




LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	: Acide désoxyribonucléique
AIA	: acide indole-3-acétique
ANA	: acide α -naphtalène acétique
BAP	: benzyl-aminopurine
cm	: centimètre
dNTPs	: désoxyribonucléotides
EDTA	: Ethylène Diamine Tétra - Acétique Acide
<i>et al.</i>	: <i>et alter</i> : et les autres ; et les collaborateurs
<i>etc.</i>	: <i>et caetera</i>
g	: gramme
g.L⁻¹	: gramme par litre
h	: heure
HgCl₂	: Chlorure mercurique
H₂O	: eau
kb	: Kilobase
kcal.kg⁻¹	: Kilocalorie par kilogramme
kg d'azote.ha⁻¹	: Kilogramme d'azote par hectare
km	: Kilomètre
m	: mètre
mg.L⁻¹	: milligramme par litre
ml	: millilitre
mm	: millimètre
mm.an⁻¹	: millimètre par année
mM	: millimolaire
min	: minute
MS	: Milieu de Murashige et Skoog
ng	: nanogramme
nm	: nanomètre
pH	: potentiel Hydrogène
rpm	: rotation par minute
TBE	: Tris Borate EDTA
TE	: Tris EDTA
TES	: N-Tris [Hydroxyméthyl] méthyl-2 aminoethane esulfonique
Tris	: tris hydroxyméthyl aminométhane
U.V.	: ultra violet
v/v	: volume par volume
watt.m⁻²	: watt par mètre carré
w/v	: poids par volume
±	: plus ou moins
%	: pourcentage
‰	: pour mille
&	: et ou and
µl	: microlitre
µM	: micromolaire
µmol.L⁻¹	: micromole par litre
°C	: degré Celsius
Ø	: diamètre
	: mâle
	: femelle
	: hermaphrodite

LISTE DES ACRONYMES ET DES SIGLES

AFLP	: <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
CSE	: Centre de Suivi Ecologique
FISSR	: <i>Fluorescent Inter Simple Sequence Repeats</i>
GPS	: <i>Global Positionning System</i>
IFI	: Inflorescence Femelle Immature
ISSR	: <i>Inter Simple Sequence Repeats</i>
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PPM	: <i>Plant Preservative Mixture</i>
RAPD	: <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RFLP	: <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
SPSS	: <i>Statistical Package of Social Science</i>
SSR	: <i>Simple Sequence Repeats</i>
UPGMA	: <i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic</i>

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Formulaire de description des sites de prospection de *Casuarina equisetifolia*.

Annexe 2 : Relevé de végétation à Guédiawaye, Hamo 6.

Annexe 3 : Relevé de végétation à Potou.

Annexe 4 : Relevé de végétation à Notto.

Annexe 5 : Relevé de végétation à Retba.

Annexe 6 : Relevé de végétation à Malika.

Annexe 7 : Composition du tampon Microprep.

Annexe 8 : Echelle de masse moléculaire du marqueur 2 Log ladder (Biolabs, New England).

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 :** Taux de désinfestation et influence de différents milieux MS (1962) sur la réactivité d'IFI de *C. equisetifolia* après 5 semaines de culture..... page 31
- Figure 2 :** Taux de désinfestation et influence des différents milieux de culture sur la réactivité de nœuds axillaires de *C. equisetifolia* après 3 semaines de culture.
..... page 31
- Figure 3 :** Influence des différents milieux de culture sur la néoformation de pousses issus d'explants axillaires de *C. equisetifolia* après 3 semaines de culture...page 35
- Figure 4 :** Taux de désinfestation et de réactivité de nœuds axillaires issus de divers pieds sélectionnés de *C. equisetifolia*, après 4 semaines de culture.... page 38
- Figure 5 :** Taux de multiplication d'explants axillaires issus de différents pieds sélectionnés de *C. equisetifolia* après 4 semaines de culture dans un même milieu MS(0).
.....page 38
- Figure 6 :** Profils RAPD obtenus par amplification avec l'amorce A7 de l'ADN de divers échantillons de *C. equisetifolia*.....page 44
- Figure 7 :** Profils RAPD obtenus par amplification avec l'amorce F4 de l'ADN des échantillons 21 à 40 de pieds de *C. equisetifolia*.....page 46
- Figure 8 :** Profils RAPD obtenus par amplification avec l'amorce O15 de l'ADN des échantillons 41 à 61 de pieds de *C. equisetifolia*.....page 46
- Figure 9 :** Dendrogramme illustrant le degré de similarité entre 74 pieds de *C. equisetifolia* du littoral Nord..... page 48

