas le rôle initiateur joué par la cellule du poil absorbant dans les premières étapes de l'infection, n'ont pas montré une étape primordiale qui est l'étape de déformation du poil absorbant et l'initiation du cordon d'infection. Nous pensons que *A. albida* ne se différencie pas de la plupart des légumineuses tropicales appartenant au groupe des Mimosacées telles que *A. senegal*, *A. mangium* et *Leucaena leucocephala*, chez lesquelles espèces la voie intra-cellulaire classique demeure le mode privilégié de pénétration des Rhizobium.

Nous avons aussi montré que la présence du cordon d'infection induit à distance la formation d'un primordium nodulaire au niveau du cortex interne racinaire.

Ici l'initiation des mitoses s'effectue à partir de cellules du cortex interne au niveau de la deuxième assise de cellules du parenchyme cortical adjacente au tissu conducteur. Comme c'est le cas chez la plupart des espèces de légumineuses tempérées infectées par voie intra-cellulaire au niveau du poil absorbant, (Denarié et al., 1992; Newcomb et al., 1979; Truchet et al., 1978) et certaines légumineuses tropicales (Sprent et de Faria, 1988; Vasse et

et al.,1978) et certaines légumineuses tropicales (Sprent et de Faria, 1988; Vasse et Truchet, 1989), le méristème nodulaire est initié à partir du cortex interne comme chez *Sesbania rostrata* (N'Doye et al., 1994).

Le jeune nodule d'*A. albida* présente une structure type de nodule à croissance déterminée telle qu'on la retrouve chez la plupart des espèces tropicales (*Glycine max*, Newcomb et al., 1979) qui à la suite d'une infection via les poils absorbants, forment des nodules sphériques ayant une activité méristématique limitée dans le temps et dissociée de la fonction de fixation.

En effet, comme l'a montré Dupuy, (1994) chez *A. albida*, les jeunes nodules, âgés d'une vingtaine de jours présentent une structure sphérique constituée d'une zone périphérique parenchymateuse, d'un cortex avec des cellules vacuolisées et d'un tissu central constitué d'un mélange de petites cellules infectées à côté de cellules non infectées : les cellules interstitielles. Lorsque le nodule devient âgé, il se présente sous la forme allongée et multilobée caractéristique du nodule méristématique à croissance indéterminée bien que les coupes ne révèlent pas la zonation classique (zone méristématique, zone d'invasion, zone de fixation et zone sénescence).

Ces deux types morphologiques à des âges différents chez la même espèce, montre que le nodule d'*A. albida* est à croissance mixte, déterminée au jeune âge et indéterminée à l'âge adulte. Cette morphologie mixte a déjà été décrite par Dupuy en observant des nodules d'*A. albida* âgés de 30 jours. Cette structure n'est pas propre à *A. albida* puisque chez *Sesbania rostrata* un phénomène identique (N'Doye et al.,1994) a été observé.

Planche N°24

Premiers stades de l'infection chez *A. albida*

Fig. A : Observation après étalement d'une racine d'*A. albida* infectée par *Bradyrhizobium* ; on observe un poil absorbant très court, enroulé en crosse. Le point sombre (➤) détermine le point d'entrée de la bactérie. Les poils absorbants non infectés sont en doigt de gant et colorés en rose par le bleu de méthylène.
(Pai : Poil absorbant infecté). (Gr. x 20)

Fig. B : Photo de surface d'une racine d'*A. albida* infectée par *Bradyrhizobium* ; détail du poil absorbant infecté (Pai), très court replié sur lui-même et noter les lignes bleues qui matérialisent la migration latérale du cordon d'infection au sein des cellules corticales .(Gr. x 20)

A



B

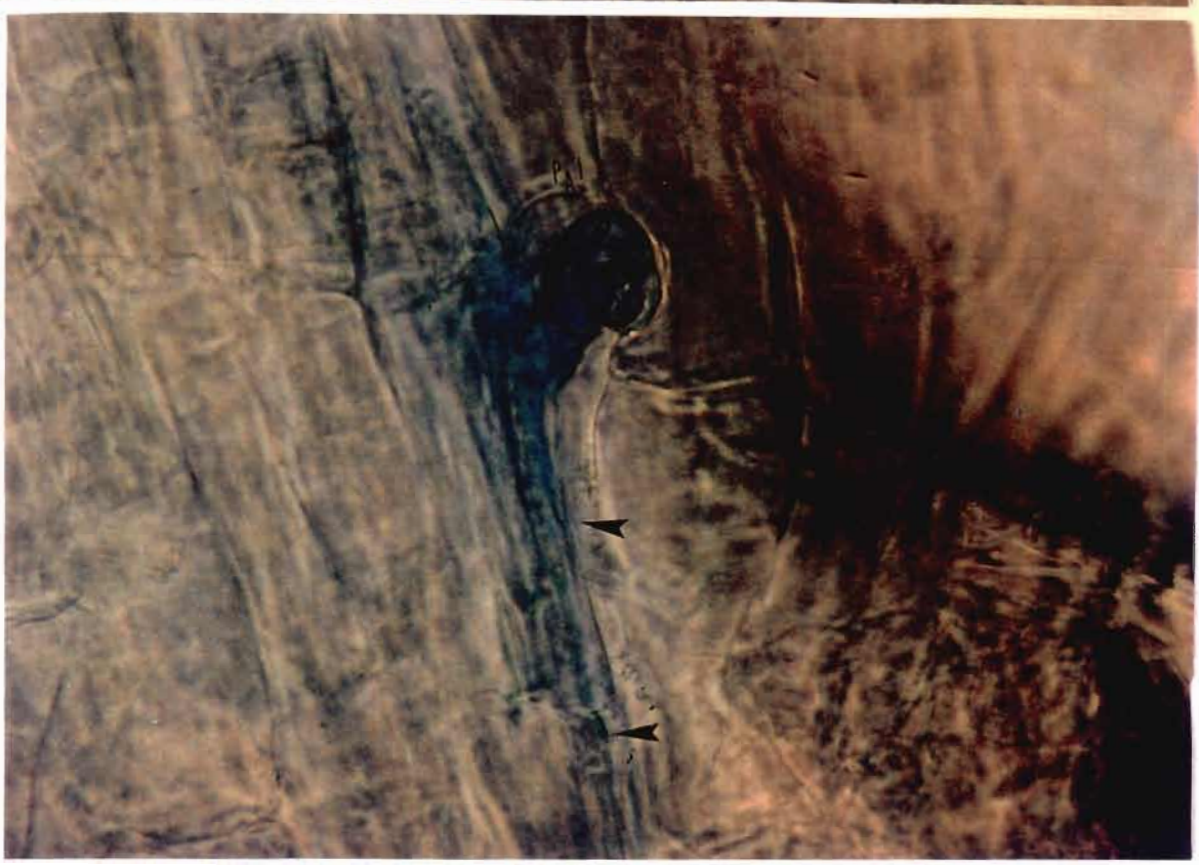


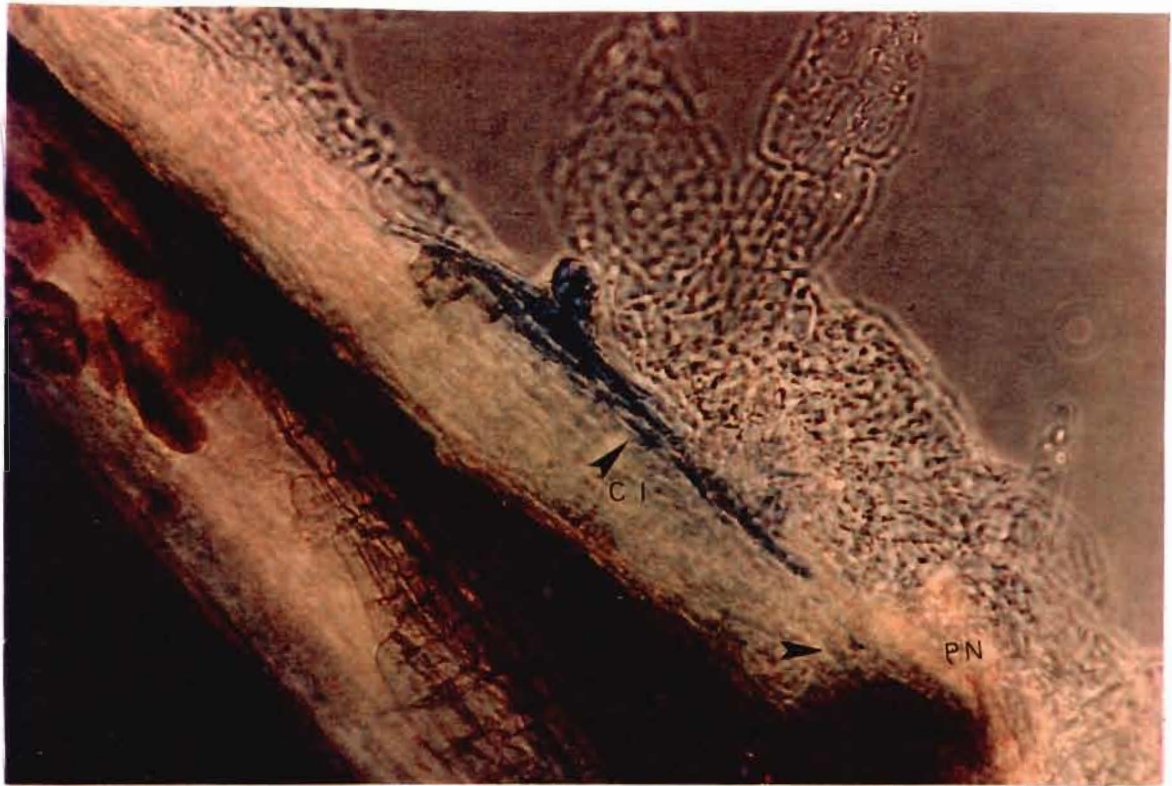
Planche N° 25

Infection chez *A. albida* : premières étapes de la formation du nodule

Fig. A: Le cordon d'infection est coloré en bleu et dichotomisé; il chemine latéralement en direction d'un proméristème nodulaire (PN) qui émerge à partir des tissus du cortex interne (c.i.) (Gr. x 10).

Fig. B : Détail d'un proméristème nodulaire observé sur une racine d'*A. albida* infectée par *Bradyrhizobium* ; les cellules corticales proches des cellules conductrices () se divisent et s'organisent en dôme méristématique (d.m.). (CC : Cellules conductrices; PN: parenchyme cortical; PN : proméristème nodulaire) (Gr. x 20)

A



B

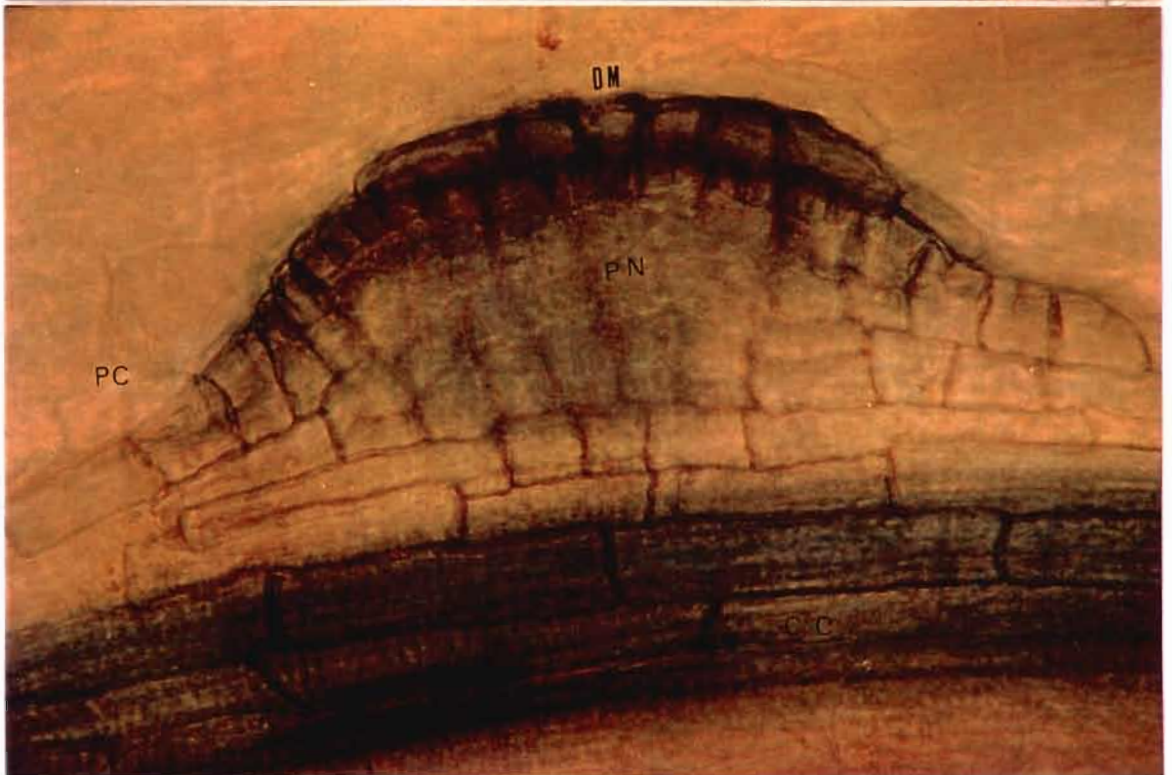


Planche N°26

Morphologie de nodules d'*A. albida*

Fig.A : Début de formation d'un nodule d'*A. albida* ; on note l'émergence de 3 lobes à la suite de la fissuration du rhizoderme , le nodule se développe à partir du tissu cortical (TC) .(Gr. x 20)

Fig.B : Jeune nodule d'*A. albida* agé de 10 à 15 jours ; il est de forme arrondie (Gr. x 10)

Fig. C : Nodule d'*A. albida* à un âge plus avancé (25 à 30 jours) il s'allonge et devient bilobé (Gr. x 20)

