

Article original

## La microgreffe, une solution pour la multiplication in vitro de l'*Acacia senegal* (L) Willd ?

B Palma<sup>1</sup>, GF Vogt<sup>2\*</sup>, P Neville<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidad católica de Valparaiso, Instituto de Biología, casilla 4059, Valparaiso, Chile ;

<sup>2</sup> Institut méditerranéen d'écologie et paléoécologie (CNRS-Ura 1152), faculté des sciences et techniques de Saint-Jérôme, case 442, 13397 Marseille cedex 20, France

(Reçu le 28 novembre 1995 ; accepté le 25 juin 1996)

**Summary – Micrografting, an answer to the in vitro multiplication of *Acacia senegal* (L) Willd?** To improve gum arabic production in *Acacia senegal* orchards, we attempted to propagate the most productive trees using apex and microcutting micrograftings with scions and explants from rootstock shoots. These procedures were satisfactory, since 23 and 60% successful grafts were obtained, respectively, when the grafting was performed onto epicotyls of in vitro-raised, 3-week-old, dark-grown seedlings. Microscopic analysis of graft union structures explained in part these results. They therefore provide advantageous methods to a reforestation project involving species of economic value.

### *Acacia senegal* / graft union structure / improvement / micrograftings

**Résumé –** Pour améliorer la production de gomme arabique dans les plantations d'*Acacia senegal*, nous tentons de propager les individus meilleurs producteurs, par microgreffages d'apex et de microboutures, à l'aide de greffons ou d'explants issus de rejets de souche. Ces techniques sont satisfaisantes, leurs taux de réussites respectifs étant de 23 et 60 % en moyenne lorsque le greffage est opéré sur l'épicotyle de plantules âgées de 3 semaines, élevées in vitro, à l'obscurité. L'analyse histologique des points de greffe explique pour partie ces résultats. Elles constituent ainsi une alternative intéressante pour un projet de reforestation de valeur économique.

### *Acacia senegal* / amélioration / microgreffages / structure du point de greffage

---

\* Correspondance et tirés à part  
Tél : (33) 04 91 28 85 21 ; fax : (33) 04 91 28 85 23

## INTRODUCTION

L'*Acacia senegal* (*Fabaceae*, *Mimosoïdeae*), arbre de la zone sahélienne, présente un grand intérêt dans les domaines agrosylvatique et industriel. Au plan économique, l'acacia gommier est le producteur exclusif de la gomme arabique, protéoglycane hydrosoluble (Clarke et al, 1979) utilisé dans des formulations industrielles multiples (Ullmann, 1983) qui en font la source d'un important marché (Vassal, 1983). Cette espèce présente donc de grandes qualités pour la reforestation des zones semi-arides.

La multiplication végétative d'un arbre adulte est généralement difficile (perte de la capacité rhizogène des rameaux, problème de plagiotropisme), or ce n'est qu'à ce stade du développement que l'on peut apprécier pleinement ses caractéristiques phénotypiques. La présente étude traitant des microgreffages d'apex et de microboutures sur plantules s'inscrit donc dans la recherche d'une amélioration de l'espèce par la propagation d'arbres adultes de qualités supérieures.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Matériel végétal

Une pépinière en serre est constituée d'*A. senegal* issus de semences provenant d'une plantation sise à Kayes (Mali) dont les plus âgés ont environ 5 ans et mesurent en moyenne près de 70 cm.

### Apex

Les apex sont prélevés sur des rejets mesurant environ 30 cm, de plantes âgées de 4 ans, récoltées depuis 2 mois, à partir des nœuds de rangs supérieurs à 9, le bourgeon terminal étant de rang 0. Ils mesurent 250 à 300  $\mu$ m.

### Microboutures

Des explants primaires, constitués de fragments uninodaux de rejets de souches identiques aux

précédents, sont cultivés in vitro sur milieu gélosé WPM (Woody Plant Medium; Lloyd et McCown, 1980), zéatine (ZEA)  $10^{-6}$  M, saccharose 30 g.L<sup>-1</sup>, à 25 °C, éclairés 16 h.jour<sup>-1</sup> (25 W.m<sup>-2</sup>). Après 3 semaines, les pousses à trois nœuds mesurant environ 30 mm constituent la source des microboutures uninodales destinées au greffage.