LISTE DES PLANCHES

- Planche 1** : Aspect d'un pied de *Casuarina equisetifolia* (A) et de divers rameaux fructifiés (B et C). page 8
- Planche 2** : Zones de prospection et de collecte des échantillons de *Casuarina equisetifolia*.....page 18
- Planche 3** : Pieds de *Casuarina equisetifolia* de différents sexes. page 20
- Planche 4** : Types d'explants utilisés pour la mise en culture *in vitro*.page 21
- Planche 5** : Néoformation de pousses sur des explants de *C. equisetifolia* en culture dans un milieu MS combiné ou non avec des hormones..... page 28
- Planche 6** : Développement des IFI sur des milieux MS enrichis en ANA ($9,31 \cdot 10^{-3} \text{ mg.L}^{-1}$) et à différentes concentrations en BAP page 32
- Planche 7** : Allongement des IFI en rameaux dans des milieux d'élongation contenant (A) ou non (B) du charbon actif à 20 g.L^{-1} après 4 semaines d'incubation. page 33
- Planche 8** : Influence du milieu M8 (MS + BAP $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ + ANA $9,31 \cdot 10^{-3} \text{ mg.L}^{-1}$) sur le bourgeonnement d'explants axillaires de *C. equisetifolia* après 3 semaines de culture.....page 35
- Planche 9** : Développement des nœuds axillaires en vitroplants par élongation et ramification des pousses néoformées après 8 semaines de culture sur milieu MS(0) (A), puis néoformation de racines à la base des vitroplants (B).. page 36
- Planche 10** : Néoformation de racines sur des vitroplants de *C. equisetifolia* issus d'IFI après induction pendant 48 h sur le milieu MS additionné d'ANA à 5 g.L^{-1} et expression dans le milieu rhizogène MS(0).....page 40
- Planche 11** : Acclimatation sous mini-serre fermée de vitroplants de *C. equisetifolia* néoformés à partir d'IFI.....page 41

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Distribution des plantes actinorhiziennes par continent (Baker & Schwintzer, 1990).	page 5
Tableau 2 : Familles et genres des plantes actinorhiziennes (Baker & Schwintzer, 1990 et Swensen, 1996).	page 6
Tableau 3 : Composition du milieu nutritif de Murashige & Skoog (1962).....	page 22
Tableau 4 : Combinaisons hormonales des divers milieux de cultures utilisés.....	page 24
Tableau 5 : Taux de désinfestation et de réactivité d'IFI issus de pieds sélectionnés de <i>C. equisetifolia</i> après 5 semaines de culture sur différents milieux MS additionné de BAP et d'ANA.....	page 30
Tableau 6 : Taux de désinfestation et de croissance de nœuds axillaires issus de pieds sélectionnés de <i>C. equisetifolia</i> après 3 semaines de culture sur différents milieux MS enrichis en BAP et ANA.....	page 30
Tableau 7 : Taux de désinfestation, de réactivité et de croissance de nœuds axillaires issus de pieds sélectionnés de <i>C. equisetifolia</i> après 4 semaines de culture sur le milieu MS(0)... ..	page 37
Tableau 8 : Taux d'enracinement après 4 semaines de culture sur milieu d'expression dépourvu d'hormones pour des microplantes de <i>C. equisetifolia</i> issus d'IFI et préalablement induit pendant 48 h avec divers teneur en ANA...	page 39
Tableau 9 : Nombre de bandes produites et taux de polymorphismes pour chaque amorce.....	page 42

TABLE DES MATIERES

	Pages
Introduction.....	1
Revue bibliographique.....	3
1. Les plantes actinorhiziennes.....	3
1.1. La famille des <i>Casuarinaceae</i>	3
1.1.1. Le genre <i>Casuarina</i>	7
1.2. Utilisation des <i>Casuarinaceae</i>	7
2. La micropropagation <i>in vitro</i>	9
2.1. Généralités.....	9
2.2. Techniques de micropropagation <i>in vitro</i> des espèces ligneuses forestières.....	10
2.3. Techniques de micropropagation <i>in vitro</i> mises au point pour les <i>Casuarinaceae</i>	11
3. Caractérisation génétique.....	13
3.1. Généralités.....	13
3.2. Caractérisation moléculaire des espèces ligneuses forestières.....	14
3.2.1. Les techniques basées sur l'amplification de l'ADN.....	14
3.2.2. Les techniques basées sur la digestion et l'amplification de l'ADN.....	17
Matériels et méthodes.....	19
I. Sélection et collecte des échantillons de <i>Casuarina equisetifolia</i>	19
II. Micropropagation.....	23
1. Mobilisation du matériel végétal en serre.....	23
2. Culture <i>in vitro</i> de <i>Casuarina equisetifolia</i>	23
2.1. Multiplication.....	23
2.1.1. Désinfection des explants.....	23
2.1.2. Milieux de culture.....	23
2.2. Enracinement.....	25
2.3. Acclimatation.....	25
2.4. Analyse statistique des résultats.....	25
III. Caractérisation moléculaire.....	25
1. Extraction d'ADN.....	25