A

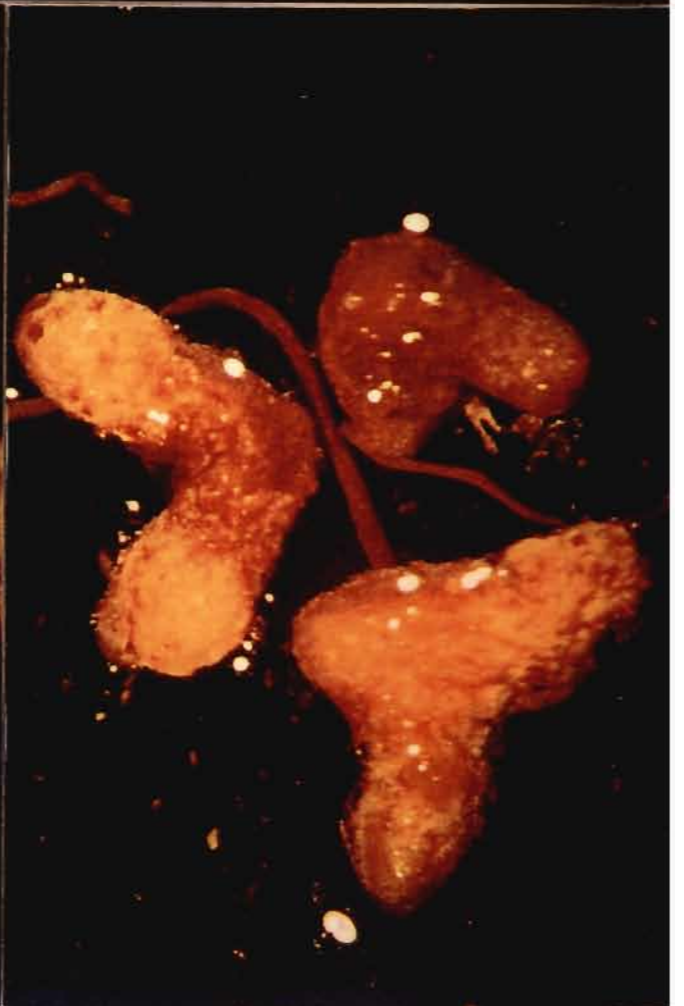
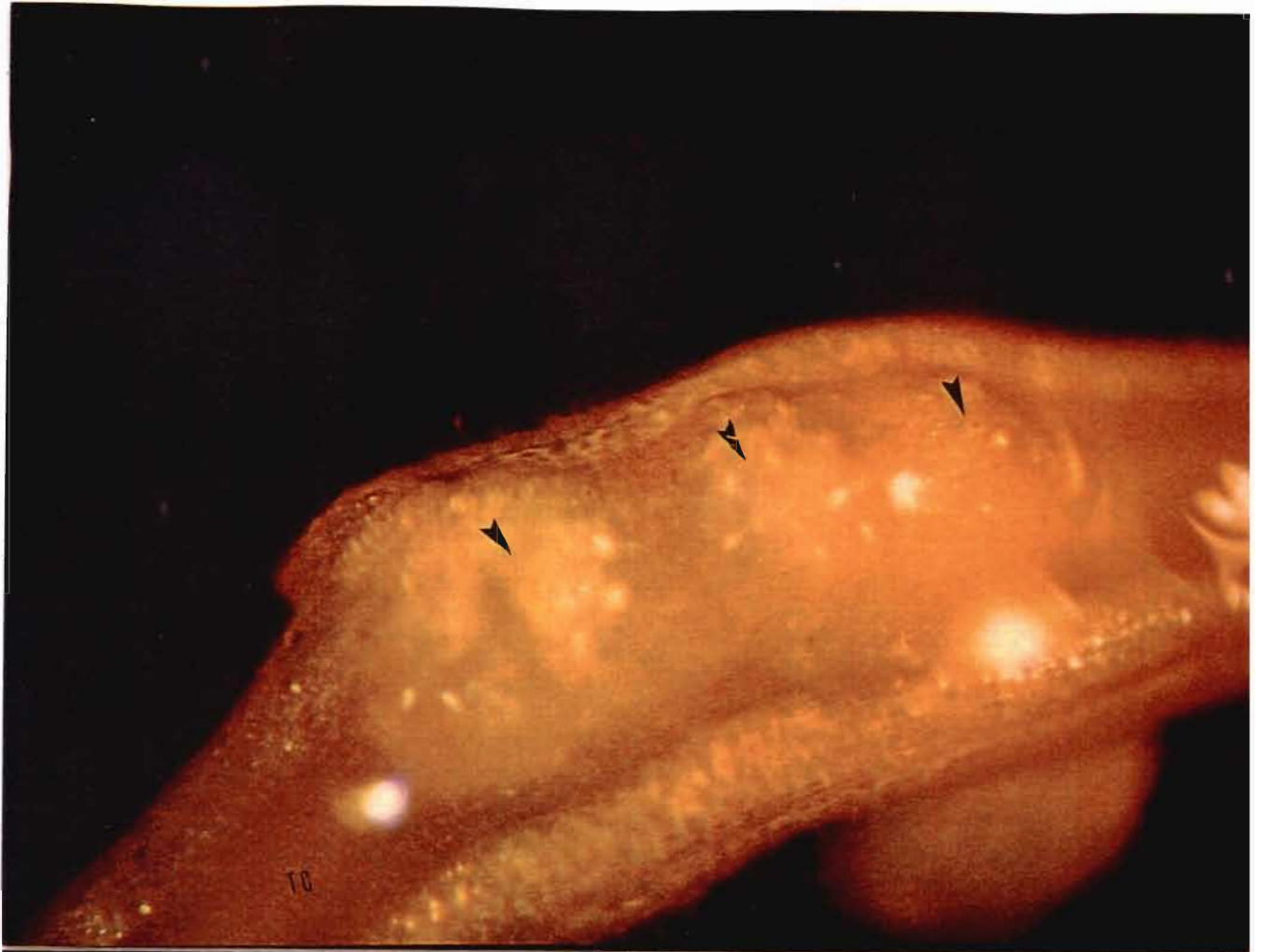


Planche N°27

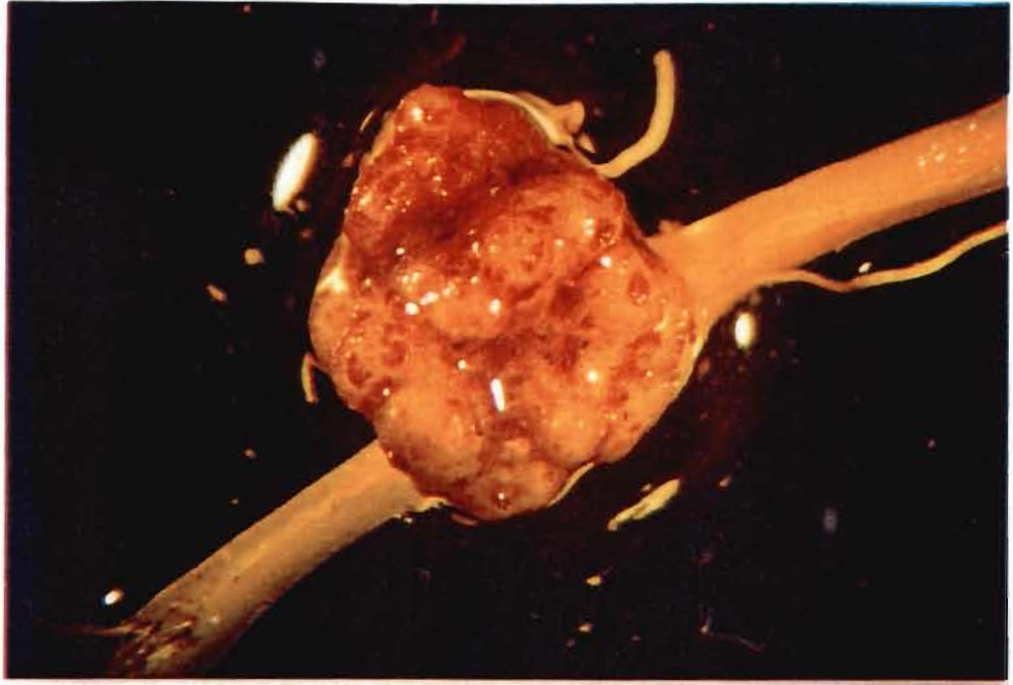
Nodules matures d'*A. albida*

Fig. A : Gros nodule méristématique multilobé (Gr. x 2,5)

Fig. B : Chapelet de nodules multilobés.(Gr. x 10)

Fig.C: Les nodules se développent très souvent à l'intersection entre le pivot et les racines latérales .(Gr. x 2,5)

A



B



C

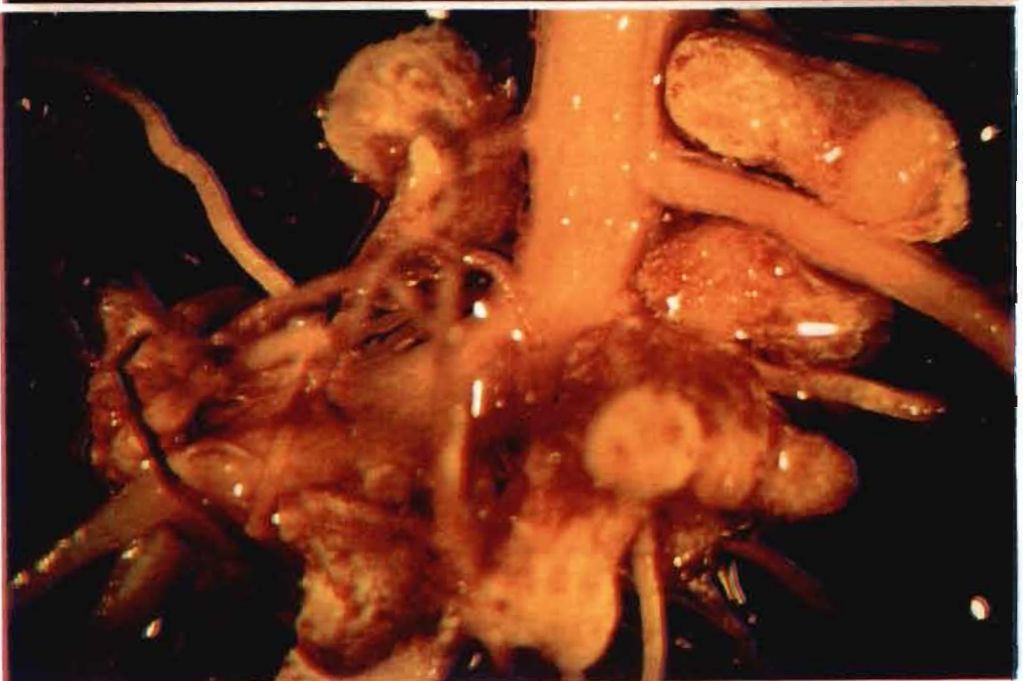


Planche N°28

Structure anatomique de nodules d'*A. albida* observée au microscope optique

Fig. A: Coupe anatomique d'un jeune nodule d'*A. albida* ; il est arrondi et constitué de deux parties : une partie externe périphérique non infectée et une partie interne centrale contenant des cellules infectées (CN : cortex nodulaire; CI : Cellules infectées) (Gr. x 125)

Fig. B : Détail de la structure d'un jeune nodule d'*A. albida*

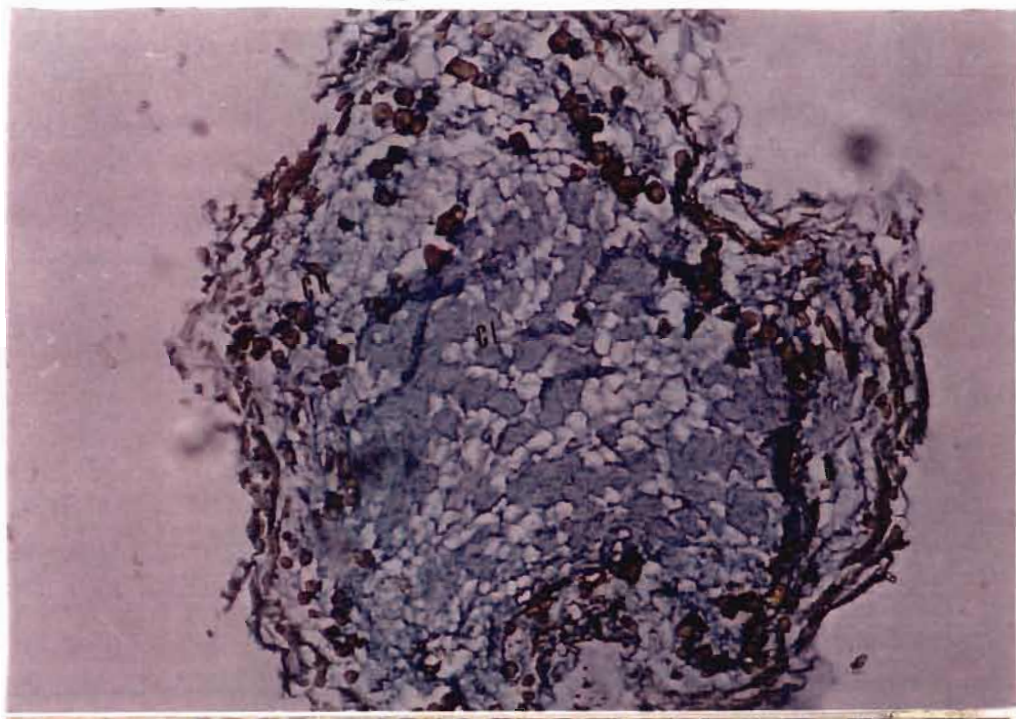
La partie périphérique est constituée de cellules parenchymateuses (P C) non infectées contenant de nombreux tannins.

Au centre on observe un ensemble de cellules infectées entourées de cellules interstitielles non infectées (Cin). Dans cette zone les tannins sont pratiquement absents .(Gr. x 200)

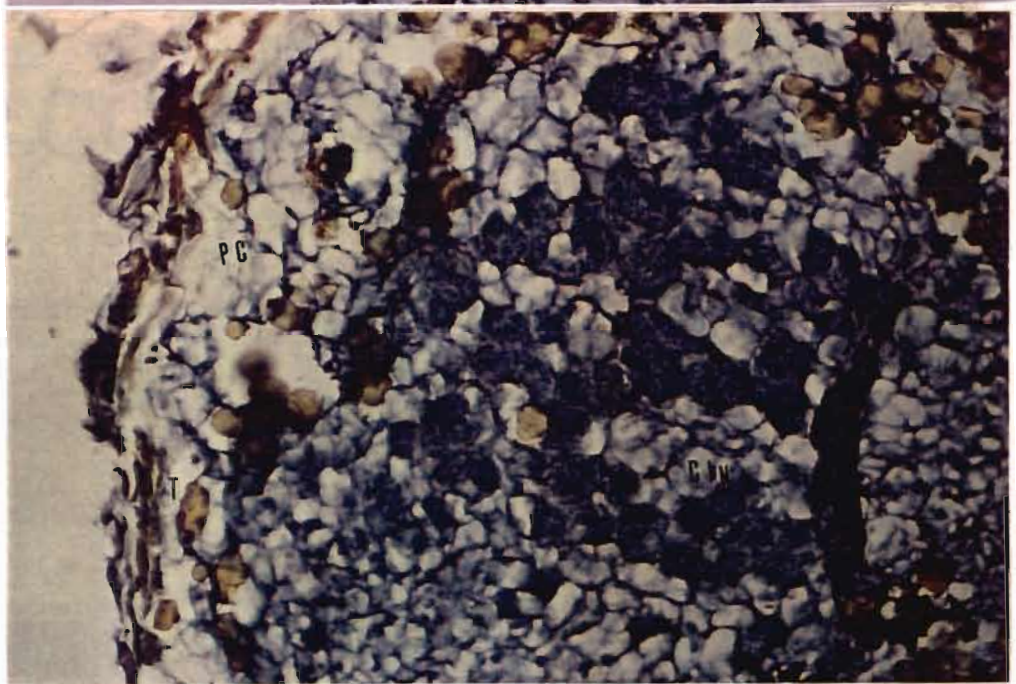
Fig. C : . Nodule d'*Acacia albida* âgé de 2 mois environ. Noter la formation d'un nouveau lobe ; on peut observer de grandes poches au contour épais contenant des cellules infectées entourées par des cellules non infectées .

Elles sont entourées d'une gaine épaisse et très colorée probablement issue du cordon d'infection, aux bords internes irréguliers . A l'intérieur de ces poches, on peut observer une matrice dense d'aspect grumeleux et de très nombreux et volumineux noyaux. Chaque noyau est cependant individualisé au sein de la masse; en effet il s'est entouré d'une fine membrane qui contient le protoplasme de la cellule dont le noyau est originaire . Cette structure nodulaire est assez fréquente sur les échantillons âgés observés. (Gr. x 600)

A



B



C



CONSIDERATIONS GENERALES

de cette relation est que l'espèce tend à assurer la fécondation de la totalité des ovules contenus dans un carpelle au cours d'un seul événement pollinatoire; nous avons aussi constaté que il arrive parfois qu'un stigmate reçoive 2 à 3 polyades ce qui tend à élever le rapport monade / ovule de 1,5 à 4,5.

Le mode de fécondation allogame ou autogame permet de comprendre comment les gènes sont échangés au sein des populations et d'en déduire par conséquent la structure génétique de la population. *A. albida* comme la plupart des Mimosacées jusqu'à présent étudiées, est une espèce à mode de reproduction allogame, privilégiant un niveau élevé d'hétérozygotie. La plupart des espèces forestières sont des espèces qui se reproduisent dans un système de panmixie générale qui favorise d'une part la recombinaison entre allèles et d'autre part, l'accumulation d'allèles favorables. Ce système assure la pérennité de l'espèce en augmentant ses capacités adaptatives.

Le grain de pollen qui constitue un gamétophyte réduit, est très souvent libéré sous une forme partiellement déshydratée; le pollen ne se conserve naturellement que quelques heures et chez *A. albida*, il se conserve quelques jours.

Nous avons montré que le pollen d'*A. albida* est capable de germer et d'émettre des tubes polliniques lorsqu'il cultivé sur un milieu optimal de Brewbaker et Kwacks.