## Techniques de microgreffage

### Conditionnement des porte-greffes

Les porte-greffes sont des plantules âgées de 3 semaines, obtenues in vitro à 30 °C, à l'obscurité ou à la lumière (9 W.m<sup>-2</sup>, 12 h.jour<sup>-1</sup>), en tubes à essai, sur de la vermiculite enrichie d'un milieu minéral, à partir de graines décontaminées et scarifiées (Vogt et Palma, 1991) par agitation douce dans de l'acide sulfurique concentré, pendant 15 minutes, suivie de lavages multiples à l'eau stérile.

Lors du greffage, le système racinaire des plantules est raccourci à 6 cm du collet (Navarro et al, 1975), les cotylédons supprimés et la tige décapitée dans la zone épi- ou hypocotylaïre. L'amputation épicytolaïre se situe à mi-hauteur entre le nœud cotylédonnaire et la première feuille. La décapitation hypocotylaïre est opérée à 8 mm au-dessous du point d'insertion des cotylédons (Palma-Lutjens, 1990).

### Microgreffes en fente terminale

Les apex et les explants primaires sont disséqués aseptiquement à partir de fragments de rameaux décontaminés à l'eau de Javel à 12° Cl pendant 15 minutes et lavés par de nombreux passages dans l'eau stérile.

La technique utilisée dérive de celle décrite par Navarro et al (1975). Une incision longitudinale de 2 à 3 mm sur 1 mm de profondeur est pratiquée sur le flanc du porte-greffe à partir de la section de décapitation, afin de découvrir l'assise cambiale. L'apex-greffe déposé dans la fente, face sectionnée contre le cambium, est maintenu en place sous la pression des lèvres de l'incision. Lorsque le greffe est une microbouture uninodale, sa base est grattée au scalpel jusqu'à l'assise cambiale et introduite ensuite dans la fente du porte-greffe.

Le plant greffé est alors réimplanté, soit dans un tube à essai, où son maintien dans la solution nutritive liquide est assuré au moyen d'un orifice percé dans un pont de papier filtre, soit dans un bocal contenant de la vermiculite humidifiée par du milieu de culture, puis placé à 25 °C, sous une irradiance de 25 W.m<sup>-2</sup>, 16 h.jour<sup>-1</sup>.

Une semaine après la reprise de la greffe (démarrage du bourgeon), les plants sont acclimatés dans le même environnement, en conditions non stériles, pendant 1 mois, en pots, sous une cloche transparente.

## Dispositifs expérimentaux

### *Régénération des racines des porte-greffes*

Des lots de 24 plantules amputées au niveau hypocotylaire (en état de porte-greffe), par condition, sont cultivés à deux températures, 25 et 30 °C, en présence des concentrations 1, 1/2 et 1/4, des macroéléments d'un milieu liquide MS (Murashige et Skoog, 1962), supplémentées des vitamines MS et de 30 g.l<sup>-1</sup> de saccharose, sous une irradiance de 25 W.m<sup>-2</sup>, 16 h.jour<sup>-1</sup>.

### *Influences du niveau de greffage et du conditionnement préalable du porte-greffe*

Des lots de 30 greffes d'apex et de 20 et 24 (1<sup>re</sup> et 2<sup>e</sup> séries) greffes de microboutures par traitement sont constitués en fonction du conditionnement initial (lumière ou obscurité) des porte-greffes et des deux niveaux (épi- ou hypocotylaire) du greffage, l'expérience étant réalisée en deux répétitions (1<sup>re</sup> et 2<sup>e</sup> séries).

### *Influence de la lumière sur la reprise de la greffe*

Des lots de 25 greffes épicytulaires de microboutures, réalisées sur des porte-greffes conditionnés à l'obscurité, sont soumis dès l'opération, respectivement, à des irradiances de 0, 4, 9, 25 et 50 W.m<sup>-2</sup>, 16 h.jour<sup>-1</sup>.

### *Influence de la lumière sur la croissance de la greffe*

Des lots de 10 à 12 greffes analogues aux précédentes sont d'abord soumis, respectivement,

à des irradiances de 9, 15 et 25 W.m<sup>-2</sup>, 16 h.jour<sup>-1</sup> puis, dès la reprise, répartis en deux populations, chacune d'elles comprenant la moitié des individus des lots initiaux. L'une est alors placée en serre, en conditions homogènes pour toutes les greffes concernées, la seconde poursuivant sa croissance dans les conditions initiales.

### *Développement des microgreffes d'apex et de microboutures*

Huit greffes d'apex et cinq greffes de microboutures analogues aux précédentes sont conditionnées immédiatement après l'opération, sous une irradiance de 25 W.m<sup>-2</sup>, 16 h.jour<sup>-1</sup>, jusqu'à la reprise (3 semaines). Transférées alors en pots et placées en serre, leurs croissances sont contrôlées pendant 130 jours.