2. Quantification de l'ADN.....	26
3. Amplification enzymatique de l'ADN.....	26
4. Electrophorèse.....	27
5. Construction du dendrogramme.....	27
Résultats.....	29
I. Micropropagation.....	29
1. Culture <i>in vitro</i> de <i>Casuarina equisetifolia</i>	29
1.1. Désinfestation des explants.....	29
1.2. Multiplication végétative des inflorescences femelles Immatures.....	29
1.3. Multiplication végétative des nœuds axillaires	29
2. Enracinement.....	39
3. Acclimatation.....	39
II. Caractérisation moléculaire.....	42
1. Analyse de profils RAPD.....	43
2. Analyse du degré de similarité entre les échantillons de <i>C.</i> <i>equisetifolia</i>	47
Discussion.....	49
I. Micropropagation.....	49
1. Culture <i>in vitro</i> de <i>Casuarina equisetifolia</i>	49
2. Enracinement.....	52
3. Acclimatation.....	52
II. Caractérisation moléculaire.....	53
Conclusion et Perspectives.....	55
Références bibliographiques.....	57
Annexes	

INTRODUCTION

Le littoral nord du Sénégal est composé de nombreux écosystèmes dont le plus important correspond à la zone des Niayes (dépressions interdunaires à nappe phréatique affleurante ou sub-affleurante). Il constitue aujourd'hui la principale zone de culture des produits maraîchers du pays. Les Niayes produisent en effet près de 95% des récoltes de légumes du pays (CSE & CERPOD, 1996).

Cependant, ces écosystèmes ont connu au cours des dernières décennies de profondes modifications que lui ont imposé des contraintes d'ordre climatologique et anthropique. Parmi ces contraintes, on peut citer notamment celles associées aux alizés et à la sécheresse (ensevelissement des cuvettes et des bas-fonds maraîchers). Sous l'action agressive du vent, les dunes progressent vers le continent, alimentent en sables fins les lacs et autres dépressions littorales et envahissent les routes d'accès à la mer. Il en résulte d'importantes modifications de la morphologie générale du milieu, et principalement sur les formations végétales en place. Celles-ci font l'objet d'une exploitation intense et anarchique et d'un surpâturage auquel s'ajoute la sur-utilisation des terres, autant de facteurs à l'origine de la dégradation du couvert végétal, de la mobilisation des dunes intérieures jadis fixes et de l'ensevelissement des cuvettes des Niayes. En définitive, de réelles menaces pèsent sur les terres à vocation agricole et pastorale situées plus à l'intérieur et mettent également en péril les ressources environnementales et vitales des populations locales.

Les autorités publiques comme les acteurs locaux conscients de ces menaces, placent depuis longtemps ces contraintes au cœur de leurs préoccupations. Dès 1925, cette frange côtière commence à faire l'objet d'actions de protection par reboisement. Aujourd'hui, elle abrite des aménagements de grande envergure tels que l'implantation du rideau de filao sur 182 km de terrains reboisés avec une largeur moyenne de près de 200 m (CSE, 2002). Ces aménagements servent de brise-vents et permettent également de fixer les dunes.

Un autre important projet de réaménagement de ces peuplements forestiers vieillissants est entrepris en vue de leur pérennisation et au regard du déficit de régénération naturelle de cette espèce (Tamba, 2000).

Ainsi, notre étude est une contribution à l'approfondissement des connaissances relatives à la régénération *in vitro* de géotypes élités de *Casuarina equisetifolia* adaptés aux biotopes sahéliens et à leur caractérisation moléculaire.

Ce travail a pour objectifs d'étudier :

- les conditions optimales de régénération *in vitro* de *C. equisetifolia* à partir d'Inflorescences Femelles Immatures (IFI) et de nœuds axillaires ;
- et la diversité génétique des populations de *C. equisetifolia* dans les zones de Guédiawaye, Potou, Notto, Retba et Malika par la technique RAPD.

REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les plantes actinorhiziennes

Les plantes actinorhiziennes sont ainsi appelées parce qu'elles portent sur leurs systèmes racinaires des structures particulières appelées actinorhizes ou nodules. Ce sont essentiellement des plantes ligneuses exceptées les deux espèces du genre *Datisca* : *D. cannabina* et *D. glomerata*, monoïques ou dioïques. Les feuilles sont très réduites et sont en forme d'écailles triangulaires. Les rameaux sont articulés, fins comme ceux des prêles et ressemble vaguement à des aiguilles de conifères. Les feuilles et les rameaux articulés sont des organes photosynthétiques (Dommergues *et al.*, 1999). Ces plantes fixatrices d'azote se rencontrent pratiquement sous tous les climats, du climat arctique au climat subtropical. Toutefois, elles sont plus fréquentes dans les zones tempérées froides (Moiroud, 1996). La diversité des plantes actinorhiziennes varie d'un continent à l'autre. Ainsi, sur le continent américain, 19 genres ont été répertoriés alors que le continent africain comporterait seulement un à deux genres. Il en est de même du continent européen sur lequel 10 espèces auraient été dénombrées (Wheeler & Miller, 1990) et réparties en six genres (Tableau 1). Elles regroupent environ 260 à 280 espèces de plantes réparties dans 24 genres et 8 familles dont la famille des *Casuarinaceae* (Baker & Mullin, 1992). Les familles sont réparties en 8 ordres et 4 sous-classes ; *Hamamelideae*, *Rosideae*, *Magnolideae*, *Dilleneideae* (Baker & Schwintzer, 1990) (Tableau 2).