L'intérêt d'étudier les conditions de stockage à long terme (1 an et plus), en utilisant les méthodes cryogéniques (Stanley et Linskens, 1974) ou la lyophilisation (Cerceau-Larrival, 1989) apparait évident lorsqu'on cherche à mettre en place des plans de croisement en utilisant du pollen récolté sur des arbres très distants les uns des autres au niveau de l'aire géographique et où la nécessité de conserver le pollen s'impose.

En utilisant le test fluorochromique (FCR), il est possible de tester l'intégrité fonctionnelle du pollen conservé soit par cryogénie soit par lyophilisation et avoir une bonne prédiction du taux de germination des monades "in situ" et par conséquent du rendement de la fécondation.

La seconde stratégie porte sur la propagation végétative et l'amélioration des potentialités physiologiques grâce à la symbiose fixatrice d'azote.

Il est admis que la sélection d'arbres "plus" au sein des populations naturelles et leur clonage en vue de la mise en place de plantations clonales individuelles est la voie la plus rapide pour l'amélioration génétique des arbres forestiers.

Au sein des populations naturelles d'*A. albida* la propagation végétative naturelle par la voie du drageonnage est fréquente; il n'est pas rare de constater que deux pieds peu éloignés l'un de l'autre sont en fait des clones issus du drageonnage des racines.

La propagation "in vitro" des arbres adultes emprunte cette voie naturelle en utilisant comme explants primaires des drageons qui réagissent très bien à la stimulation caulogène.

Au cours de nos expériences, nous avons pu constater la persistance dans les tissus adultes de phénomènes encore mal maîtrisés liés à la maturation; cette maturation induit de profonds

CONSIDERATIONS GENERALES

Dans le cadre de l'amélioration génétique, nous avons choisi de travailler sur deux voies identifiées comme des voies incontournables dans des schémas d'amélioration variétale.

La première voie qui est la voie classique, consiste à mettre en place des programmes d'amélioration génétique basés sur la reproduction sexuée et grâce à des croisements contrôlés, arriver à créer de nouvelles combinaisons et produire des génotypes présentant une bonne aptitude à la combinaison. Dans ce schéma, les gains génétiques attendus au fil des générations d'amélioration sont progressifs (avec un enrichissement progressif de la population de base en allèles nouveaux).

La seconde voie consiste à propager végétativement les individus "plus" sélectionnés; les gains génétiques sont immédiats.

En fait, dans la nature, *A. albida* utilise deux stratégies pour se propager dans son habitat:

1) la reproduction sexuée grâce à la fécondation avec un mode de reproduction allogame qui favorise la recombinaison des gènes. C'est une source importante de variabilité qui favorise en même temps l'adaptation et la survie de l'espèce lorsque les conditions environnementales changent. Cette stratégie est à long terme car elle assure la survie et l'évolution de l'espèce.

2) A l'inverse de la reproduction sexuée, la multiplication végétative par drageonnement assure la conquête rapide de l'espace disponible et assure la stabilisation d'une combinaison génotypique dans un type d'habitat déterminé.

En expérimentant, nous nous sommes inspirés de ces constatations et avons cherché à profiter de ces expériences toutes faites par la nature et tirer des enseignements sur les différents mécanismes adaptatifs adoptés par l'espèce .

Tout schéma d'amélioration basé sur les croisements est soutenu par une bonne connaissance de base en matière de biologie de la reproduction; cette connaissance couvre les domaines de la biologie florale, de la floraison, de la fruitaison et du mode de fécondation allogame ou autogame.

Au cours de notre travail, nous avons montré que chez *A .albida* l'unité reproductrice est non pas la fleur mais l'inflorescence toute entière ; en effet l'inflorescence se comporte comme une unité fonctionnelle où les fleurs basales en s'ouvrant les premières attirent les insectes pollinisateurs pour qu'ils pollinisent les fleurs situées à l'extrémité qui sont les plus réceptives.

Il existe une étroite relation entre le nombre de monades par polyade et le nombre d'ovules par ovaire ; en effet on constate que chez les Acaciae et les Mimosacae en général, le nombre de monades par polyade dépasse très souvent le nombre d'ovules par carpelle; la signification

changements au niveau du contrôle génétique du développement méristématique alliés à des modifications relativement superficielles tendant à modifier l'environnement nutritionnel et hormonal des tissus.

Au moment de la phase d'introduction, nous avons pu constater que le rythme annuel de croissance découlant des saisons, influe sur la culture et sur l'expression morphogénétique "in vitro" chez *A. albida*. C'est seulement pendant la phase active de croissance végétative et pendant la floraison que les méristèmes axillaires réagissent le plus favorablement à la caulogénèse .

L'effet de la maturation se manifeste en cours de culture, avec l'apparition de phénomènes de jaunissement suivis de la chute des feuilles. Ces manifestations apparaissent quelles que soient la nature du milieu et les conditions de culture. L'addition de Phloroglucinol ou la sub-culture fréquente peut retarder ce phénomène jusqu'à 55 à 60 jours, mais en aucun cas ne peuvent l'enrayer.

D'autre part, la persistance de phénomènes morphogénétiques endogènes encore difficiles à identifier et qui sont la conséquence d'une maturation des tissus, entraîne chez les clones introduits "in vitro", une croissance épisodique aléatoire et difficile à stabiliser (Gassama et al., 1995 soumis).

Ainsi, la voie qui consiste à utiliser des clones issus d'arbres adultes dans une perspective d'actions de développement, ne permet pas à l'heure actuelle d'obtenir du matériel homogène en grande quantité et dans un délai relativement court. L'absence de données relatives aux moyens d'inverser la tendance vers une courbe de croissance positive, constitue un sérieux handicap et devrait faire l'objet de recherches plus poussées avant d'envisager une utilisation opérationnelle dans les programmes de développement.

Par contre, le matériel juvénile présente d'importantes potentialités . En exploitant la faculté naturelle d'*A. albida* à émettre des drageons, nous avons réussi à régénérer des plantes entières acclimatées à partir de racines excisées. Les racines constituent un matériel de choix d'une part, par le taux élevé de multiplication obtenu à partir d'une faible quantité de matériel végétal, la vigueur des pousses qui en sont issues et d'autre part par le rôle important qui leur est dévolu en tant que "pôle primordial de la juvénilité".

Dans l'hypothèse que les pousses feuillées obtenues par culture de racine sont conformes à l'ortet initial (cette hypothèse est tout à fait raisonnable car il est admis que le bourgeonnement adventif produit naturellement lors du drageonnement des racines n'est qu'une expression de la plasticité morphogénétique puisqu'il ne fait que révéler des potentialités habituellement masquées lors du développement normal), on peut valablement envisager d'utiliser le matériel juvénile dans une perspective de clonage à grande échelle.

En effet, en utilisant la culture de racines excisées chez *A. albida* , il est possible d'obtenir dans les conditions optimales de culture à partir d'une seule racine, 138 plantules en 4 semaines.

La stratégie d'amélioration à promouvoir dans l'état actuel des connaissances chez *A. albida* est une stratégie basée sur l'obtention de variétés améliorées issues de croisements entre individus sélectionnés et la propagation de ces variétés améliorées par voie de clonage "*in vitro*". L'hybridation intra et interspécifique serait une alternative intéressante permettant d'obtenir du matériel de qualité en raison des avantages sélectifs naturels en faveur d'un niveau élevé d'hétérozygotie.

L'utilisation des arbres fixateurs d'azote atmosphérique dans les systèmes agroforestiers ou sylvo-pastoraux, suscite un grand intérêt en raison de la dégradation des facteurs de fertilité des sols tropicaux.

En étudiant la nutrition minérale azotée nous avons montré en utilisant plusieurs clones d'individus cultivés en présence de diverses sources de matière azotée que la forme ammoniacale et dans une moindre mesure la glutamine, sont très facilement convertibles en biomasse foliaire et racinaire chez *A. albida*. Ceci constitue un avantage non négligeable lorsqu'on sait que l'espèce faiblement fixatrice d'azote, se développe préférentiellement en assimilant l'azote du sol et ne concurrence pas les espèces céréalières qui utilisent elles, l'azote principalement sous forme oxydée.

Par ailleurs, nous avons mis en évidence que *A. albida* est une espèce qui se développe mieux sur des sols riches en éléments nutritifs; cette constatation rejoint l'idée que l'espèce s'implante préférentiellement sur des sols riches vestiges d'anciennes termitières abandonnées.

Nous avons aussi démontré que la croissance initiale de l'espèce est largement tributaire des réserves cotylédonaires qui assurent le développement des parties aériennes et racinaires au cours de 3 à 4 premières semaines de croissance. Les cotylédons agissent indirectement sur la formation des nodules en stimulant l'activité fixatrice d'azote; ils jouent le rôle d'azote "starter" et en cela justifie la forte proportion de l'azote observée au niveau des cotylédons d'*A. albida* par rapport aux Mimosacées sahéliennes.

Les importantes réserves cotylédonaires relèvent de la faculté d'adaptation et des mécanismes de survie mis en place par l'espèce dans un environnement sahélien souvent très défavorable.

De même, il est reconnu que chez *A. albida*, la morphologie du système racinaire traçant ou superficiel constitue un mécanisme adaptatif qui est fonction de la disponibilité en eau du sol. Il apparaît de nos observations que le type morphologique racinaire ~~est~~ principalement dépendant du paramètre eau du sol car quelle que soit la morphologie du système racinaire le potentiel de fixation pour un génotype donné, est le même. En effet, nos observations ont montré que la morphologie du système racinaire est la résultante phénotypique de l'interaction entre le génotype et les conditions de l'environnement racinaire et constitue

donc un paramètre peu stable et susceptible de modifications (Gassama, et al., 1995 soumis).

A l'opposé, le potentiel de fixation est un paramètre génétique à la fois lié au génotype de la souche et à celui de la plante-hôte. Par conséquent la morphologie du système racinaire ne peut pas constituer un critère de sélection pour l'aptitude à fixer l'azote étant donné l'indépendance de ces deux caractères qui par ailleurs sont susceptibles de modifications en fonction des conditions environnementales.

Au cours de nos expérimentations nous avons montré qu'*A. albida* est très peu spécifique dans le choix de ses associations symbiotiques.

L'absence de spécificité présente des inconvénients majeurs qui sont d'une part le faible potentiel fixateur lié à l'inefficience des nodules formés.

Par ailleurs, ce critère de non spécificité peut être considéré comme un avantage dans la mesure où quelle que soit la nature de la souche présente dans le sol, on est assuré d'avoir des plants qui nodulent. Dans ce cas il est possible d'optimiser la quantité d'azote fixée en sélectionnant les souches les plus effectives. Il apparait aussi que le choix de la souche la plus efficiente influence non seulement la quantité d'azote fixée par rapport au témoin non inoculé, mais encore à la stratégie d'infection.

En effet, certaines souches offrent une plus grande mobilité ou bien un mécanisme de reconnaissance bactérie/plante-hôte plus performant que d'autres. Il demeure évident qu' au moment de la mise en place sur le terrain, le choix d'une souche plus rapidement infective que les autres souches endémiques du sol, constitue un avantage sélectif très important pour la réussite de l'inoculation.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Abousalim A. (1991)** In vitro propagation of Pistachio (*Pistacia vera* L. cv Mateur) : Effects of culture media. Actes Inst. Agron. Vet. 11(3): 23-26
- Abraham K., K.J. Thomas (1962)** A note of the "in vitro" culture of the excised coconut embryos. Indian coconut J. 15: 84-88
- Ahée J., E. Duhoux (1994)** Root culturing of *Faidherbia albida* = *Acacia albida* as source of explants for shoot regeneration. Plant Cell Tissue and Organ Culture 36: 219-225
- Ahmad N., F.S.P Ng (1981)** Growth of *Leucaena leucocephala* in relation to soil pH nutrients levels and Rhizobium concentration. Leucaena Research Reports 2: 5-10
- Alazard D., E. Duhoux (1987)** Nitrogen fixing stem nodules on *Aeschynomene afraspera*. Biol. Fertil. Soils 4: 61-66
- Alazard D., E. Duhoux (1990)** : Development of stem nodules in a tropical forage legume *Aeschynomene afraspera*. J. Exper. Bot. 41: 1199-1206
- Alexandre D.Y., S.J. Ouedraogo (1992)** Variations in root morphology of *Faidherbia albida* in relation to soil and agronomic effects p107-110 In: (Vandenbelt R.J. Eds) *Faidherbia albida* in the West African semi- arid tropics : Proceed. of a Workshop 22-26 Apr. 1991 ICRISAT Niamey Niger:
- Ali S.I., M. Kaiser (1980)** Hybridization in *Acacia nilotica* (Mimosoidae) Complex. Bot. J. Linn. Soc. 80: 69-77
- Allen O., N.K. Allan (1981)** The Leguminosae a source book of characteristics, uses and nodulation. University of Wisconsin Press 812 p
- Allioux B. (1990)** Culture de racine d'*Allocasuarina verticillata* (Lam.) et de *Casuarina equisetifolia* (Forst & Forst) transformés ou non par *Agrobacterium rhizogenes* et applications potentielles. Mémoire de fin d'études E N S H: 49 pp
- Appeels M.A., H. Haaker (1987)** Identification of cytoplasmic nodule associated forms of malate-dehydrogenase involved in the symbiosis between *Rhizobium leguminosarum* and *Pisum sativum* . Eur. J. Biochem. 174: 515-522
- Arrillaga I. Brisa M-C., J. Segura (1986)** Somatic embryogenesis and plant regeneration from hypocotyl cultures of *Digitalis obscura* L. . J. Plant Physiol. 124 : 425-430
- Arroyo M.T.K. (1981)** Breeding system and pollination biology in Leguminosae. In (R.M. Polhill & P.H. Raven Eds) Advances in Legume systematics Part. 2 Royal Botanic Garden Kew: 723-769
- Atchinson E. (1948)** Studies in the Leguminosae II: Cytogeography of *Acacia* (Toune.) L. Americ. J. Bot. 35 (10): 651-655
- Badji S. (1986)** Fixation d'azote par *Acacia senegal* p94-121 In: les arbres fixateurs d'azote et l'amélioration de la fertilité des sols. Actes Séminaire FIS/ORSTOM 17-25 Mars Dakar, Sénégal
- Badji S. (1991)** La symbiose *Acacia senegal* (L.) wild-Rhizobium sp. : Étude des partenaires et optimisation du fonctionnement de la symbiose. Thèse de Doctorat de l'Université d'Aix Marseille III
- Badji S., Mairone V., N'Diaye I., Merlin G., Colonna J.P., Danthu P., Neville P., (1992)** Multiplication végétative "in vitro" du gommier *Acacia senegal* L. (Willd). p 155-166 In Eds AFOCEL/IUFRO "Production de variétés génétiquement améliorées d'espèces forsières à croissance rapide" Actes Symp. Bordeaux FRANCE
- Baillon C. (1863)** Revision des *Acacia* médicinaux. Adansonia 4
- Bajaj Y.P.S., P. Nitsch (1975)** "In vitro" propagation of red cabbage (*Brassica oleracea* L. Var capitata). Journal of Experimental Botany 26: 883-890