## Méthodes histologiques

Le matériel végétal est fixé dans du CrAF III (formol, acide acétique à 10%, acide chromique à 1%, eau distillée, 1 : 2 : 3 : 4), inclus dans des blocs de paraffine débités en rubans de 10 à 12 µm d'épaisseur, à l'aide d'un microtome Leitz. Les coupes déparaffinées sont soumises à une triple coloration, hématoxyline (RAL) 1%, safranine (RAL) 1% et bleu d'aniline (Prolabo) à 0,6%. Les micrographies sont réalisées à l'aide d'un photomicroscope Leitz.

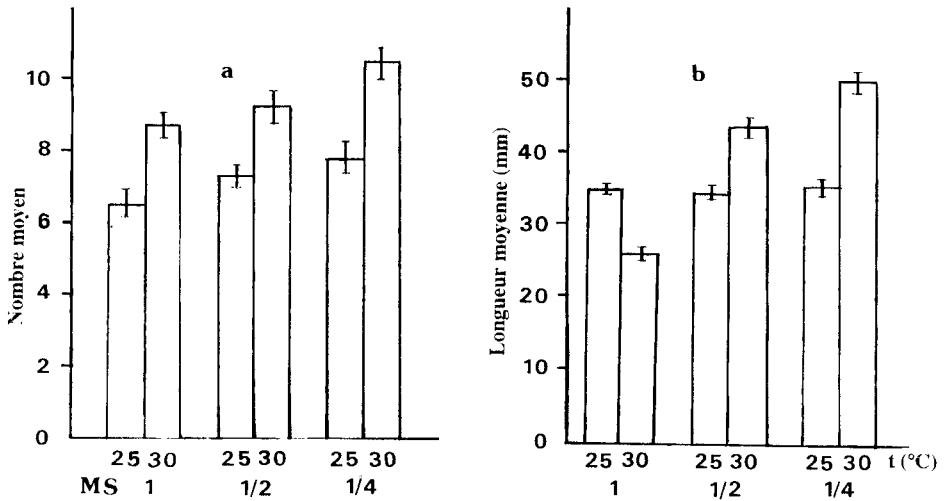
## Tests statistiques

Tests de comparaison de moyennes (Student) et de proportions dans le cas de petits échantillons au coefficient de sécurité de 95%. Les différences sont significatives sauf lorsque le contraire est signalé dans le texte.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

### Mise au point des porte-greffes

Les essais de régénération des racines des plantules amputées montrent que plus le milieu MS est dilué, plus le nombre moyen (fig 1a) et la longueur moyenne des racines



**Fig 1.** Effets de différentes concentrations des sels minéraux du milieu MS (1, 1/2 et 1/4) en présence des vitamines MS, sur (ordonnées) le nombre moyen (a) et la longueur moyenne (b) des racines régénérées par des plantules porte-greffes obtenues in vitro, initialement amputées au niveau hypocotylaire ainsi qu'au niveau racinaire à 6 cm du collet, 30 jours après leurs amputations et leur mise en culture sur milieu liquide, à deux températures 25 et 30 °C. Expérience réalisée sur 24 individus par condition.

(fig 1b) par plante sont élevés, et cela notamment pour la plus forte des deux températures testées. Les microgreffes seront donc conduites en présence de la concentration minérale 1/4 MS, supplémentée des vitamines MS et de 30 g.l<sup>-1</sup> de saccharose. La croissance des racines étant particulièrement élevée à 30 °C, une température de 25 °C sera appliquée pour la culture de la greffe, afin de ne pas détourner le métabolisme de la plante vers les racines, au détriment du greffon. Puis, la greffe manifestant une reprise, l'appareil greffé sera transféré à 30 °C pour favoriser alors son développement.

La technique consistant à réimplanter l'appareil greffé sur un milieu liquide est la plus couramment décrite (Alskieff et Villemur, 1978; Mosella-Chancel et al, 1979), mais la difficulté de la manipulation entraîne de fortes pertes de matériel et de nombreuses contaminations. Ce manque d'efficacité dû

notamment, selon Deogratias et al (1986) et Jonard et al (1983), à une absence de ramifications latérales des racines par asphyxie en milieu liquide nous a conduits à utiliser la méthode décrite par Mosella-Chancel et al (1979) et Jonard et al (1983), où la greffe est élevée en bocal sur de la vermiculite. Les pertes de microgreffes sont alors faibles, 17%, et le taux de contamination relativement bas, 27%.