Les plantes actinorhiziennes de la famille des *Casuarinaceae* ont de nombreuses propriétés (NRC, 1984 ; Diem & Dommergues, 1990). Grâce à leur aptitude à établir une symbiose fixatrice d'azote avec un actinomycète du sol (*Frankia*) et à réaliser une symbiose mycorhizienne, elles peuvent se développer sur des sols pauvres voir ingrats comme les moraines abandonnées par le retrait des glaciers et les dépôts volcaniques (Danière *et al.*, 1986). En effet, elles enrichissent rapidement le sol où elles poussent par apport d'une litière riche en azote et en composés azotés hydrosolubles (Domenach *et al.*, 1994). Cette litière est à l'origine des processus biopédologiques dont l'aboutissement est l'installation de sols fertiles. C'est la raison pour laquelle les plantes actinorhiziennes sont souvent à l'origine de séries dynamiques progressives de végétations dont la finalité est l'installation en peu d'années d'un climax forestier (Moiroud, 1996).

1.1. La famille des *Casuarinaceae*

Les *Casuarinaceae* forment un grand groupe de plantes pérennes et ligneuses ayant l'aspect de conifères. La plupart sont des arbres pouvant atteindre plus de 35 m de haut. On

compte 90 espèces natives d'Australie, de Malaisie et de Polynésie (Diem & Dommergues, 1990). En revanche, Maggia (1991) distingue 96 espèces. Johnson (1988) a distingué 4 genres dans cette famille : *Allocasuarina*, *Casuarina*, *Gymnostoma* et *Ceuthostoma*. La phylogénie des *Casuarinaceae* est mal connue mais *Gymnostoma* serait moins évolué que *Ceuthostoma* et *Casuarina* alors que *Allocasuarina* serait plus évolué (Maggia & Bousquet, 1994).

**Tableau 1 : Distribution des plantes actinorhiziennes par continent
(Baker & Schwintzer, 1990).**

Continents	Genres natifs	Genres introduits
Amérique du nord	<i>Alnus, Ceanothus, Cercocarpus</i> <i>Chamaebatia, Comptonia, Coriaria</i> <i>Elaeagnus, Cowania, Datisca, Dryas,</i> <i>Myrica, Purshia, Shepherdia</i>	<i>Casuarina</i> <i>Elaeagnus</i>
Amérique du sud	<i>Alnus, Colletia, Coriaria, Discaria</i> <i>Kentrothamnus, Myrica, Renatilla</i> <i>Talguenea, Trevoa</i>	<i>Casuarina</i> <i>Elaeagnus</i>
Afrique	<i>Myrica</i>	<i>Casuarina</i> <i>Elaeagnus</i> <i>Gymnostoma</i> <i>Allocasuarina</i>
Eurasie	<i>Alnus, Coriaria, Datisca</i> <i>Dryas, Eleaegnus, Hyppophae</i> <i>Myrica</i>	<i>Casuarina</i> <i>Gymnostoma</i>
Océanie (Australie incluse)	<i>Allocasuarina, Casuarina</i> <i>Ceuthostoma, Coriaria, Discaria</i> <i>Gymnostoma, Myrica</i>	<i>Alnus</i> <i>Elaeagnus</i> <i>Purshia</i>

Tableau 2 : Familles et genres des plantes actinorhiziennes (Baker & Schwintzer, 1990 ; Swensen, 1996).

Sous-classe	Famille	Genre	Nombre d'espèces nodulées
Hamamélidées	<i>Betulaceae</i>	<i>Alnus</i>	47
	<i>Casuarinaceae</i>	<i>Allocasuarina</i>	54
		<i>Casuarina</i>	16
		<i>Ceuthostoma</i>	2
		<i>Gymnostoma</i>	18
	<i>Myricaceae</i>	<i>Comptonia</i>	1
		<i>Myrica</i>	28
Rosidées	<i>Elaeagnaceae</i>	<i>Elaeagnus</i>	38
		<i>Hippophae</i>	2
		<i>Shepherdia</i>	2
	<i>Rhamnaceae</i>	<i>Ceanothus</i>	31
		<i>Colletia</i>	4
		<i>Discaria</i>	5
		<i>Kentrothamnus</i>	1
		<i>Retanilla</i>	2
		<i>Talguenea</i>	1
		<i>Trevoa</i>	2
	<i>Rosaceae</i>	<i>Cercocarpus</i>	4
		<i>Chamaebatia</i>	1
		<i>Cowania</i>	1
		<i>Dryas</i>	1
		<i>Purshia</i>	5
Magnoliidées	<i>Coriariaceae</i>	<i>Coriaria</i>	5
Dilléniidées	<i>Dastiscaceae</i>	<i>Datisca</i>	2