- Barnet Y.M., Catt P.C., D.H. Hearne (1985)** Biological nitrogen fixation and root-nodule bacteria (*Rhizobium sp.* and *Bradyrhizobium sp.*) in two rehabilitating sand dune areas planted with *Acacia spp.* Aust. J. Bot. 33: 595-610
- Barwale V.B., Kerns H.R., J.M. Windholm (1986)** Plant regeneration from callus culture of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. Planta (Berlin) 167: 476-481
- Bauer W.D. (1981)** Infection of legumes by rhizobia. Ann. Rev. Plant Physiol. 32: 407-449
- Baumer M., (1988)** L'agroforesterie et désertification. Eds ICRAF/CTA 260 p
- Bawa K.S., Webb C.J. (1984)** Flower fruit and seed abortion in tropical forest trees : implications for the evolution of paternal and maternal reproductive patterns. Amer. J. Bot. 71(5): 736-751
- Benge M.D. (1983)** The miracle-tree : reality or myth ? p 95-98 In IDRC Ottawa Ontario Eds. "Leucaena Research in Asia-Pacific Region" Proceed. Workshop Singapore 1982
- Bentham (1875)** A revision of the suborder Mimosaceae. Trans. Linn. Soc. London. : 360-634
- Bergersen F.J., M.J. Briggs (1958)** Studies of the bacterial component of soybean root nodules : cytology and organisation of the host tissue. J. Gen. Microb. 19: 482-490
- Bergmann H., Preddie J.V., D.P.S. Verma (1983)** Nodulin35 : a sub-unit of specific uricase (uricase II) induced and localised in the uninfected cells of soybean nodules. EMBO J. 2: 2333-2339
- Bernardt P., Kenrick J., R.B. Knox (1984)** Pollination biology and the breeding system of *Acacia retinodes* (Leguminosae: Mimosoidae). Ann. Missouri Botanical Garden 71: 17-29
- Bernardt-Reversat F., H. Poupon (1980)** Nitrogen cycling in a soil tree system in a sahelian savanna. Example of *Acacia senegal*. p 363-369 In "Nitrogen cycling in West African Ecosystems" Eds. T. Rosswall
- Berteche J., Raymond I. (1992)** Conservation of *Picea abies* somatic embryos by dehydration. p159-169 In Eds AFOCEL/UFRO "Production de variétés génétiquement améliorées d'espèces forestières à croissance rapide" Actes Symp. Bordeaux FRANCE
- Bhat S.R., Chitralkha P., K.P.S. Chandel (1992)** Regeneration of plant from long term root culture of lime, *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing. Plant Cell Tissue Org. Cult. 29: 19-25
- Billand A. (1992)** Variability of *Faidherbia albida* in Progeny trials in Burkina Faso p71-75 In: *Faidherbia albida* in the west African semi- arid tropics : Vandenberg R.J. Eds. Proceedings of a Workshop 22-26 Apr. 1991 ICRISAT Niamey Niger
- Billand A., de Framont S., (1990)** Variabilité génétique de *Faidherbia albida* (Syn. *Acacia albida*) en essais comparatifs de provenances au Burkina -Faso. In Physiologie des arbres et arbustes en zone sèches et semi-arides. Symposium Nancy France
- Black C.C., T.E. Humphrey (1962)** Effects of 2-4 D on enzymes of glycolysis and pentose phosphate cycle. Plant Physiol. 37: 66-73
- Bonga J.M. (1981)** Organogenesis "in vitro" of tissue from mature conifers. In vitro 17: 511-518
- Bonga J.M. (1982)** Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity and rejuvenation p 387-412 In: Tissue culture in forestry Eds Bonga and Durzan Martinus Nijhoff Publishers N.V. The Hague
- Bonkougou G.E. (1987)** Monographie de *Acacia albida* Del. espèce agroforestière à usages multiples. Ouagadougou Burkina Faso IRBET 92 p
- Bonkougou G.E. (1992)** : Socio-cultural and economic functions of *Acacia albida* in West africa. p 1-6 In: Vandenberg R.J. Eds *Faidherbia albida* in the west African semi- arid tropics : Proceed. of a Workshop 22-26 Apr. 1991 ICRISAT Niamey Niger
- Bonner J., Devirian P.S. (1939)** Growth factors requirements of four species of isolated roots. Amer. J. Bot. 26: 661-665

- Bonnet H.T., Torrey J.G. (1965)** Chemical control of organ formation in root segments of *Convolvulus* cultured "in vitro". *Plant Physiol.* 40: 1228-1236
- Bornmann C.H., Janson E. (1981)** Regeneration of plants from the conifer leaf, with special reference to *Picea abies* and *Pinus sylvestris*. p41-54 *In* Eds AFOCEL. Proceed. Colloque international sur la culture "in vitro" des essences forestières. Fontainebleau France
- Bory C., D. Clair-Maczulajtys (1991)** Les métabolites de réserve: un outil de perception de la physiologie de l'arbre entier. p 97-115 *In* Physiologie des arbres et arbustes en zone sraides et semi-arides Symposium Nancy France -Groupe d'étude de l'arbre. Paris France
- Boulay M. (1979)** Multiplication et clonage rapide du *Sequoia sempervirens* par culture *in vitro* . Etudes et recherches AFOCEL, Domaine de l'Étançon : 49-55
- Bowen G.D. (1980)** Mycorrhizal roles in tropical plants and ecosystems p 165-190 "Eds P. Mikola Univ Press Oxford U.K. in "Tropical mycorrhiza Reseach "
- Bremner J.M. et Mulvanet C.S.(1982)** Nitrogen total. p 595-624 *In* Methods of soil analysis , part 2 Ed. Page A.L. Amer. Soc. Agron., Madison, Wisc.
- Brenan J.P.M. (1983)** Manual on taxonomy of Acacia species present taxonomy of four species : (*Acacia albida*, *A. senegal*, *A. tortilis*, *A. nilotica*) FAO Rome Italy 47p
- Brewbaker J.L (1983)** Systematics, self-incompatibiliy, breeding systems and genetic improvement of *Leucaena* species. p 17-22 Eds IDRC Ottawa Ontario *In* "Leucaena research in the Asian -Pacific region" Proc. Workshop Singapore 1982
- Brewbaker J.L., Kwack B.H. (1963)** The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *Amer. J. Bot.* 50: 859-865
- Brouwer J., Geiger S.C., Van den Beldt (1992)** Variability in the growth of *Faidherbia albida* : a termite connection? p 131-135 *In*: Vandenbelt R.J. Eds *Faidherbia albida* in the west African semi- arid tropics : Proceed. of a Workshop 22-26 Apr. 1991 ICRISAT Niamey Niger
- Brown C.L., Mc Alpine R.G (1964)** Propagation of sweetgum from root cuttings. Georgia Foret. Res. Pap. 24
- Broughton W.J. et Dilworth M.J. (1971)** Control of Laeghaemoglobin synthesis in snake beans. *Biochem. J.*, 125:1075-1080
- Bruijn de F.J. (1992)** Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genome of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiol.* 58: 2180-2187
- Burger D.W. (1987)** *In vitro* micropropagation of *Eucalyptus sideroxylon* . *Hort. Science* 22(3) 496-497
- Burger D.W., W.P. Hackett (1986)** Gradients of adventitious bud formation on excised epicotyl and root section of Citrus. *Plant Sci.* 43: 229- 232
- Butcher D. N., H.E. Street (1964)** Excised root culture. *Bot. Rev.* 30: 531-586
- Caetano-Anolles G., W.D. Bauer (1988)** Feed-back regulation in nodule formation in alfalfa. *Planta* 175: 546-557
- Caldwell B.E., H.G.Vest (1977)** Genetic aspects of nodulation and dinitrogen fixation by legumes : the macrosymbiont *In* "A tractise of dinitrogen fixation" Eds Hardy R.W.F Silver W.S. John Willey & Sons Publishers , Newyork p. 557-573
- Callagham D.A., Torrey J.G (1981)** The structure basis of infection root hairs of *Trifolium repens* by *Rhizobium* . *Can. J. Bot.* 59: 1647-1664
- Carron M-P., Enjalric F., A. Deschamps (1984)** Progress of research into "in vitro" vegetative propagation of *Hevea Braesiliensis*. *Compte Rendus du colloque Exploitation Physiologie et Amélioration de l'hévea GERDAT* 15p

- Cazet M. (1987)** La regeneration artificielle de *Faidherbia albida* en zone sahélienne. plantations ou semis direct? Premiers resultats de l'expérimentation conduite à Thiéncaba (Sénégal) en 1986 ISRA/DRPI: 49 p
- Cerceau-Larrival M-T., Challe J. Carbonnier Jarreau C., Derouet L. (1986)** Biopalynology and maintenance of the germinative capacity of stored pollen in some Angiosperms families. Linn. Soc. of London: 151-163
- Chandler M.R. (1978)** Some observations on the infection of *Arachis hypogaeae* L., by Rhizobium. J. Experim. Bot. 29: 749 -755
- Chandler M.R., Pate R.A., R.J. Roughley (1982)** Infection and root nodule development in Stylosanthes species by the Rhizobium. J. Exp. Bot. 33: 47-57
- Chang K.P., Hugh-Tan H., K. Pao-Chang (1986)** Effect of endomycorrhizal fungi and Rhizobium inoculation on growth of *Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth. Nitrogen Fixing trees Research Reports 4: 40-41
- Charlesworth D. (1988)** Evolution of homomorphic sporophytic self-incompatibility. Heredity 60: 445- 453
- Charlton W.A. (1965)** Bud initiation on excised roots of *Linaria vulgaris* Nature (London) 207: 781-786
- Charreau C., P. Vidal (1965)** Influence de l'*Acacia albida* Del. sur le sol : nutrition minérale et rendement du mil Pennisetum au Sénégal. Agronomie Tropicale 6-7: 66-626
- Chaturvedi H.C., M. Sinha (1979)** Mass clonal propagation of *Solanum khasianum* through tissue culture. Indian Journal of Experimental Biology 17: 153-157
- Chen C.H. , Lo P.F., J.G. Ross (1981)** : Cytological uniformity in callus culture derived blue -stem plant (*Andropogon gerardii* . Vitman). Proc. S. D. Acad. Sci. 60: 39-43
- Chen H. , B.G. Rolfe (1988)** Rhizobium infection of *Leucaena leucocephala* via the formation of infected threads in curled root hairs. J. Plant Physiol. 332: 379- 382
- Cheng T. Y., T.H. Voqui (1977)** Regeneration of Douglas fir plantlets from somatic callus tissus culture. Science 198: 306-310
- Chevallier A., (1934)** Nouvelles observations sur quelques Acacia de l'Afrique occidentale. Rev. Bot. Appl. 14: 875-884
- Chevallier M-H., Sagna M., Sarr A.S., P. Danthu (1992)** Morphological variability of pods of four *Faidherbia albida* provenances in Senegal. p 67-71 In: Vandebelt R.J. Eds *Faidherbia albida* in the west African semi- arid tropics: Proceed. of a Workshop 22-26 Apr. 1991 ICRISAT Niamey Niger
- Chriqui D. (1985)** Induction et prolifération de cellules pré-rhizogènes : auxine et polyamines. Bull. Soc. Bot. Fr. 132: 127-141
- Cissé M.I., A.R. Koné (1992)** The fodder role of *Acacia albida* Del.: Extent of knowledge and prospects for future research p 29-37 In: Vandebelt R.J. Eds *Faidherbia albida* in the west African semi- arid tropics : Proceed. of a Workshop 22-26 Apr. 1991 ICRISAT Niamey Niger
- Coates D. (1988)** Genetic diversity and population genetic structure in the rare cittering grass wattle, *Acacia anomala* Court Aust. J. Bot. 36: 273-286
- Coetze J.A. (1955)** The mophology of Acacia pollen. S. Afric. J. Sci. 52:23-27
- Cornet F., Otto C., Rinaudo G., Diem H.G., Dommergues Y. (1985)** Nitrogen fixation by *Acacia holosericea* grown in fields simulated conditions. Acta œcol. 6(20):211-218
- Cornu D., C. Chaix (1981)** Multiplication par culture "in vitro" de mérissiers adultes (*prunus avium* L.) application à un large éventail de clones. p 71-80 Eds AFOCEL Proceedings colloque AFOCEL sur la culture "in vitro" des essences forestières Bordeaux France
- Cruden R.W., (1977)** Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. Evolution 31: 32-46
- CTFT (Centre technique forestier tropical) (1989)** *Faidherbia albida* (Del.) A.Chev.(synonyme *Acacia albida* Del.) Nogent sur Marne France Eds CTFT 72 p

- Dameri R.M Caffar., Gastado P., P. Profuma (1986)** Callus formation and embryogenesis with leaf explants of *Aesculus hippocastaneum* . J. Plant Physiol. 126: 93-96
- Dancette C., M. Niang (1979)** Rôle de l'arbre et son intégration dans les systèmes agraires du Nord du Sénégal. p 57-63. In Eds CRDI " Le rôle des arbres au Sahel. Colloque CRDI Dakar Sénégal
- Dancette C., Poulain J.F. (1968)** Influence de l'*Acacia albida* sur les facteurs pédoclimatiques et les rendements des cultures. IRAT/ CNRA 45 p
- Danckwardt-Lilliestrom C. (1957)** Kinetin induced shoot formation from isolated roots of *Isatis tinctoria* . Physiol. Plant. 10: 794-799
- Danso S.K.A., G.D. Bowen, N. Sanginga (1991)** Biological nitrogen fixation in trees in agroecosystems. Plant and Soil
- Danthu P. (1992)** Vegetative propagation of adult *Faidherbia albida* by branch and root cuttings p 87-90 In: Vandenbelt R.J. Eds *Faidherbia albida* in the west African semi- arid tropics : Proceed. of a Workshop 22-26 Apr. 1991 ICRISAT Niamey Niger
- Danthu P., D. Pratt (1991)** Study of the genetic variability by the means of isoenzymes of *Faidherbia albida* : preliminary results p 225- 226 In Finechi S., Malvoti M.E., Cannata F., Hatemr H. Eds SPB Academic publishers " biochemical markers in the population genetics of forest trees
- Dart P.J. (1974)** The infection process. In "The biology of nitrogen fixation" Quispel A. Eds Amsterdam p 381-429
- Dart P.J. (1977)** Infection and development of leguminous nodules . In A treatise of dinitrogen fixation(Ed W.F. Hardy) p 367-472
- Davey C B , Wollen A.G. (1979)** Nitrogen inputs to forest ecosystems through biological fixation p 62-74 In Proceed. impact of intensive harvesting on forest nutriment cycling. School of forestry Syracuse New-York.
- Dazzo F.B., Drill W.J. (1978)** Regulation of fixed nitrogen fixation by host symbiont recognition in the *Rhizobium* clover symbiosis. Plant Physiol. 62: 18-21
- Dazzo F.B., Hubbell D.M. (1982)** Control of root hair infection. in "Nitrogen fixation" Vol.2 : *Rhizobium* p 274-312 Eds. W. J. Broughton
- De Faria S., Mc Inroy S., Sprent J. (1987)** The occurrence of infected cells,with persistant infection threads in legume root nodules. Can. J. Bot. 65: 553-558
- De Faria S., Sutherland J. M., Sprent J. (1986)** A new type of infected cells in root nodules of *Andira* spp. (leguminosae). Plant Science 45: 143-147
- De Fraiture A., A. Nikiema (1989)** Mise au point de techniques de bouturage sous chassis des racines d'*Acacia albida* Del. Centre National des semences forestières Burkina Faso 15 p
- Debellé F., S.B. Charina (1986)** Nucleotide sequence of *Rhizobium meliloti* RCR 2011 genes involved in host specificity of nodulation. Nucl. Acid Research 14: 7453-7472
- Demarly Y. (1985)**: L'épigénétique . Bull. Soc. Bot. Fr. 132 (3/4): 79-94
- Demarly Y., M. Sibi (1989)** Amélioration des plantes et biotechnologies. Eds. John Libbey Eurotext London Paris 84 p
- Denarié J., Debellé F., Rosenberg C., (1992)** Signaling and host range variation in nodulation. Ann. Rev. Microbiol. 46: 497-531
- Detrez C., N'Diaye S., Kerbellec F., Dupuy N., Danthu P., Dreyfus B. (1992)** Meristem micrografting of adult *Faidherbia albida* p 91-95 In: Vandenbelt R.J. Eds *Faidherbia albida* in the west African semi- arid tropics : Proceed. of a Workshop 22-26 Apr. 1991 ICRISAT Niamey Niger