### Microgreffages d'apex de microboutures

Bien que les taux de reprise des microgreffes d'apex (tableau I, apex) semblent en faveur des greffes épicyotylaires réalisées sur des porte-greffes élevés à l'obscurité (23%, à 6 semaines), la différence des proportions de greffes réussies sur épi- et hypocotyle, d'une part, et sur des porte-greffes développés préalablement à la lumière ou à

**Tableau I.** Taux de réussites respectifs (en % des effectifs de départ) du microgreffage en fente terminale, d'apex et de microboutures, réalisé au niveau de l'épi- ou de l'hypocotyle de plantules porte-greffes obtenues in vitro à la lumière ou à l'obscurité, à deux âges (respectivement 3 et 6, et 3 et 8 semaines) correspondant pour le premier, à la reprise in vitro de la greffe et, pour le second, à l'âge de la greffe en fin d'acclimatation. Ensemble de deux répétitions réalisées respectivement sur 30 greffes d'apex et 20 à 24 greffes de microboutures par traitement. (NB: Les greffes de microboutures sur hypocotyles de plantules élevées à l'obscurité ont toutes été contaminées.)

Nature du greffon	Apex				Microbouture				
	Lumière		Obscurité		Lumière		Obscurité		
Conditionnement préalable du porte-greffe									
Âge de la greffe (semaines)	3	6	3	6	3	8	3	8	
Niveau de greffage	Épicotyle	13	10	57	23	81	14	79	60
	Hypocotyle	18	13	46	18	82	12	0	0

l'obscurité, d'autre part, n'est pas, dans les conditions de l'expérience, assez importante pour satisfaire aux critères statistiques. Cependant, les contraintes morphologiques et anatomiques imposées par le matériel guident, à l'évidence, le choix du procédé. À l'obscurité, les plantules destinées à devenir des porte-greffes s'étiolent. Leur allongement et le diamètre de leur axe caulinaire sont alors supérieurs (scotomorphogénèse) à ceux des plantules développées à la lumière, ce qui facilite la micromanipulation. Par ailleurs, des coupes histologiques longitudinales (fig 2), réalisées 5 semaines après l'opération (fig 2a, a', b et b'), montrent que la cicatrisation des épicotyles est totale (fig 2a), la zone d'incision étant uniformément soudée (a', So), et la communication vasculaire (X) établie entre les deux partenaires, tandis que sur les greffes hypocotylaires (fig 2b et b'), la zone de soudure (b', SO) est incomplète et surmonte une lacune (L) en cours de colmatage. De plus, des coupes transversales réalisées sur épi- et hypocotyle (fig 2c, c', d et d') de plantules âgées de 3 semaines, élevées à l'obscurité, montrent que dans l'épicotyle (fig 2c et c'), la zone cambiale est continue, le système vasculaire étalé, à six faisceaux principaux, et la zone corticale, étroite. Au

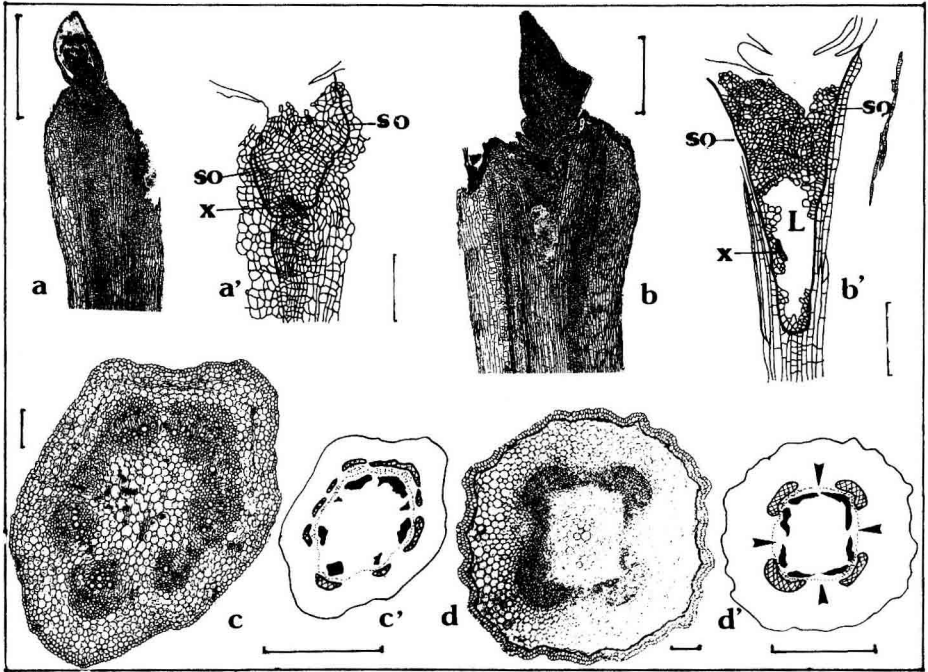
contraire, dans l'hypocotyle (fig 2d et d'), beaucoup plus riche en parenchymes cortical et médullaire, les faisceaux quadrangulaires sont relativement peu développés et occupent une surface réduite, la zone cambiale encore discontinue (d', flèches) étant limitée aux régions intrafasciculaires. La structure anatomique de l'épicotyle semble donc plus favorable à la soudure harmonieuse de la greffe que celle de l'hypocotyle.