1.1.1. Le genre *Casuarina*

Le nom *Casuarina* a été proposé par Rumphius dans les années 1650. Il fait allusion aux rameaux très fins et retombants qui ressemblent au plumage du casoar "*Casuarus*" (NRC, 1984). Le genre *Casuarina* comprend 17 espèces dont l'aire géographique couvre le sud-est de l'Asie, la Malaisie, la Mélanésie, la Polynésie, la Nouvelle-Calédonie et l'Australie. En général, les *Casuarina* se développent sur des sols un peu moins pauvres que les *Allocasuarina*. Ils se distinguent de ces derniers par les caractères suivants : les verticilles comportent 5 à 20 dents ; par exemple 7 pour *C. equisetifolia* (Wilson & Johnson, 1989) ; les bractéoles des cônes sont beaucoup moins ligneuses et plus fines, elles dépassent largement le corps des cônes et ne comportent pas de protubérance dorsale. Ils ont de très petits chromosomes, $n = 9$ (Dommergues *et al.*, 1999).

Casuarina equisetifolia (L.) Forst. ou *Casuarina litorea* (Planche 1).

Les rameaux ressemblent à des prêles (*Equisetum*). C'est un arbre de 7 à 35 m de haut, qui vu de loin, a l'allure d'un pin avec des rameaux pendants et des cônes d'assez petite taille. Il est monoïque ou dioïque (Wilson & Johnson, 1989). Son aire d'origine est marquée par des pluies allant de 700 à 2000 mm.an⁻¹ avec une saison sèche de 6 à 8 mois. C'est une espèce de climat chaud et humide avec une extension possible à des régions à faibles précipitations annuelles (200 à 300 mm) ou au contraire plus arrosées (jusqu'à 500 mm) (Dommergues *et al.*, 1999).

1.2. Utilisation des *Casuarinaceae*

Les *Casuarinaceae*, particulièrement *Casuarina glauca* et *C. equisetifolia* sont utilisées comme brise-vent car elles protègent le sol contre l'érosion éolienne (Subbarao & Rodriguez-Barrueco, 1995). Grâce à leur capacité à fixer l'azote atmosphérique, les plantes actinorhiziennes enrichissent rapidement les sols marginaux où elles se développent (1567 kg d'azote.ha⁻¹ pour une plantation de *C. equisetifolia* âgée d'environ 17 à 34 ans) (Mailly & Margolis, 1992). De ce fait, elles sont utilisées comme composantes dans les systèmes agroforestiers telles que les cultures de couloirs, les cultures associées, les jachères améliorées et les clôtures vivantes (Budowski & Russo, 1993).

Les plantes actinorhiziennes peuvent être utilisées pour la phytoremédiation c'est-à-dire la dépollution des sites contaminés par les déchets organiques et inorganiques comme les métaux lourds (Cunningham & Ow, 1996). Ce sont essentiellement des arbres ligneux et donc producteurs de bois d'œuvre et de chauffe (Moiroud, 1996).



Planche 1 : Aspect d'un pied de *Casuarina equisetifolia* (A) et de divers rameaux fructifiés (B et C).

Leur pouvoir calorifique est très élevé, estimé entre 4000 à 7000 kcal.kg⁻¹ (Mailly & Margolis, 1992).

Les *Casuarinaceae* sont aussi largement utilisées en foresterie urbaine comme plantes ornementales et aires récréationnelles notamment dans les zones littorales (Dommergues, 1996). Elles sont aussi utilisées comme fourrage pour les bêtes ; les chameaux broutent les rameaux de *C. equisetifolia* (Allooli *et al.*, 1991).

2. La micropropagation *in vitro*

2.1. Généralités

Les plantes se reproduisent naturellement par voie sexuée *via* les graines, mais certaines d'entre elles peuvent utiliser la multiplication végétative comme mode de reproduction. La particularité de la reproduction végétative est que les plantes filles qui en sont issues sont identiques génétiquement à la plante-mère : c'est le clonage végétal ou multiplication conforme, procédé exploitée depuis des siècles par les horticulteurs et les jardiniers : au travers des techniques de bouturage, marcottage, greffage, *etc.*

La micropropagation *in vitro* dérive de ce phénomène naturel où l'on exploite le concept de totipotence cellulaire énoncé par Haberlandt en 1902. C'est la capacité de régénération d'un organisme entier à partir d'une cellule vivante. L'application principale de la micropropagation consiste en la multiplication rapide de plantes "élites". Grâce à cette technique, le producteur peut produire les plantes sélectionnées rapidement en quantité suffisante pour avoir un impact sur le marché. Parmi les avantages de cette technique, citons l'homogénéité génétique des plantes produites (les vitroplants sont des copies génétiquement conformes à la plante mère, ou clones) et une production continue indépendante des saisons. Elle offre d'autres avantages : contrairement à la méthode de multiplication par semis qui donne un seul individu par graine, la micropropagation permet d'obtenir autant de copies désirées en partant d'un seul représentant (Rancillac, 1981). Elle constitue un outil efficace pour les programmes de conservation et d'amélioration génétique des plantes (Kameswara-Rao, 2004) et l'amélioration de la fixation biologique de l'azote (Duhoux, 1995). Elle représente sans conteste un outil puissant aux perspectives industrielles et économiques importantes, permettant l'élimination d'organismes pathogènes et la multiplication rapide des meilleures variétés (Theiler-Hedtrich & Badoux, 1986).