- Dhawan V., Bhowani S.S (1985)** In vitro propagation of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. Plant Cell Reports 4: 315-318
- Diagne O. (1986)** Comparaison de la fixation d'azote de deux *Prosopis* cultivés au Sénégal : *P. africana* et *P. juliflora*. p 55-68 In: les arbres fixateurs d'azote et l'amélioration de la fertilité des sols. Actes Séminaire IIS/ORSTOM 17-25 Mars Dakar, Sénégal
- Diagne O., D.D Baker (1994)** Quantification of symbiotic nitrogen fixation by *Prosopis juliflora* (Swartz.) D.C using ¹⁵N isotope dilution methodology. Soil Biol. Bioch. 12: 1709-1710
- Dianda M. (1993)** Comparaison de la croissance et de la fixation biologique d'azote chez plusieurs provenances de *Faidherbia albida* (Del.) A. Chev. Mémoire de DEA Université C A D de Dakar 47 p
- Dickinson H.G. (1982)** The development of pollen. Rev. Cytol. Biol. Veget. Bot. 5: 5-19
- Diop T., Gueye M., Dreyfus B., Planchette C., D. Strullu (1994)** Indigenous arbuscular mycorrhizal fungi associated with *A. albida* Del. in different areas of Senegal. Applied and Environmental Microbiology 60 (9): 3433-3436
- Diouf D. (1995)** Étude du métabolisme azoté chez quelques *Acacia* tropicaux fixateurs d'azote. Mémoire de DEA Univ. C A D de Dakar 40 p
- Dnyansagar V.R., (1958)** Embryological studies in Leguminosae VIII *Acacia auriculiformis* A. Cunn., *Adenantha pavonia* Linn., *Calliandra lematoccephala* Hassk. *Calliandra grandiflora*. Benth. Lloydia 21: 1-25
- Döbereiner J., Franco A.A., I. Guzman (1970)** Estirpes de *Rhizobium japonicum* de exceptional eficiencia. Pesq. Agropec Bras. 5: 155-161
- Domenach A.M. , F., Kurdali (1989)** Influence des réserves azotées sur la formation des feuilles d'*Alnus glutinosa* et ses conséquences dans l'estimation de la fixation biologique de l'azote. Can. J. Bot. 67: 865-871
- Dommergues Y.R. (1987)** The role of the biological nitrogen fixation in agroforestry. In agroforestry a decade of development. (I.A. Stepler and P.K.R. Nair Eds) p 245-251 ICRAF Nairobi
- Downie J.A.(1980)** The "nod" L gene from *Rhizobium leguminosarum* is homologous to the acetyl-transferase encoded by lac A and cys E. Molecular Biology 3: 1649-1651
- Dreyfus B., Diem H.G., Dommergues Y.R (1988)** Future directions of biological nitrogen fixation research. Plant & Soil 108: 191-199
- Dreyfus B., Garcia J.L., M. Gillis (1988)** Characterisation of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., a stem nodulating nitrogen fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. Inter. J. Syst. Bact. 38: 89-98
- Dreyfus B., Y.R. Dommergues (1981)** Nitrogen fixing nodules induced by *Rhizobium* on the stem of the tropical legume *Sesbania rostrata*. FEMS Microbiology Letters 10: 313-317
- Dreyfus B.L., Dommergues Y. R. (1988)** Nodulation of *Acacia* species by fast and slow growing tropical strains of *Rhizobium*. Appl. Environ. Microb. 41: 97-99
- Driver J.A., Kunuyuki A.H. (1984)** "In vitro" propagation of paradox walnut rootstock. Hortscience 19(4): 507-509
- Dublin M. (1981)** Embryogénèse somatique directe sur fragments de feuilles de caféier *Arabusta*. café Cacao Thé (Paris) Vol xxv N° 4 : 237-242
- Dublin P. (1981)** Embryogenese somatique directe sur fragments de feuilles de *Coffea arabusta*. Café Cacao Thé (Paris) Vol XXV N°4: 237-242
- Ducouso M., Colonna J.P. (1992)** Endomycorrhiza infection in young *Faidherbia albida*: influence on growth and development p 151-156 In: Vandenbelt R.J. Eds *Faidherbia albida* in the west African semi- arid tropics : Proceed. of a Workshop 22-26 Apr. 1991 ICRISAT Niamey Niger
- Duhoux E., (1984)** Ontogénèse des nodules caulinaires du *Sesbania rostrata* (Légumineuses) Can. J. Bot. 62: 982-995

- Duhoux E., Davies D.W. (1985)** Caulogénèse à partir de bourgeons cotylédonaire d'*Acacia albida* et influence du saccharose sur la rhizogénèse. J. Plant Physiol. 121: 175-180
- Duhoux E., Dommergues Y.R. (1986)** The use of nitrogen fixing trees in forest and soil restoration in the tropics. p 384-400 *In: Les arbres fixateurs d'azote et l'amélioration de la fertilité des sols. Actes Séminaire FIS/ORSTOM 17-25 Mars Dakar, Sénégal*
- Duhoux E., Sougoufara B., Dommergues Y. (1986)** Propagation of *Casuarina equisetifolia* through axillary buds of immature female inflorescences cultured "in vitro" Plant Cell reports 3: 161-164
- Dumas C., Knox R.B. (1983)** Callose and determination of pistil viability and incompatibility. Theor. Appl. Genet. 67: 1-10
- Dupuy N. (1993)** Contribution à l'étude de la symbiose fixatrice d'azote entre *Acacia albida* et *Bradyrhizobium* Sp. . Thèse de doctorat de l'Université des Sciences et Techniques de Lille 158 p
- Dupuy N., Dreyfus B. (1992)** *Bradyrhizobium* populations occur in deep soil under the leguminous tree *Acacia albida*. Appl. Environ. Microbiol. 58: 2415- 2419
- Dupuy N., Dreyfus B. (1992)** Presence of *Bradyrhizobia* under *Acacia albida* p 145-148 *In: Vandenbelt R.J. Eds *Faidherbia albida* in the west African semi- arid tropics : Proceed. of a Workshop 22-26 Apr. 1991 ICRISAT Niamey Niger*
- Dupuy N., Willems A., Pot B., Dewettings D., Maestrojuan G., Vandenbruaen I., Neyra M., Collins M.D., Deryfus B., Kersters K., Gillis M. (1994)** Phenotypic and genotypic characterization of *Bradyrhizobia* nodulating the leguminous *Acacia albida* . Intern J. Bacteriol. 44(3): 461-473
- Durzan D.J. (1992)** Biochemical and physiological markers for maturation and its reversal in conifers. p 73-80 *In "Production de variétés génétiquement améliorées d'espèces forestières à croissance rapide" Eds AFOCEL/IUFRO Actes Symp. Bordeaux*
- Eaglesham A.R.J., Szalay R.D. (1983)** Aerial stem nodules on *Aeschynomene* spp. Plant Science Letters 29: 265-272
- Ebert P.R., Anderson M.A., Bernatzky R., Altschuler M., Clarke A.E. (1989)** Genetic polymorphism of self-incompatibility in flowering plants. Cell 56: 255-262
- Eds AFOCEL Proceed. Symp. "production de variétés génétiquement améliorées d'essences forestières à croissance rapide " Bordeaux France 1992
- Evans D.A, Sharp W.R.(1983)** Single gene mutation in tomato plants regenerated from tissue culture. Science, 221:949-951
- Evans D.A. (1986)** Case histories of genetic variability in vitro: tomato . in vasil I.K. Eds p 419-434. Cell culture and somatic cell genetics of plants . Vol.3 Plant regeneration and genetic variability . Academic press Inc.,
- Evans P.T. et Malmberg R.L. (1989)** Do polyamines have roles in plant development ? Ann Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. N°40: 235-269
- Eyog-matig O., Peltier (1988)** Les essais d'agroforesterie au Nord Cameroun. Bois et Forêts des Tropiques 21 (3): 3-31
- Fageria N.K, Bahgar V.C., Wright R. J. (1988)** Aluminium toxicity in crop plants. J. Plant Nutrit. 11: 303-319
- Faggs C.W., Barnes R.D. (1992)** African Acacias study and acquisition. In: Vandenbelt R.J. Eds *Faidherbia albida* in the West African semi- arid tropics : Proceed. of a Workshop 22-26 Apr. 1991 ICRISAT Niamey Niger
- Fall S.T. (1978)** Utilisation de l'*Acacia albida* et de *Caloptropis procera* pour améliorer les rations des petits ruminants au Sénégal . I.E.R.V Report ISRA Sénégal 11p

FAO (1985) Ressources génétiques d'essences arborées des zones arides et semi-arides FAO Rome 130p

Feirer R.P., Mignon G., J.D. Litway (1984) Arginine decarboxylase and polyamines required for embryogenesis in the wild carrot. Science 223: 1433-1435

Franclet A. (1980) Rajeunissement et propagation des ligneux. Ann. AFOCEL 10-11: 12-41

Franclet A. (1981) Rajeunissement et propagation végétative des ligneux Ann. AFOCEL 12-13: 12-40

Franclet A., Boulay M., Bekkaoui F., Fouret F., Vershoore- Martouzet B., Walker N. (1987) Rejuvenation. p 232-248 in Eds Martinus Nijhoff Publishers "The Hague" Cell and tissue culture in forestry" Bonga J.M Durzan D.J.

Franclet A., Franclet-Mirvaux M-C. (1992) Elimination of topophysis in *Sequoia sempervirens* clone NP29 : a model of plant useful to provide the cuttings. In Eds AFOCEL "Production de variétés génétiquement améliorées d'espèces forsières à croissance rapide" Actes Symp. Bordeaux FRANCE

♠ Galiana A., Alabarce J., Duhoux E. (1990) Nodulation "in vitro" d'*Acacia mangium* Willd (leguminosae). Ann. Sci. Forest. 451-460

Galiana A., Alabarce J. Duhoux E. (1990) Nodulation in vitro d'*Acacia mangium* Willd. (Leguminosae) Ann. Sci. For. 47: 451-460

Galiana A., Tibok A., Duhoux E. (1991) Nitrogen fixing potential of micropropagated clones of *Acacia mangium* inoculated with different *Bradyrhizobium spp.* strains. Plant & Soil 135: 161-166

Gamborg (1970) The effect of amino-acids and ammonium on growth of plant cells in suspension culture. Plant Physiol. 45: 372-375

Gamborg O.L., Muller R.A., Ojima K. (1968) Exp. Cell. Res. 50 p 151 -158

Gassama Y.K., Sidibé M., Batcho M. (1995) *Acacia albida* (Del) syn *Faidherbia albida* (Del.) A. Chev. au Sénégal: Etude de l'interaction génotype-environnement chez deux provenances de zones sèches et humides par clonage "in vitro". Bull. IFAN (sous presse)

Gassama Y.K. (1984) Etude des potentialités organogènes chez l'hybride *Pinus rigida x taeda* (Mill.) en culture "in vitro". Thèse de Doctorat de 3ème cycle Université de Bordeaux II 142 p

Gassama Y.K. (1989) Culture "in vitro" et amélioration symbiotique chez *Acacia albida* (Leguminosae) adulte. p 286-290 Eds IFS Proceed. Trees for development in sub-saharan Africa Nairobi Kenya

Gassama Y.K. (1993) Biologie de la reproduction chez *Acacia albida*. Bois et Forêts des Tropiques N° 238

Gassama Y.K., Duhoux E. (1986) Micropropagation de l'*Acacia albida* DEL. (leguminosae) adulte Bull. IFAN T46 sér. A N°3-4: 314-320

Gassama Y.K., E. Duhoux (1992) Régénération et culture de racines excisées chez *Acacia albida* p 183-194 In Eds AFOCEL "Production de variétés génétiquement améliorées d'espèces forsières à croissance rapide" Actes Symp. Bordeaux FRANCE

Gassama Y.K., E. Duhoux, M. Batcho (1995) Micropropagation "in vitro" d'arbres adultes de *Faidherbia albida* (Del.) A. Chev. (syn *Acacia albida* (Del.) et rôle du Phloroglucinol (soumis)

Geiger S.C., Vandenbelt R.J., Manu A. (1992) Pre-existing soil fertility and the variable growth of *Faidherbia albida*. p 121-125 In: Vandenbelt R.J. Eds *Faidherbia albida* in the west African semi- arid tropics : Proceed. of a Workshop 22-26 Apr. 1991 ICRISAT Niamey Niger

Gharyal P.K., Maheswari S.C. (1981) In vitro differentiation of somatic embryoids in a leguminous tree *Albizia lebeck* L. Naturwissenschaften 68: 379-381

Giffard P.L. (1964) Les possibilités de reboisement en *Acacia albida* au Sénégal. Bois et Forêts des tropiques N° 95

- Giffard P.L. (1977)** L'arbre dans le paysage sénégalais CITE 131 p.
- Goforth P.L., Torrey J.G. (1977)** The development of isolated roots of *Cromptonia peregrina* (Myricaceae) in culture. Amer. J. Bot. 64: 476-482
- Gordon-Gray K.D., Ward C.J. (1975)** A contribution to the knowledge of floral variation in *Acacia karoo* in Southern Africa. Boissera 24: 279-284
- Graham P.H et Temple P.R. (1984)** Selection of improved nitrogen fixation in *Glycine max* (L.) Merr. and *Phaseolus vulgaris* L. Plant & Soil 82: 315-327
- Gueye M. (1992)** *Acacia albida* : nodulation by fast and slow growing Rhizobia p 145-147 In: Vandenbelt R.J. Eds *Faidherbia albida* in the west African semi- arid tropics : Proceed. of a Workshop 22-26 Apr. 1991 ICRISAT Niamey Niger
- Guinet P. (1969)** Les Mimosacées: Etude de palynologie fondamentale, corrélations, évolution. Institut français de Pondichéry. Travaux de la section scientifique et technique 293 p
- Guinet P., Vassal J. (1978)** Hypotheses on the differentiation of the major group in the genus *Acacia* (Leguminosae) Kew Bull. 32(3): 509-527
- Gupta P.K., Durzan D.J. (1986)** Somatic polyembryogenesis from callus of mature sugar pine embryos Bio/Technology 4: 463-465
- Habte M., Aziz T. (1985)** The influence of soil irradiation and mycorrhizal inoculation on nodulation and growth of *Sesbania grandiflora* var. N87. Nitrogen Fixing Tree Research Reports 3: 57-59
- Hackett W.P. (1985)** Juvenility, maturation and rejuvenation in woody plant. Hort. Reviews 7:109-115
- Hackett W.P., Murray J.R. Smith A. (1992)** Control of maturation in woody species p 83-90 in Eds AFOCEL "Production de variétés génétiquement améliorées d'espèces forestières à croissance rapide" Actes Symp. Bordeaux FRANCE
- Hackett W.P., Murray J.R., A. Smith (1992)** Control of maturation in woody species p 91-94 Eds AFOCEL/IUFRO in "Production de variétés génétiques améliorées d'espèces forestières à croissance rapide. Proceed. Symposium Bordeaux France
- Hadrami I., Michaux-Ferrière N., Carron M-P Auzac J. (1989)** Les polyamines, facteur limitant possible de l'embryogénèse somatique chez *Hevea brasiliensis*. C. R. Acad Sci Paris T. 308 série III : 205- 211
- Haines R.J. (1992)** Mass propagation by cuttings: biotechnologies and the capture of genetic gain. p 137-150 Eds AFOCEL Proceed. Symp. "Production de variétés génétiquement améliorées d'essences forestières à croissance rapide " Bordeaux France 1992
- Halevy G. (1971)** A study of *Acacia albida* in Israel. La Yaraan N° 21:1-15
- Halliday J., Somasegaran P. (1984)** The rhizobium germplasm resource at NIFTAL, Catalog of strains. University of Hawaii USA
- Hanna W.W., Lu C.Y., Vasil J.K. (1984)** Uniformity of plants regenerated from somatic embryos of *Panicum maximum* Jacq. Theoretical and Applied Genetics 67: 155- 159
- Hanning G.E., B.V Conger (1986)** Factors influencing somatic embryogenesis from cultured leaf segments of *Dactylis glomerata*. J. Plant. Physiol Vol N° 123: 23-29
- Hanower J., P. Hanower (1984)** Inhibition et stimulation en culture "in vitro" de l'embryogénèse de souches issues d'explants foliaires de palmier à huile. C.R. Acad. Sci. Paris 298: 45-48
- Hardy R.W.F., Holsten R.D., Jackson E.K., Burns R.C. (1968)** The Acetylene Ethylene assay for N² fixation Plant Physiol. 43: 1185-1207
- Harmand J.M., N'Djiti C.F. (1992)** *Faidherbia albida* in Northern Cameroon : Provenance trials and crop associations. p 79-81 In: Vandenbelt R.J. Eds *Faidherbia albida* in the west African semi- arid tropics : Proceed. of a Workshop 22-26 Apr. 1991 ICRISAT Niamey Niger