Quant aux microgreffes de microboutures, le taux de réussite de 60% des greffes épicotylaires obtenues sur des porte-greffes élevés à l'obscurité (tableau I, microboutures, à 8 semaines) confirme la supériorité des hypobiontes étiolés pour le microgreffage de l'*A. senegal*.

### Influence de la lumière

#### Sur la reprise de la greffe

Une certaine quantité de lumière est nécessaire à la reprise de la greffe (Alskieff et Villemur, 1978; Martinez et al, 1981). En effet, seuls les lots de greffes recevant des irradiances de 9 et 25 W.m<sup>-2</sup> débourent après 15 jours et présentent des taux de



**Fig 2.** Vue d'ensemble (**a** et **b**) et détails histologiques (**a'** et **b'**) de coupes longitudinales (**a**, **a'**, **b** et **b'**) de microgreffes en fente terminale, d'apex axillaires provenant de rejets de 2 mois, de plantes recépées, 5 semaines après l'opération, réalisées au niveau épicotylaire (**a**, **a'**) et hypocotylaire (**b**, **b'**) de plantules porte-greffes obtenues *in vitro*, à l'obscurité, dont les caractéristiques histologiques à ces deux niveaux sont révélées respectivement par les vues d'ensemble (**c** et **d**) et l'interprétation (**c'** et **d'**) de leurs coupes transversales. L : lacune au fond de la fente de greffe; so : zone de soudure du greffon et du porte-greffe; X : xylème; flèches : discontinuités de la zone cambiale au niveau hypocotylaire. Barres : 1 mm (**a**, **b** et **d'**); 0,5 mm (**b'** et **c'**); 0,4 mm (**a'**); 0,2 mm (**d**); 0,1 mm (**c**).

reprise respectifs de 82 et 75 %, alors que ceux placés à 0 ou 4  $\text{W.m}^{-2}$  ne survivent qu'une quinzaine de jours, leurs greffons ne réagissant pas. Une irradiance élevée telle que 50  $\text{W.m}^{-2}$  nuit également à la reprise puisque le lot correspondant meurt rapidement. Dix-neuf semaines après l'opération, les greffes se développant en serre représentent finalement 46 et 61 % des effectifs initiaux respectifs.

### *Sur la croissance de la greffe*

Certaines des irradiances favorables à la reprise pourraient influencer la croissance

de la greffe, comme Atskieff et Villemur (1978) l'ont noté sur des greffes d'apex de pommier. Le développement des trois lots de greffes placés en serre se poursuit presque uniformément. Elles donnent toutes une pousse dominante, mesurant en moyenne 50 cm au bout de 130 jours, se ramifiant après environ 15, 50 et 55 jours respectivement, pour les lots conditionnés initialement à 9, 15 et 25  $\text{W.m}^{-2}$ . Après quelques mois de culture en serre, les plants conditionnés au moment du greffage sous différentes irradiances manifestent donc finalement des comportements analogues. En revanche, chez les lots maintenus dans les conditions

de la reprise, celui se trouvant à  $9 \text{ W.m}^{-2}$  ne survit pas au-delà de 6 semaines. Les lots placés à 15 et  $25 \text{ W.m}^{-2}$  poursuivent leur développement mais présentent des comportements architecturaux non conformes, très dissemblables entre les individus, défavorables à l'acquisition du houppier typique de l'*A senegal* en champ.