La micropropagation comprend un ensemble de méthodes faisant intervenir, d'une part des éléments d'asepsie, et d'autre part, la mise en place d'un environnement parfaitement contrôlé (milieux définis pour chaque type de plante, conditions optimales de température, de

lumière, d'humidité, *etc.*). En outre, la culture de tissus végétaux offre de nombreux avantages pratiques en permettant une propagation rapide des clones de plantes (Murashige, 1974).

2.2. Techniques de micropropagation *in vitro* des espèces ligneuses forestières

Chronologiquement, les premiers travaux en micropropagation *in vitro* d'espèces ligneuses revient aux auteurs suivants :

Les premiers travaux sur l'organogenèse *in vitro* des espèces ligneuses sont dus à Gautheret (1940a ; 1940b) qui a réussi la culture de tissus cambiaux de l'orme (*Ulmus campestris* L.), et les premières tentatives pour multiplier *in vitro* des bourgeons d'espèces fruitières ont été entreprises par Nekrasova (1964) ; Jones (1967) ; Dutcher & Powell (1972).

Jones & Hatfield (1976) ont réussi pour la première fois l'enracinement de jeunes pousses de pommier développées *in vitro* en ajoutant du phloroglucinol dans le milieu de culture. Ceci a ouvert la voie à la multiplication par prolifération de bourgeons axillaires de plusieurs espèces fruitières ligneuses (*Malus*, *Prunus*) ou semi-ligneuses (*Ribes*, *Rubus*) et d'arbres ou d'arbustes ornementaux (*Betula*, *Grevillea*, *Kalmia*, *Salix*, *Spirea*) (Hu & Wang, 1983).

La micropropagation des espèces ligneuses est réalisée selon les étapes classiques de mise en culture (sélection des explants, multiplication, enracinement, acclimatation). Les explants initiaux sont souvent des apex prélevés sur des plantes mobilisées en serre pour limiter les risques de contamination.

Les principales difficultés rencontrées dans la multiplication *in vitro* des ligneux tiennent :

- aux fortes contaminations des explants et à la difficulté d'obtenir une culture axénique ;
- à la libération des substances phénoliques dans le milieu de culture ;
- au statut de la plante-mère (son génotype, son état nutritionnel) ;
- au statut physiologique de l'explant.

Pour maintenir l'intégrité génétique des clones, la mise en culture des microboutures, puis la stimulation de ces derniers et leur prolifération est la méthode la plus généralement appliquée en micropropagation des ligneux. (Walali Loudyi, 1993).

Plus récemment, les méthodes basées sur l'organogenèse des bourgeons adventifs, l'embryogenèse, la multiplication à partir de cals ou de protoplastes ont connu un net développement chez les ligneux. Potentiellement, ces méthodes sont plus

rapides et plus efficaces que la multiplication par microboutures, mais elles peuvent aboutir à des instabilités génétiques. Des modifications génétiques sous forme de polyploïdie ou d'aneuploïdie, résultant d'anomalies mitotiques, peuvent apparaître au cours de la culture (Bayliss, 1973 ; Mahlderg *et al.*, 1975).

Le stade de développement est un des aspects les plus importants dans la micropropagation des espèces ligneuses. Les explants juvéniles ou rejuvénilisés s'organisent mieux en culture *in vitro* que ceux provenant de matériel adulte (Walali Loudyi, 1993).

La multiplication par bourgeonnement axillaire a trouvé un large champ d'application dans le cas des espèces forestières de zones tempérées ou tropicales, de fruitiers et d'espèces ornementales ligneuses (George & Sherrington, 1984 ; Bajaj, 1989).

La méthode de prolifération par bourgeonnement axillaire est la plus généralisée comparativement au bourgeonnement adventif ou à l'embryogenèse somatique. C'est elle aussi qui est utilisée à grande échelle pour la micropropagation massale.

Dans le cas particulier de l'Eucalyptus, des sujets élites multipliés *in vitro* ont présenté une grande uniformité et un taux de croissance 3 fois supérieur comparativement à des plants issus de semis (Gupta & Mascarhenas, 1987).

Le rajeunissement *in vitro* a eu aussi pour résultat une plus grande facilité d'enracinement pour des sujets de pommier difficiles à multiplier en pépinière (Webster & Jones, 1989 ; Navatel *et al.*, 1988).