- Hartwig V.A., Maxwell C.A., Joseph C.M., Philipps D.A. (1990)** Chrysoeriol and luteolin released from alfalfa seed induced root nod genes in *Rhizobium melliloti*. J. plant Physiol. 92 p 116-122
- Heichel G.H., Vance P. (1983)** Physiology and morphology of perennial legumes In: "Nitrogen fixation: Legumes Vol 3 p 99-143 Broughton W.J. Eds Oxford
- Heller R. (1991)** Physiologie végétale I: Nutrition Eds Masson 4ème 237 p
- Herridge D.F., Roughley R.J. (1975)** Variation in colony characteristics and symbiotic effectiveness of *Rhizobium*. J. Applied Bact. 38 p 19-27
- Hervoüet J.P. (1992)** *Faidherbia albida* : A witness of agrarian transformation p 165-169 In: Vandenberg R.J. Eds *Faidherbia albida* in the west African semi- arid tropics : Proceed. of a Workshop 22-26 Apr. 1991 ICRISAT Niamey Niger
- Heslop-Harrison J. (1975)** Incompatibility and the pollen stigma interaction Ann. Rev. Plant Physiol. 26 p 403-425
- Heslop-Harrison J., Heslop-Harrison Y. (1983)** Pollen stigma interaction in the Leguminose. The secretory system of the style in *Trifolium pratense* cultivar saltiron. Ann. Bot. (London) 50: 635-646
- Heslop-Harrison J., Heslop-Harrison Y., Shivanna K.R. (1984)** The evaluation of pollen quality and a further appraisal of the fluorochromatic (FCR) test procedure. Theor. Applied Genet. 67 : 367-373
- Heslop-harrison J., Dickinson H.G., (1969)** Time relationships of sporopollenin synthesis associated with tapetum and microspores in *Lilium*. Planta 84: 199-214
- Heyser J.W. et Nabors M.W. (1982)** Regeneration of millet from embryogenic calli derived from various plant parts. Crop. Sci. 22: 1070-1074
- Heyser J.W., Dykes T.A., de Mott K.J., Nabors M.W., (1983)** High frequency long term regeneration of rice from callus culture. Pl. Sci. Lett. 29: 175-182
- Hirsch A.M. (1992)** Developmental biology of legume nodulation. New Phytolog. 122 : 211- 237
- Hoagland D.R., Arnon D. I. (1950)** The water culture method for growing plants without soil. Calif. Exp. Stn. Circ. N°347
- Hogberg P., Kvarnström M. (1982)** Nitrogen fixation by woody legume *Leucaena leucocephala* L. Lam. de Witt.in Tanzania. Plant & Soil 66: 21-28
- Holliday R., Pugh J.E. (1975)** DNA modification mechanism and gene activity during development. Science 187: 226-232
- Hutton E.M. (1983)** Selection and breeding for *Leucaena* for very acid soils. p 23-26 In : Eds CRDI *Leucaena* research in the asian pacific region A. Chouinard (Ed)
- Isikawa H. (1987)** *Leucaena*. In *Leucaena* research in the Asian -Pacific region Proc. of a workshop Singapore 1982 IDRC p23-26
- Janick J. (1986)** Embryogenesis: the technology of obtaining useful products from the culture of asexual embryos. in " Biotechnology of Plants and microorganisms " OHIO State University Press Columbus p 97-117
- Jarvis B.C., Shannon P.R., Yasmin S. (1983)** Involvement of polyamines with adventitious root development in stem cuttings of mung bean. Plant Cell Physiol. 24: 677-683
- Jelaska S. (1981)** Bud regeneration in *Pinus nigra* embryo and seedling tissue culture. In Eds AFOCEL Proceedings colloque AFOCEL sur la culture "in vitro" des essences forestières Bordeaux France
- Joly H. (1992)** The genetics of *Acacia albida* (*Faidherbia albida*). In: Vandenberg R.J. Eds *Faidherbia albida* in the west African semi- arid tropics : Proceed. of a Workshop 22-26 Apr. 1991 ICRISAT Niamey Niger
- Jones O.P. (1976)** Effect of Phloridazin and Phloroglucinol on apple shoots . Nature (London) XXX : 392-393

Jordan D.C. (1984) Rhizobiacées Conn. 1938 321^{ai} in N.R. Krieg and J.C. Holt (Eds) Bergey's manual of systematic bacteriol. Vol. 1 The William & Co Baltimore p 234-256

Jung G. (1967) Influence de l'*Acacia albida* sur la biologie des sols Dior. OSTOM

Jung G. (1970) : Variations saisonnières des caractéristiques microbiologiques d'un sol ferrugineux tropical peu lessivé (Dior) soumis ou non à l'influence de l'*Acacia albida* . Occol. Plant. Gauthiers -Villars.

Kammen van A.(1984) Suggested nomenclature for plant genes involved in nodulation and symbiosis. Plant Mol. Rep. 2: 43-45

Kamo K., Beckwar M.R., Hodges T.K. (1985) Regeneration of *Zea mays* L. from embryogenic callus. Bot. Gaz. N° 146: 327-334

Kang B.T., Duguma B. (1983) Nitrogen management in alley cropping systems. p 269-284 *in* : B.T. Kang and J. Van der Heide Eds Nitrogen management in farming systems in humid and sub-humid tropics. Inst. Soil fert. Haren, Netherlands

Karp A., Maddock S.E. (1984) Chromosome variation in wheat plants regenerated from cultured immature embryos. Theoretical and Applied genetics 67: 249-257

Karshon R., (1976) Clonal growth patterns of *Acacia albida* Del. Bull. Intern. group for the Study of Mimosoidae 4 : 28-30

Kato H.M., Takeuchi M. (1963) Morphogenesis in vitro starting with single cell of carrot root. Plant Cell Physiol. 4: 243

Kefford V.P., Caso O.H (1972) Organ regeneration of excised roots of *Chondrella juncea* and its chemical regulation. Australian Journal of Biological Science 25: 691-706

^ **Kenrick et Knox (1989)** Pollen-Pistil interactions in Leguminosae (Mimosoidae) C.H. Stirton & J.L. Zaruchi (Eds) Advances in legume biology Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. 29: 127-156

Kenrick J., Kaul V., Williams E.G. (1986) Self-incompatibility in *Acacia retinodes* : site of pollen tube arrest in the nucellus. Planta 169: 245-250

∇ **Kenrick J., Knox R.B (1989)** Quantitative analysis of the self-incompatibility in trees of seven species of *Acacia*. J. Heredity 80 : 240-245

Kenrick J., Knox R.B. (1981) Structure and histochemistry of the stigma and style of some Australian species of *Acacia*. Aust. J. bot. 29: 733-745

Kenrick J., Knox R.B. (1982) Function of polyad in reproduction of *Acacia*. Ann. Bot. 50: 721-727

Kenrick J., Knox R.B. (1984) Pollen-stigma interactions in *Acacia* . Bull IGSM 12: 71-72

Kenrick J., Knox R.B. (1985) Self-incompatibility in the nitrogen fixing tree *Acacia retinodes* quantitative cytology of pollen tube growth . Theor. Appl. Genet. 69: 481-488

Kevers C., Gaspar T., A. Creve-cœur (1985) Nature et teneur des polyamines de cals normaux et habitués de betterave - sucrière effet des régulateurs de croissance du milieu de culture. Botan. Helvet. N° 95/1: 117-120

Keyes G.J. , Collins G.B., Taylor N.L. (1980) Genetic variation in tissue of red clover . Theor. Appl. Genet. 58: 265-271

Kijne J.W. (1975) The fine structure of pea root nodules 1: vacuolar changes after endocytic host cell infection by *Rhizobium leguminosarum* . Physiol. Pathol. 5: 75-79

Knox B.R., Kenrick J., Jobson S., Dumas C. (1989) Reproductive function in the Mimosoidae Legume *Acacia retinodes* : Ultrastructural and cytochemical characteristics of stigma receptivity. Aust. J. Bot. 37: 103-124

Knox R.B., Kenrick J., Jobson S., Bernardht P., MarginsonR., beresford G., Baker I., Baker H.G (1985) Extra-floral nectaries as adaptations for bird pollination in *Acacia terminalis* . Amer. J. Bot. 72: 1185-1196

- Knox R.B., Kenrick J. (1983)** Polyad function in relation to the breeding system of *Acacia* p 411-417 in D. Mulcahy & E. Ottaviano (Eds.) *Pollen Biology* Elsevier North-Holland
- Koffa S.N., Mori T. (1987)** Effect of Ph and aluminium toxicity on the growth of four strains of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. *Leucaena research reports* 3: 58-62
- Kononowicz A. K. et Janick J.A (1984 a)** In vitro development of zygotic embryos of *Theobroma cacao* L. *J. Amer. Soc. Hort. Science* 109: 266-269
- Kononowicz A.K., Janick J.A (1984)b** Response of embryogenic callus of *Theobroma cacao* L. to gibberellic acid and inhibitors of gibberellic acid synthesis. *Z. Pflanzenphysiol.* 113: 359-366
- Laike A. (1992)** *Faidherbia albida* in the traditional farming systems of Central Aethiopia p 39-41 *In: Vandenbelt R.J. Eds Faidherbia albida in the west African semi- arid tropics : Proceed. of a Workshop 22-26 Apr. 1991* ICRISAT Niamey Niger
- Lajudie P. Willems A., Pot B., Dewettings D., Maestrojuan G., Neyra M., Collins M.D., Deryfus B., Kersters K., Gillis M. (1994)** Polyphasic taxonomy of Rhizobia : Emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb . nov. , *Sinorhizobium sahelii* sp. nov. , and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *Intern J. Bacteriol.* 44(4) : 715-733
- Lakshmi -Sita G., Ram R. Vaidyanathan C.S (1980)** Triploid plants from endosperm cultures of Sandalwood by experimental embryogenesis. *Plant Sci. Lett.* 20: 63-69
- Lancelle S.A., Torrey J.G. (1984)** Early development of Rhizobium-induced root nodules of *Parasponia rigida* L. Infection and early nodule initiation. *Protoplasma* 123: 26-37
- Lara M., Cullimore J.V., Lea P.J. Mifflin B.J., Johnston A.W.B., Lamb J.W. (1983)** Appearance of a novel form of plant glutamine synthetase during nodule development in *Phaseolus vulgaris* . *Planta* 157: 254- 258
- Lawrie A.C. (1983)** Relationships among Rhizobia from native Australian legumes. *Appl. Envir. Microbiol.* 45: 1822-1828
- Lazzeri P.A., Dunwell J.M. (1984)** In vitro shoot regeneration from seedling roots segments of *Brassica oleracea* and *Brassica napus* cultivars. *Annals of Botany* 54: 341- 350
- Leakey R.R.B., Dick J. Mc P., Newton A.C. (1992)** Stockplant derived variation in rooting ability : the source of physiological youth. p171-178 in Eds AFOCEL. "Production de variétés génétiquement améliorées d'espèces forsières à croissance rapide" Actes Symp. Bordeaux France
- Lebrun J. (1968)** A propos du rythme végétatif de l'*Acacia albida* . Del., *Collectanea Botanica* VII - II- 33
- Legocki R.P., Verma D.P.S. (1980)** Identification of "nodule specific" host proteins (nodulins) involved in the development of Rhizobium -legume symbiosis. *Cell* 20: 153-163
- Lerouge P., Roche P., Faucher C., Maillet F., Truchet G., Promé J.C., et Denarié J. (1990)** Symbiotic host specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulfated and acylated glucosamine oligo-saccharide signal. *Nature* 344: 781-784
- Lesueur D., Diem H.G., Dianda M., Leroux C. (1992)** Selection of Bradyrhizobium strains and provenances of *Acacia mangium* and *Faidherbia albida* : Relationships with tolerance to acidity and aluminium. *Plant & Soil*
- Letacon F. (1989)** Stratégies possibles pour lutter contre la dégradation des écosystèmes forestiers p 195-202 *In* Eds IFS Stockholm Sweden "Trees for development in sub-saharan Africa " *Proceed. IFS Kenya 1989*
- Libbenga K.R Bogers R.J. (1974)** Root nodule morphogenesis p 430-472 *In: The biology of nitrogen fixation* (Eds A. Quispel) North Holland Publishing & Co Amsterdam.

- Libbenga K.R., Harkes P.A.A. (1973)** Initial proliferation of cortical cells in the formation of root nodulin *Pisum sativum*. *Planta*. 116: 17-28
- Libby W.J. (1983)** The clonal option. *Norsk Inst. Skogfornskings* 1432 AS NLJ1 Norway p 3-32
- Lie T.A. (1974)** Environmental effects on nodulation and nitrogen fixation. In "The biology of nitrogen fixation" Quispel A. Eds Amsterdam p 555-582
- Lie T.A., Van Egeraat A.W.S. (1988)** Iron Ethylene diamine tetra acetic acid, a specific inhibitor for root nodule formation in the legume-Rhizobium symbiosis. *J. Plant Nutrit.* 11: 1025-1031
- Lis H. et Sharon N. (1986)** Lectins as molecules and as tools. *Annu. Rev. Biochem.* 55:35-67
- Lison L. (1960)** Histochimie et cytochimie animale. Principes et méthodes. Gauthiers-Villars. Paris
- Litz R.E. (1986)** Effect of osmotic stress on somatic embryogenesis in *Carica* suspension cultures. *J. Amer. Hort. Sci.* 111: 969-972
- Lloyd D. (1980)** Sexual strategies in plants : I- An hypothesis of serial maternal investments during one reproductive session. *The New Phytologist* 86: 69-79
- Lloyd G., Mc Cown (1980)** Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture. *Proc. Inter Plant Propagators Soc.* 30: 421-427
- Louppe D., Ouattara N. (1992)** Growth of *Faidherbia albida* in Nurseries: Standard production techniques or air pruning ? p 141-143 In: Vandenberg R.J. Eds *Faidherbia albida* in the west African semi- arid tropics : Proceed. of a Workshop 22-26 Apr. 1991 ICRISAT Niamey Niger
- Lowe K., Taylor B., Ryan P., Palerson K.E., (1985)** Plant regeneration via organogenesis and embryogenesis in the maize inbred line B 73. *Plant Science* 41: 125-132
- Lugtenberg B.J.J, Diaz C., Smit G., de Pater S.J., Kijne J.W. (1991)** Role of the lectin in the Rhizobium-Legume symbiosis. In : *Advances in molecular genetics of plant-Microbe interactions Vol 1* (Eds Hennecke & DPS verma) p 174-181 Kluwer Academic Publishers Dordrecht
- Lustinec J., J. Horak (1970)** Induced regeneration of plants in tissue culture of *Brassica oleracea*. *Experiencia* 26: 910- 915
- Maheswaran E.G., Williams G. (1986)** Primary and secondary direct somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Brassica campestris*. *J. Plant Physiol.* 124 : 455-463
- Maheswaran G., E.G. Williams (1985)** Origin and development of somatic embryoids formed directly on immature embryos of *Trifolium repens* "in vitro". *Annals of Botan.* 56: 619-630
- Margara J. (1978)** Mise au point d'une gamme de milieux minéraux pour les conditions de la culture "in vitro". *C. R. Acad. Agr. Fr.* 8: 654-661
- Margara J. (1982)** Bases de la multiplication végétative : les méristèmes et l'organogénèse. Eds INRA Paris 162 p
- Marginson R., Sedgley M., Knox R.B. (1985)** Physiology of post-pollination exsudate production in Acacia. *J. Exp. Bot.* 36(171): 1660-1668
- Mariotti A., Sougoufara B., Y.R. Dommergues (1992)** Estimation de la fixation d'azote atmosphérique par le traçage isotopique naturel dans une plantation de *Casuarina equisetifolia* (Forst.). *Soil. Biol. Bioch.* 24: 647-653
- Martin B., Quillet G. (1974)** Bouturage des arbres forestiers au Congo. Résultats des essais effectués à Pointe noire de 1960 à 1973. *Bois et Forêts des Tropiques* N° 154,155,156,157
- Matthews A., Bernard C., P. Gresshoff (1987)** Characterisation of nodulation mutants of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) : Bradyrhizobium effects and absence of root hair curling. *J. Plant. Physiol.* 331: 349-361