### Développement des microgreffes d'apex et de microboutures

Après plusieurs mois, les greffes d'apex et de microboutures présentent des croissances régulières et une capacité de ramification très analogue. La greffe d'apex produit un axe ne présentant pratiquement aucune déformation, ressemblant alors fortement à l'axe d'un individu issu de germination, tandis que sur la greffe de microbouture la zone de greffage est toujours perceptible.

### CONCLUSION

Chez les ligneux, le microgreffage sur plantule décapitée est un acte efficace, notamment dans le cas d'homogreffes. Dans le présent travail, nous développons une méthode de clonage des *A senegal* pour l'amélioration de la production de gomme arabique, par greffage *in vitro* en fente terminale, d'apex ou de microboutures issus de rameaux rajeunis par le recépage de souches, sur des plantules porte-greffes conditionnées *in vitro* à l'obscurité, amputées au niveau épicotylaire. L'utilisation des microboutures comme greffons semble d'ailleurs un procédé original puisque, à notre connaissance, au moment où nous l'avons mise en œuvre (Palma-Lutjens, 1990), aucun travail n'en avait encore fait état. La reprise *in vitro* des greffes nécessite une irradiance située entre 9 et  $25 \text{ W.m}^{-2}$ , à  $25^\circ\text{C}$ . puis après leur acclimatation, elles doivent poursuivre leur dévelop-

pement en serre pour acquérir une bonne conformation.

Ces techniques permettent d'utiliser des « porte-greffes de terrain », c'est-à-dire des plantules issues de semences autochtones bien adaptées aux facteurs édaphiques et environnementaux, variables selon les régions d'implantations. Les apex comme les microboutures épibiontes proviendront d'individus ayant fait la preuve de leur superproductivité. Ces dernières, de manipulation plus aisée lorsque les apex sont de petite taille, bénéficient de la possibilité d'une multiplication *in vitro* très importante, et cela, même à partir d'un seul individu remarquable. En ce qui concerne l'*A senegal*, nous devons toutefois vérifier sur le terrain que la propriété de gommose supérieure est bien conservée dans les tissus greffés.

### RÉFÉRENCES

- Alskieff J, Villemur P (1978) Greffage *in vitro* d'apex sur des plantules décapitées de Pommier (*Malus pumila* Mill). *CR Acad Sci Paris* 287, 249-253
- Clarke AE, Anderson RL, Stone BA (1979) Form and function of arabinogalactans and arabinogalactan proteins. *Phytochemistry* 18, 521-540
- Deogratias JM, Lutz A, Dosba F (1986) Microgreffage d'apex de cerisiers (*Prunus avium* L.) multipliés *in vitro* en vue de l'élimination de trois types de particules virales (CLSV, PDV et NRSV). *Fruits* 41, 675-680
- Jonard R, Hugard J, Macheix JJ, Martinez J, Mosella-Chancel L, Poessel JL, Villemur P (1983) *In vitro* micrografting and its applications to fruit science. *Sci Horti* 20, 147-159
- Lloyd G, McCown B (1980) Commercially feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. *Proc Intern Plant Prop Soc* 30, 421-427
- Martinez J, Poessel JL, Hugard J, Jonard R (1981) L'utilisation du microgreffage *in vitro* pour l'étude des greffes incompatibles. *CR Acad Sci Paris* 292, 961-1118
- Mosella-Chancel L, Riedel M, Jonard R (1979) Sur les améliorations apportées aux techniques de microgreffage des apex *in vitro* chez les arbres fruitiers. Cas du pêcher (*Prunus persica* Batsch). *CR Acad Sci Paris* 289, 505-508

- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15, 473-493
- Navarro L, Roistacher CN, Murashige T (1975) Improvement of shoot-tip grafting in vitro for virus-free *Citrus*. *J Am Soc Hortic Sci* 100, 471-479
- Palma-Lutjens B (1990) Contribution à l'étude de certains aspects de la multiplication de l'*Acacia senegal* (L) Willd. Thèse de doctorat en sciences, université de droit d'économie et des sciences d'Aix-Marseille, France
- Ullmann G (1983) Étude de la structure et de la biosynthèse d'un exsudat naturel d'une plante d'importance industrielle : la gomme arabique de l'*Acacia senegal*. Thèse de docteur ingénieur, université de Grenoble, France
- Vassal J (1983) *Le Marché de la gomme arabique et le développement de la production*. CNU-SED/ GATT & UNSO, Genève
- Vogt GF, Palma B (1991) Influence de quelques produits désinfectants sur le pouvoir d'imbibition des graines d'*Acacia senegal*. Rôle des différentes parties du tégument. *Phyton (Horn Austria)* 31, 97-109