2.3. Techniques de micropropagation *in vitro* mises au point pour les *Casuarinaceae*

Depuis plusieurs années, on a eu recours au bouturage pour multiplier certaines espèces de *Casuarina* (Somasundaran & Jagadees, 1977 ; Husain & Ponnuswamy, 1980 ; Lundquist & Torrey, 1984 ; El-Lakany & Shepherd, 1984). Un exemple sera pris chez deux arbres fixateurs d'azote, *Casuarina equisetifolia* L. Johnson et *Allocasuarina verticillata* (Lam.) L. Johnson (*Casuarinaceae*), largement utilisés dans les zones tropicales et subtropicales :

- Explants juvéniles

Des explants racinaires de jeunes plants d'*Allocasuarina verticillata* régénèrent des bourgeons adventifs dans un milieu nutritif constitué par une solution minérale de Murashige & Skoog (1962) additionnée de l'addendum vitaminique de

Nitsch & Nitsch (1965), de saccharose à 20 g.L⁻¹ et de régulateurs de croissance de type BAP et AIA (Allioux, 1990). La multiplication des tiges régénérées à partir d'explants racinaires ou de jeunes plantes est considérablement augmentée si on remplace le saccharose par le maltose (30 à 60 g.L⁻¹). Ce traitement réduit la callogenèse, augmente le nombre de tiges régénérées ainsi que leur teneur en chlorophylle (Cao *et al.*, 1990). Enfin, chaque rameau néoformé est sectionné et enraciné sur un milieu de rhizogenèse enrichi en auxine. Les vitroplants sont ensuite acclimatés en serre et transplantés au champ.

- Explants prélevés sur des arbres âgés

Il est couramment admis que la multiplication des arbres âgés présente des difficultés liées à la reprise de croissance des organes et à leur port souvent plagiotrope (Durand-Cresswell *et al.*, 1982). Afin d'éviter ces obstacles, on procède au rejeunilisation de l'individu élite sélectionné, ou bien, on recherche sur l'arbre âgé, des organes encore "jeunes". Cette dernière stratégie a été développée avec succès sur un individu âgé de filao (*Casuarina equisetifolia*). La technique consiste à prélever sur un arbre adulte, des explants constitués par des inflorescences femelles immatures (IFI) prélevées 3 semaines au plus tard avant l'épanouissement des fleurs (Duhoux *et al.*, 1986) et mis en culture dans un milieu nutritif gélosé constitué par une solution minérale de Murashige & Skoog (1962) additionnée de l'addendum vitaminique de Nitsch & Nitsch (1965), de saccharose à 30 g.L⁻¹ et de régulateurs de croissance (BAP et ANA).

Une IFI peut donner, dans des conditions favorables, 30 rameaux après 11 semaines de culture, provenant soit des bourgeons végétatifs, soit des bourgeons floraux. Afin de favoriser l'allongement des rameaux néoformés, on procède ensuite à un transfert de l'IFI dans un milieu neuf, additionné de charbon actif à raison de 10 g.L⁻¹; les rameaux s'allongent et atteignent environ 2 à 3 cm, 3 à 4 semaines plus tard. Enfin, sectionnés puis transplantés sur un milieu de base MS sans BAP ni charbon actif mais additionné d'auxine (ANA à 2 µmol.L⁻¹), ils s'enracinent et constituent autant de vitroplants.

Les plantules ainsi obtenues ont été ensuite transférées dans des pots renfermant un sol très sableux, sol Dior de Bel-Air, Dakar (Gauthier *et al.*, 1985), où leur croissance a été satisfaisante. On n'a décelé aucune tendance à la plagiotropie (Duhoux *et al.*, 1986).

3. Caractérisation génétique

3.1. Généralités

Les méthodes de micropropagation (microbouturage et culture de méristèmes, culture de tissus, de cellules et de protoplastes) impliquent des divisions cellulaires non réductrices du pool chromosomique (mitoses). Ainsi, pour chaque cycle mitotique on aboutit à 2 cellules filles, théoriquement identiques à la cellule mère.

Bien que rares (fréquence = 10^{-6}), il peut se produire naturellement au cours des différentes phases de la culture *in vitro* des changements de séquence nucléotidique résultant d'une mutation, d'une recombinaison, d'une délétion ou d'une transposition (Kidwell & Lisch, 1997 ; Clegg *et al.*, 1997) qui peuvent induire des différences phénotypiques ou physiologiques. Les conditions de culture *in vitro* sont susceptibles de modifier la fréquence des mutations ou d'ajouter d'autres causes de variation.

La variabilité engendrée par la culture *in vitro* est de deux sortes :

- une variabilité non désirée pour la multiplication conforme de clones.
- une variabilité voulue pour l'obtention de nouveaux génotypes.

La variabilité non souhaitée reste un obstacle pour la multiplication conforme. En effet, celle-ci doit assurer une stabilité génétique du matériel *in vitro*.

Pour contrôler efficacement cette diversité génétique, la capacité d'identifier la variation génétique est indispensable.

La caractérisation de la diversité a longtemps été basée sur des traits morphologiques. Cependant, la variation morphologique s'avère souvent limitée et l'expression de génotype peut être affectée par des conditions environnementales, restreignant de ce fait l'analyse de la variation génétique. Par conséquent, des techniques génétiques moléculaires sont appliquées de nos jours comme stratégie complémentaire aux approches traditionnelles dans la gestion des ressources génétiques (Bretting & Widrlechner, 1995 ; Brown & Kresovich, 1996 ; Ayad *et al.*, 1997).