- Mc Auliffe C., Chamblee D.S., Uribe-Arango H., W.W. Jr. Woodhouse (1958)** Influence of inorganic nitrogen or nitrogen fixation by legumes as revealed by ^{15}N . *Agronomy Journal* 55: 334-337
- Mc Cown B.H., Selmer J.C (1987)** General media and vessels suitable for woody plant culture. *In* Bonga et Durzan (eds) "Cell and tissue culture in forestry" Vol 1 p 4-16 Martinus Nijhoff Publishers Dordrecht
- Mc Cown D.D., Mc Cown B.H. (1987)** North american hardwoods p 247-260 *In* Bonga et Durzan (eds) "cell and tissue culture in forestry" Vol 3 Martinus Nijhoff Publishers Dordrecht
- Mc Coy T.J, Philipps R.L. (1982)** Chromosome stability in maize (*Zea mays* L.) tissue culture and sectoring in some regenerated plants. *Can. J. Genet. Cytol.* 24:559-565
- Mc Coy T.J., Philipps R.L., Rines H.W. (1982)** Cytogenetic analysis of plants regenerated from oats (*Ravena sativa*) tissue culture ; high frequency of partial chromosome loss. *Can. J. Genet. Cytol.* 24: 337-350
- Mc Gahuey M. (1985)** Impact of forestry initiatives in the Sahel on production of food, fodder, and wood. Chemonics International diffusion limitée.
- Mc Gahuey M. (1992)** Extension of *Acacia albida* : recapitalization of the natural ressource base p 159-164 *In*: Vandebelt R.J. Eds *Faidherbia albida* in the west African semi- arid tropics : Proceed. of a Workshop 22-26 Apr. 1991 ICRISAT Niamey Niger
- Meins F.J. Binns A.N. (1978)** Epigenetic clonal variation in the requirement of plant cells for cytokinins. p 185-200 *In* "The clonal basis of development" 3th Symp. of the Soc. for the developmental biology Acad. Press
- Mengoli M. N. Bagni, G. Luccarini , V.N. Ronchi (1989)** *Daucus carota* cell cultures: Polyamines and effect of polyamine biosynthesis inhibitors in the pre-embryogenic phase and different embryos stages. *J. Plant Physiol.* 134: 389-394
- Michaux-Ferrière N., Dublin P., Schwendiman J. (1987)** Etude histologique de l'embryogénèse somatique à partir d'explants foliaires de *Coffea arabica*. *Café Cacao Thé* (Paris) Vol XXXI N°2: 103-111
- Miehe S. (1986)** *Acacia albida* and other multipurpose trees on the fur farmlands in the Jebel Mara highlands, Western Darfur Sudan. *Agroforestry systems* 4(2): 89-119
- Milton S. (1987)** Phenology of seven *Acacia* species in South Africa. *S. Afric. Wild Research* 17 (1): 1-6
- Milton S.J., A.V. Hall (1981)** Reproductive biology of Australian *Acacias* in the south-western cape province South Africa. *Trans Roy. Soc. Afric.* 44: 465-487
- Minchin F.R., Pate J.R. (1973)** The carbon balance of a legume and the functional economy of its root nodules. *J. Exper. Bot.* 24 : 259-271
- Minchin F.R., Summerfield R.J. , Hadlet P., Roberts E.H. Rawsthorne S. (1981)** Carbon and nitrogen nutrition of nodulated roots of grain legumes. *Plant, Cell and environnement* 4:5-26
- Minocha C.S. (1982)** Role of the source of nitrogen in the growth of shoot tips and callus culture in woody plants. p 227- 234 *In* Eds AFOCEL. Colloque Afocel "La culture "in vitro" des essences forestières" Fontainebleau France 1982
- Mirosława F., Oledska L., D. Sowinska (1984)** Regeneration of plants by embryogenesis with callus cultures of *Carum carvi* *J. Plant Physiol.* Vol 115: 209-210
- Moens P. (1984)** Developpement de l'ovule et embryogénèse chez *Coffea canephora* . *La cellule* (Louvain) Vol 65:129-147
- Moffett A.A (1956)** Genetical studies in *Acacias*. I. The estimation of natural crossing in Black Wattle. *Heredity* 10: 57-67
- Mok C.M., D.W.S. Mok, Turner J.E., C.V. Mujer (1987)** Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenyl-urea derivatives in tissue culture systems. *Hortscience* 22 (6): 1194-1197
- Moncousin C. (1982)** 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 "in vitro". Thèse de Doctorat d'Ingénieur Université Paris Sud-Orsay 210 p

- Montaguë M.J., Koppenbrinck J.W., L. Jaworski (1978)** Polyamine metabolism in embryogenic cells of *Daucus carota*. Plant Physiol. Vol 62: 89-95
- Monteuuis O., Nasi R. (1992)** Possible mass production options for *Acacia mangium* plantation in Sabah (Malaysia). p 73-85
- Mukhopadhyay A., Mohan Ram H.Y. (1981)** Regeneration of plantlets from excised roots of *Dalbergia sissoo*. Indian Journal of Experimental Biology 19:1113-1115
- Mullins M.G., Srinivasan C. (1976)** Somatic embryos and plantlets from an ancient clone of grapevine by apomixis "in vitro". J. Exper. Bot. 27:1022-1030
- Munns D.L. et Fox R.L. (1977)** Comparative lime requirements of tropical and temperate legumes. Plant & soil 46: 533-548
- Munns D.N. (1968)** Nodulation of *Medicago sativa* in solution culture III : Effect of nitrate on root hairs and infection. Plant Soil 29: 33-39
- Murashige T., Skoog F. (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-497
- N'Doye I., de Billy F., Vasse J., Dreyfus B., Truchet G., (1994)** Root nodulation of *Sesbania rostrata*. J. Bacteriol. 176: 1060-1068
- Naraschimaichar S.G. (1948)** A contribution to the embryology of *Acacia farnesiana* L. (willd.). Proc. Indian Acad. Sci. 28: 144-149
- Nasrallah J.B., Kao T.H., Goldberg M.L., Nasrallah M.E., (1985)** A cDNA clone encoding an S-locus-specific glycoprotein from *Brassica oleracea*. Nature 316 : 263-267
- National Academy of Science (1979)** Tropical legumes: Resources for the future NAS Washington D.C. 331p
- Nettancourt de D. (1977)** Incompatibility in Angiosperms. Springer Verlag, Berlin p 230
- Newcomb W. (1980)** Nodule morphogenesis and differentiation p 247-294 in "Biology of Rhizobiacae suppl. 13 International Review of Cytology. K.L. Giles and A.G. Arthley (Ed.) Academic press
- Newcomb W. Siepel D., Peterson R.L. (1979)** The early morphogenesis of *Glycine max* and *Pisum sativum* root nodules. Can. J. Bot. 57: 2603-2616
- Newcomb W., McIntyre L., (1981)** Development of root nodules of mung bean (*Vigna radiata*): a reinvestigation of endocytosis. Can. J. Bot. 59 : 2478-2499
- Nikiema A., Tolkamp G.W. (1992)** Propagation of *Faidherbia albida* by cuttings : Experience of the national forest seed center p 97- 100 In: Vandenbelt R.J. Eds *Faidherbia albida* in the west African semi- arid tropics : Proceed. of a Workshop 22-26 Apr. 1991 ICRISAT Niamey Niger
- Nikles D.G. (1981)** Future directions for research development and training in breeding technologies for tropical Acacias. p 9-11 In ACIAR Proceedings N° 37
- Nitsch J.P., Nitsch C. (1965)** Néoformation de fleurs "in vitro" chez une espèce de jours courts: *Plumbago indica* L. Ann. Physiol. Végét. 7 : 251 - 256
- Nongonierma A., (1978)** Contribution à l'étude biosystématique du genre *Acacia* Miller en Afrique occidentale. Thèse de Doctorat d'état Tome 1 : Texte (451 p) Tome 2: Tableaux (314 p)Tome 3 : Planches figures et cartes (406 p)
- North C. (1953)** Experiments with root cuttings of brussel sprouts. Annals of Applied Biology 40: 250-261
- Nozeran R. (1978)** Polymorphisme des individus issus de la multiplication végétative des végétaux supérieurs avec conservation du potentiel génétique. Physiol. Végét. 16: 177-194
- Nutman P.S. (1952)** Study on the physiology of nodule formation. III Experiments on the excision of root -tips and nodules. Ann. Bot. N.S. 16: 79-101

- Nutman P.S. (1956)** The influence of the legume in root nodule symbiosis. *Biological Review* 31: 109-151
- Olofinboba A.O. (1969)** Seasonal variation in the carbohydrates in the xylem of *Antiaris africana*. *Ann. Bot.* 33: 339-349
- Osunde A.O. (1992)** Response of *Gliricidia sepium* to Rhizobium and VA-mycorrhizal fungi inoculation. p 156-164 *In* Eds ORSTOM/ FIS " Interaction plantes - micro-organismes " Proc. Seminaire FIS/ ORSTOM Dakar 1992
- Osunde A.O., Sanginga N. (1989)** Growth and nitrogen fixation of *Leucaena leucocephala* and *Gliricidia sepium* lines grown on an ultisol from South Eastern Nigeria p 271-277 *In* Trees for development "Seminaire FIS Nairobi Kenya
- Pal A. Banerjee A. Dhar K. (1985)** In vitro organogenesis and somatic embryogenesis from leaf explants of *Leucocephalum carum* s.m. *Plant Cell Reports* 4: 281-284
- Palmberg C. (1986)** Evaluation des ressources génétiques d'essences arborées des zones arides et semi-arides. Rapport FAO Rome 1986
- Pannetier C., Buffard-Morel (1982)** Production of somatic embryos from leaf tissues of coconut, *Cocos nucifera* L. p 755-756 *In* A Fudjyama Eds Plant tissue culture Proceed. 5th international Congress in Plant tissue cell culture
- Pate J.S, Gunning B.E.S, Briarty L.G. (1969)** Ultrastructure and functioning of the transport system of the leguminous root nodule. *Planta* 85: 11-34
- Pedley L., (1986)** Derivation and dispersal of Acacia (leguminosae) with particular reference to Australia and the recognition of Senegalia and Racosperma. *Bot. J. Linn. Soc.* 92: 219-254
- Pelissier P.(1966)** Les paysans du Sénégal . Les civilisations agraires du Cayor à la Casamance. Sain -Yriex, France 939 p
- Pelissier P., (1980)** L'arbre dans les paysages agraires de l'Afrique noire. L'arbre en Afrique tropicale: la fonction et le signe. Cahiers ORSTOM Série Sciences Humaines 17(3): 130-136
- Peterson R.L. (1975)** The initiation and development of root buds. p 125-161 *In* "The initiation and development of root buds " Eds J.G. Torrey and D.T. Clarkson Academic press New York
- Phelep M., Petit A., Martin L., Duhoux E. (1990)** Transformation and regeneration of a nitrogen fixing tree. *Biotechnology* : 251 - 256
- Philipps D.A. (1971)** Abscissic acid inhibition of root nodules initiation in *Pisum sativum* . *Planta* 100: 191-190
- Poschen P. (1986)** An evaluation of the *Acacia albida* based on agroforestry practices in the Hararge Highlands of Eastern Ethiopia. *Agroforestry Systems* 4 : 129- 143
- Prin Y., P. Reddell (1993)** Les stades précoces de la nodulation chez *Acacia mangium* . Bois et Forêts des Tropiques N° 238:29
- Quoirin M., Lepoivre P. (1977)** Etude de milieux adaptés aux cultures "in vitro" du genre *Prunus*. *Act. Hort.* N° 78 : 437-442
- Rao H.S. (1954)** Pollination mechanism of *Acacia catechu*. *J. Ind. Bot. Soc.* 33 : 93-97
- Rao S.K. (1986)** Plantlets from somatic callus of the east Indian rosewood (*Dalbergia latifolia* Roxb.). *Plant Cell Reports* 3: 199-201
- Reed J.D., Rittner U., Tanner J., Wiegand O. (1992)** Nutritive value of leaves and fruits of *Faidherbia albida* and their uses for feeding ruminants p 43-49 *In*: Vandenberg R.J. Eds *Faidherbia albida* in the west African semi- arid tropics : Proceed. of a Workshop 22-26 Apr. 1991 ICRISAT Niamey Niger
- Reynolds J.F. (1982)** Vegetative propagation of palm trees. p 182-207 *In* "tissue culture in forestry Eds Bonga et Durzan Martinus Nijhoff Publishers N.V. the Hague Netherlands Press .

- Riffaud J.L., Cornu D., (1981)** Utilisation de la culture "in vitro" pour la multiplication de mérisiers adultes (*Prunus avium* L.) sélectionnés en forêt. *Agronomie* 1(8) : 633-640
- Rigaud J. (1981)** Comparison of the efficiency of nitrate and nitrogen fixation in crop yield. p 17-48 In "Nitrogen and carbon metabolism" Eds Bewley J.D Martinus Nijhoff Publishers, The Hague Netherlands
- Robbertse P.J. (1974)** The genus *Acacia* in South Africa II. with special reference to the morphology of the flowers and the inflorescence. *Phytomorphology* 24: 1-2
- Robbertse P.J., Venter G., van Rensburg J.H. (1980)** The wood anatomy of South african *Acacias* IAWA Bull. 1 (3): 93-103
- Roberts A.N. (1979)** Progress in propagation of Douglas fir. p 20-24 In : "Christmas trees from cuttings in North West lookout" Sept 1979
- Robinson J.C., W.W. Swabe (1977)** Studies of the regeneration of apple cultivars from root cuttings I: Propagation aspects. *Journ. Hort. Sci.* 52 : 205-220
- Robson A. D. (1983)** Mineral nutrition. In "Nitrogen fixation" Vol.3 : Legumes Ed. W. J. Broughton p 37-55
- Roskoksi J.P., Castilleja G., Frias I., Pardo E., Vargas A., (1980)** Woody tropical legumes: potential sources of forage, firewood and soil enrichment. p 135-155 In "Tree crops for energy co--production on farms". National Technical information service Springfield VA
- Roskoski J.P. (1981)** Nodulation and N₂ fixation in *Inga juicuil*, a woody perennial legume in coffee plantations I. measurement of nodule biomass and field C₂H₂ reduction rates. *Plant & Soil* 59 : 201-206
- Roskoski J.P., Pepper I., Pardo E. (1986)** Inoculation of leguminous trees with Rhizobia and VA Mycorrhizal fungi. *Forest Ecology and mangement* 16: 57-68
- Ross J.H. (1966)** *Acacia albida* Del.. *Africa Boll. Soc. Broteriana* 2 (40) : 187-205
- Ross J.H. (1981)** An analysis of the african *Acacia albida* species : their distribution possible origins and relationships. *Bothalia* 13 (3-4) : 389-413
- Roustan J.P., Latche A., Fallot J. (1990)** Control of carrot somatic embryogenesis by AgNO₃ an inhibitor of ethylene action effect on arginine decarboxylase activity. *Plant Science* 67 : 89-95
- Rundell P., Nielsen E.T., Sharifi M.R., Virginia R.A., Jarrell W.M., Kohl D.H., Shearer G.B (1982)** Seasonal dynamics of nitrogen cycling for a *Prosopis* woodland in the sonoran desert. *Plant & Soil* 64 : 31-42
- Sanginga N., Mulongoy K., Ayanaba A. (1988)** Nitrogen fixation of field inoculated *Leucaena leucocephala* L. Lam. de Witt. estimated by the 15N and the difference method. *Plant & Soil* 117 : 269-274
- Sanginga N., Bowen G.D., Danso S.K.A (1990)** Assessment of genetic variability for N₂ fixation between and within provenances of *Leucaena leucocephala* and *Acacia albida* estimated by 15N labelling techniques. *Plant & Soil* 127: 169-178
- Sanginga N., Bowen G.D., Danso S.K.A (1990)** Genetic variability in symbiotic nitrogen fixation within and between provenances of two *Casuarina* species using the 15N labelling methods. *Soil Biol. Bioch.* 22 : 539-547
- Sanginga N., Mulongoy K., Ayanaba (1988)** Nodulation and growth of *Leucaena leucocephala* L. Lam. de Witt. as affected by inoculation and N-Fertilizer. *Plant & Soil* 112 : 129-135
- Sanginga N., Mulongoy K., Ayanaba A. (1985)** Effect of inoculation and mineral nutrients on nodulation and growth of *Leucaena leucocephala*. In *Biological nitrogen fixation* (H. Sali et S.O. Keya Eds.) Mircen Nairobi p 149-427
- Sanginga N., Mulongoy K., Ayanaba A. (1989)** Nitrogen fixation of field inoculated *Leucaena leucocephala* (L.am.) de Wit estimated by the 15N and the difference methods. *Plant & Soil* 117 : 269-274
- Sanginga N., Zappata F., Danso S.K.A., Bowen G.D.(1990)** Effect of successive cuttings on nodulation and nitrogen fixation of *Leucaena leucocephala* using 15N dilution and the difference methods. *Plant Nutrition Physiol. and Applications* : 667-674

Sangwan R.S., Sangwan B. S. (1985) Effet des rayons gamma sur l'embryogénèse somatique et l'androgénèse chez divers tissus végétaux cultivés "in vitro". p 181-184 *In* "Nuclear techniques and "in vitro" culture for plants improvement". Eds AIEA (Vienne)

Sauton A., Mouras A., Lutz A. (1982) Plant regeneration from citrus roots meristems. *J. Hort. Sci.* 57 : 227-231

Sawada H., Jeki H., Oyaizu H., Matsumoto S., (1983) Proposal for rejection of *Agrobacterium tumefaciens* and revised description for the genus *Agrobacterium* and for *Agrobacterium radiobacter* and *agrobacterium rhizogenes*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43: 694-702

Sedgley M., Harbard J., Smith R-M. (1992) Hybridisation techniques for Acacias ACIAR technical reports 20 p 3-11

Sedgley M., Harbard J., Smith R-M., Wickneswari R. Griffin A.R. (1992) Reproductive biology and interspecific hybridization of *Acacia mangium* and *Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth. (leguminosae: Mimosoidae) p.37-48 in ACIAR Proceedings N° 37

Shields W.J., Bockheim J.C. (1981) Deterioration of trembling Aspen clones in the great Lakes region. *Can. J. Forest. Res.* 1: 530-537

Sibi M. (1979) Expression of cryptic genetic factors *in vivo* and *in vitro* il: Zeven Ac; van Harten A.M. (eds) p 339-340 Proc. conf. Broadening genetic base crops Wageningen

Siedow J.N., Girvin M.E. (1980) Alternative respiratory pathway ; its role in seed respiration and its inhibition by propyl gallate. *Plant Physiol.* 65: 669-674

Sim G.L., Goh C.J., et Loh C.S. (1989) Micropropagation of *Citrus mitis* Blanco multiple bud formation from shoot and root explant in the presence of 6-Benzyl-aminopurine. *Plant Sci.* 59:203-210

Simon L., Stein A., Cote S., Lalode M. (1985) Performance of *in vitro* propagated *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn clones inoculated with *Frankia*. *Plant & Soil* 87:125-133

Skolmen R.G. (1986) *Acacia (Acacia koa Gray.)* in Biotechnology in Agriculture and forestry Vol 1 trees (Eds by Bajaj YPS) Springer-verlag Berlin

Skolmen R.G., Mapes M.O. (1976) *Acacia koa* gray plantlets from somatic callus tissue *J. Heredity* 67: 114-117

Snieszko R.A., Stewart H.T.L. (1989) Range wide provenance variation in growth and nutrition of *Acacia albida* propagated in Zimbabwe. *Forest Ecology and Management* 27: 179-197

Sommer H.E (1983) Organogenesis in woody angiosperms : applications to vegetative propagation. *Bull. Soc. Bot. Fr.* 130 Actual; Bot. 983: 79-85

Sondhal M.R., Spalinger D.A., Sharp W.R. (1978) A histological study of high frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. *Pflanzenphysiol.* bd. 94: 101-108

Songstad D.D., B.V. Conger (1986) Direct embryogenesis from cultured anthers and pistils of *Dactylis glomerata* . *Amer. J. Bot.* 73(7) : 989-992

Sougoufara B., Danso S.K.A., Diem H.G, Dommergues Y.R. (1990) Estimating N² fixation and N derived from soil by *Casuarina equisetifolia* using labelled ¹⁵N fertilizer: some problems and solutions. *Soil Biol. Biochem.* vol. 2(5) : 695-701

Sougoufara B., Diem H.G., Dommergues Y.R. (1989) Response of field grown *Casuarina equisetifolia* to inoculation with *Frankia* strains ORS 021001 entrapped with alginate beads. *Plant & Soil* 118: 133-137

- Sougoufara B., Duhoux E., Corbasson M., Dommergues Y.R (1987)** Improvement of the nitrogen fixation by *Casuarina equisetifolia* through clonal selection. *Arid Soil Research and Rehabilitation* 1 : 129-132
- Sougoufara B., Duhoux E., Dommergues Y.R (1989)** Choix des critères de sélection chez un arbre fixateur d'azote: *Casuarina equisetifolia* . *Acta Ecol. Plant.* 10(2): 215- 224
- Sprent J. , de Faria S.M.(1988)** Mechanisms of infection of plants by nitrogen fixing organisms. *Plant & Soil* 110: 157-165
- Sprent J. (1980)** Root nodule anatomy, type of export product and evolutionary origin in some Leguminosae. *Plant, Cell and Environment* 3 : 35-43
- Stanley R.G, Linskens H.F (1965)** Protein diffusion from germinating pollen. *Physiol. Plant.* 18: 37-43
- Starisky G. (1970)** Embryoid formation in callus tissues of *Coffea*. *Acta Botanica Neerlandica* 19 : 509-514
- Stolarz A. et H. Lorz (1986)** Somatic embryogenesis, "in vitro" multiplication and plant regeneration from immature embryo explants of hexaploid Triticale (*Triticum x secale* wittmack) *Z. Pflanzen zucht* 96: 353-362
- Sutton W.D. (1983)** Nodule development and senescence p 144-213 In "Nitrogen fixation" Vol. 3 : Legumes Eds. W. J. Broughton
- Swedlung B., Vasil I.K. (1985)** Cytogenetic characterisation of embryogenic callus and regenerated plants of *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum. *Theoretical and Applied Genetics* 69 : 575-581
- SY M.O, Martinnelli L, Scienza A. (1991)** In vitro organogenesis and regeneration in cashew (*Anacardium occidentale* L.). *Acta Horticulturae Plant biotechnology* 289:267-268
- Tabone T.J., Felker P., Bingham R.L., Reyes I., Loughret S. (1986)** Techniques in shoot multiplication of the leguminous tree *Prosopis alba* clone B2V50. *Forest Ecology and Management* 16 : 191-200
- Taté R., Patuarca E.J., Riccio A., Defez R., Laccarino M., (1994)** Development of *Phaseolus vulgaris* root nodules. *Am. Phytopathol. Soc.* 7 (5): 582-589
- Tisserat B., de Mason D. (1985)** The histological study of the development of adventive embryos in organ culture of *Phoenix dactylifera* L. *Ann. Bot.* 46: 465-472
- Torrekens P., Lemane I., Gambo S. (1992)** Trials of nine *Acacia albida* provenances in Dosso, Niger p 77-78 *In: Vandenbelt R.J. Eds Faidherbia albida* in the west African semi- arid tropics : Proceed. of a Workshop 22-26 Apr. 1991 ICRISAT Niamey Niger
- Torrey J.G. (1951)** Cambial formation in isolated pea roots following decapitation. *Am. J. Bot.* 38:596-604
- Torrey J.G. (1958)** Endogenous bud and root formation by isolated root of *Convolvulus* grown "in vitro". 33: 596-604
- Torrey J.G. (1965)** Physiological bases of organisation and development in the root. *In Encyclopedi of plant physiology* W. Ruhland Eds
- Torrey J.G. (1986)** Endogenous and exogenous influences on the regulation of lateral roots formation . p 31-66 *In New root formation in plants and cuttings* (Eds M.B. Jackson) Martinus Nijhoff publishers Dordrecht
- Torrey S.K. (1966)** The initiation of organised development in plants . *Adv. Morphol.* 5: 39-91
- Torrigiani P., Altamura M.M., Capitani F., Serafini-Fracassini D., Bagni N. (1989)** De novo root formation in thin cell layers of tobacco: changes in free and bound polyamines . *Physiologia Plantarum* 77:294-301
- Tran Thanh Van K. (1981)** Control of morphogenesis "in vitro" cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32: 291-311
- Tremblay F.M., Nesme X., Lalonde M. (1984)** Selection and micropropagation of nodulating and non-nodulating clones of *Alnus crispa* (Ait.) Pursch. *Plant & Soil* 78: 171-179
- Trochain J.L. (1969)** Le rythme phénologique aberrant de *Faidherbia albida* (Del.) A. Chev. (Mimosacée). *Annales scientifiques de l'Université de Besançon* 3 (6) : 7-13

- Truchet G., Camut S., de Billy F., Odorico R., Vasse G. (1989)** The Rhizobium-legume symbiosis : two methods to discriminate between nodules and other root-derived structures. *Protoplasma* 149 : 82-88
- Turgeon et Bauer (1982)** Early events in the infection of soybean by *Rhizobium japonicum* . Time course and cytology of the initial infection process. *Can J. Bot.* 60: 152-161
- Tybirk (1989)** Flowering pollination and seed production of *Acacia nilotica*. *Nordic J. Bot.* 9 : 375-381
- Tybirk K. (1993)** Pollination, breeding system and seed abortion in some African Acacias. *Bot J. Linn. Soc. London* 112: 107-137
- Tybirk K., Jorgensen A. (1991)** Floral biology and pollination of some African *Acacia* and *Faidherbia albida*. Proc of the 13th AETFAT congress Malawi (sous presse)
- Umali-Garcia M., Libuit J.S., Baggayan R.L. (1988)** Effects of Rhizobium inoculation on growth and nodulation of *Albizia falcataria* (L.) fosh. and *Acacia mangium* Willd. in the nursery. *Plant & Soil* 108: 71-78
- Vanstone V., Paton D.C (1988)** Extrafloral nectaries and pollination of *Acacia pycnantha* Benth. by birds. *Aust. J. Bot.* 36 : 519-531
- Vasil I.K., V. Vasil (1972)** Totipotency and embryogenesis in plant cell and tissue cultures. *In vitro* 8: 117-127
- Vasil N. vasil I.K. (1981)** Somatic embryogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Pennisetum americanum* and *Pennisetum americanum x purpureum* hybrid . *Amer. J. Bot.* 68: 864-872
- Vassal J. (1979)** :Interêt de l'ontogénie foliaire pour la taxonomie et la phylogénie du genre *Acacia*. *Bull. Soc. Bot. Fr.* 3: 55-65
- Vasse J., de Billy F., Truchet G., (1993)** Abortion of the infection during the *Rhizobium melliloti* alfalfa symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction. *The Plant Journal* 4 (3): 555-556
- Vasse J.M., Truchet C. (1989)** The rhizobium legume symbiosis : observations of root infection by bright field microscope after staining with methylene blue. *Planta* 161 : 487-489
- Verma D.P.S. (1992)** Molecular signals in plant microbe communications. Eds D P S Verma CRC Press London p 295-231
- Viera J.D., Milani D., Correa D., Gonçalves A. (1992)** "In vitro" Eucalypt cutting production methodology. p 197-169 In "Production de variétés génétiquement améliorées d'espèces forsières à croissance rapide" Actes Symp. Bordeaux FRANCE
- Vietez A.M., Vietez M.L, Vietez E. (1986)** Chestnut (*Castanea spp.*). p 393-414 In Bajaj YPS Eds Biotechnology in agriculture and forestry. Vol 1 Trees Springer-verlag Berlin
- Vijn I. das Neves L., van Kammen A., Franssen H., Bisseling T. (1993)** Nod factors and nodulation in plants. *Sciences* Vol 260:1764-1765
- Vincent J.M. (1970)** Manual of the practical study of root nodule bacteria [BP] handbook 15 Oxford -Blackwell
- Wang S.Y. Steffens G.L. Faust M. (1986)** Breaking bud dormancy in apple with a plant bioregulator: thidiazuron. *Phytochemistry* 25: 311-317
- Wang Y.C., Janick J. (1986)** Somatic embryogenesis in jojoba. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 11: 281-287
- Warner A., Sano S.M., Hutton E.M. (1984)** The effect of three mycorrhizal isolates on *Leucaena leucocephala* grown at two soil pH levels and two phosphate levels. p 201-208 in " Resumos XII Reuniao latino-americana sobre Rhizobium" Campinas
- Weaver R.W., Frederick L. (1974)** Effect of inoculum rate on competition nodulation of *Glycine max* L. Merr. l. in greenhouse studies . *Agr. J.* 66: 229-232
- Wernicke W., Potrikus I., Thomas E. (1982)** Morphogenesis from cultured leaf tissue of *Sorghum bicolor* . The morphogenetic pathway. *Protoplasma* III p 53- 62

- White P.R. (1943)** Nutrient deficiency studies and an improved inorganic nutrient for cultivation of excised tomato roots. *Growth* 7:53
- Whitehead D.R. (1983)** Wind pollination in Angiosperms. Evolutionary and Environmental considerations. *Evolution* 23 : 28-35
- Wickens G.E. (1969)** A study of *Acacia albida* Del. (Mimosoideae) Kew. Bull. 23 (2): 181-202
- Willems A., Collins M.D. (1992)** Phylogenetic analysis of Rhizobia and Agrobacteria based on 16s ribosomal DNA sequences. *Int. J. Syst. Bacter.* 43: 305-313
- Woese C.R. (1987)** Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221- 271
- Wong C.D., Davendra C. (1983)** Research on Leucaena forage production in Malaysia. p 55-60 *In* Eds IDRC OTTAWA "Leucaena research in the Asia -Pacific region". Proc. of a workshop Singapore
- Yanagi M., Yamasato K. (1993)** Phylogenetic analysis of the family of Rhizobiaceae and related bacteria by sequencing of 16s rRNA gene using PCR and DNA sequencer. *FEMS. Microbiol. Letters* 107: 115-120
- Yatazawa M., Yashuda S., Maeda E. (1984)** Fine structure of root nodules of *Aeschynomene indica* L. . *Soil Science and plant Nutrition* 30: 405-416
- Yeh M.L., Chang W.C. (1986)** Somatic embryogenesis and subsequent plant regeneration from inflorescences callus of *Bambusa beecheyana* Munro. var. beecheyana. *Plant Cell Reports* 5: 409-411
- Young J.P. (1991)** Phylogenetic classification of nitrogen fixing organisms. p 43-86 *In* "Biological nitrogen fixation " G. Stacey R.H., Burris and H.J. Evans (Eds) Chapman et Hall
- Zappata T.R., Arroyo M.K.T. (1978)** Plant reproductive ecology of a secondary deciduous tropical forest in Venezuela. *Biotropica* 10: 221- 230
- Zeh-Nio M., Joly H. (1992)** First observations on the phenology of *Acacia albida* : study of a population in the North Cameroon p 63-66 *In*: Vandenberg R.J. Eds *Faidherbia albida* in the west African semi- arid tropics : Proceed. of a Workshop 22-26 Apr. 1991 ICRISAT Niamey Niger

ANNEXES

TABL N°1 : COMPOSITION MINÉRALE DES DIFFERENTS MILIEUX DE CULTURE UTILISÉS

	M-S	Q-L	B5	B DA	WPM	G- M	L-S	N-N
MACRO-ELEMENTS	(mg/l)							
Mg SO₄	370	3600	250	42	370	250	187,5	185
CaCl₂	440	-	150	-	96	150	169	166
(NH₄)₂ SO₄	-	-	134	-	-	134	-	-
KNO₃	1900	1800	2500	85	-	2500	950	950
NaH₂PO₄	-	-	150	-	-	150	-	-
Ca(NO₃)₂	-	200	-	242	556	-	-	-
KCl	-	-	-	61	-	-	-	-
KH₂PO₄	170	2700	-	20	170	-	69	68
NH₄NO₃	1650	400	-	-	400	-	725	720
K₂SO₄	-	-	-	-	990	-	-	-