Les marqueurs génétiques employés plus récemment sont de types : isoenzymatique ou nucléique, avec pour ce dernier type de marqueur, une expression qui est indépendante des conditions environnementales.

De façon générale, les marqueurs génétiques sont facilement détectables et transmissibles génétiquement. Ils résultent d'un polymorphisme pouvant être utilisé dans l'étude de la diversité génétique des espèces.

Le polymorphisme génétique est représenté par la coexistence de plusieurs allèles en un locus (Gouyon *et al.*, 1997).

Pour mettre en évidence ce polymorphisme génétique, plusieurs techniques sont aujourd'hui disponibles et sont toutes regroupées sous le terme de marqueur génétique (DeVienne, 1998). Un marqueur génétique est défini comme un locus polymorphe dont le génotype renseigne sur le génotype d'un ou de plusieurs loci voisins.

Lorsqu'il est directement lié à l'ADN, c'est un marqueur moléculaire. Lorsqu'il est exprimé sous forme d'isoenzymes ou protéines, il est qualifié de marqueur biochimique. Les marqueurs biochimiques et moléculaires permettent de mettre en évidence, de façon plus ou moins fine, le polymorphisme de séquences d'ADN d'un certain nombre de sites ou de loci répartis sur le génome. Ils ont été appliqués aux espèces ligneuses.

3.2. Caractérisation moléculaire des espèces ligneuses forestières

Chez les espèces ligneuses, différentes techniques de marquage génétique basées sur l'amplification et/ou la digestion de l'ADN ont été utilisées, parmi lesquelles on peut citer la RFLP, les Microsatellites, l'ISSR, la RAPD et L'AFLP.

3.2.1. Les techniques basées sur l'amplification de l'ADN

Les Microsatellites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*), sont constitués de répétition en tandem de motifs mono-, di-, tri- ou tétranucléotidiques (Tautz, 1989). Les plus courants sont (A)_n, (TC)_n, (TAT)_n, (GATA)_n, *etc.* ; la valeur de *n* pouvant aller de quelques unités à plusieurs dizaines. Ces motifs sont largement distribués dans le génome des plantes et des animaux. Les séquences qui les bordent sont très conservées même entre espèces et sont utilisées dans le choix d'amorces pour amplifier et détecter par simple PCR une variation au niveau du microsatellite. La source de polymorphisme recherchée est la variation du nombre de répétitions du motif de base du microsatellite. Outre leur distribution sur l'ensemble du génome, ce qui fait l'intérêt en génétique et leur polymorphisme extrêmement élevé, les microsatellites constituent d'excellents marqueurs génétiques.

Par exemple, six microsatellites d'origine chloroplastique (cpSSR) ont permis de mettre en évidence un pourcentage élevé d'haplotypes dans des populations de *Abies* suggérant que *Abies nebrodensis* est un taxon différent de *A. alba*, *A. numidica* et *A. cephalonica* et subirait une érosion génétique (*genetic bottleneck*) (Parducci *et al.*, 2001).

Une vingtaine de microsatellites ont également été repérés dans le génome chloroplastique de *Pinus thunbergii*, qui se sont révélés universelles chez d'autres espèces

de conifères (Vendramin *et al.*, 1996). Ces microsatellites de chloroplastes représentent une nouvelle catégorie de marqueurs moléculaires qui peuvent être efficacement employés pour évaluer la diversité génétique chez les espèces d'arbres forestiers. Leur degré élevé de polymorphisme et leur localisation dans le génome de chloroplastes, qui est paternellement hérité chez la plupart des conifères (Neale *et al.*, 1986 ; Neale & Sederoff, 1989) et donc ne se recombine pas, permettent également d'étudier le flux de gènes *via* les grains de pollen et les graines dans les populations.

L'ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) ou Amplification Inter microsatellite est une exploitation plus récente des microsatellites consistant en leur révélation en masse, en s'inspirant du principe de la RAPD (Zietkiewicz *et al.*, 1994). On utilise pour cela une amorce constituée pour partie d'une séquence de microsatellite et pour partie de bases arbitraires. Ainsi, de nombreux fragments flanqués de microsatellites et très polymorphes peuvent être amplifiés grâce à cette technique. Elle a été largement utilisée chez les plantes pour :

- l'analyse des rapports génétiques inter et intra espèce (Salimath *et al.*, 1995 ; Tsumura *et al.*, 1996 ; Ge & Sun 1999 ; Ajibade *et al.*, 2000 ; Huang & Sun, 2000 ; Martin & Sanchez-Yelamo, 2000) ;
- l'évaluation de l'hybridation dans les populations naturelles (Wolfe *et al.*, 1998) et l'analyse du germplasma (Proven *et al.*, 1996 ; Gilbert *et al.*, 1999).

L'ISSR a été employée pour l'analyse génétique de six espèces d'*Allocasuarina*, de cinq espèces de *Casuarina* et de 12 sélections de la représentation supérieure de *Casuarina equisetifolia* cela a permis de produire 57 marqueurs polymorphes d'ISSR tandis que l'analyse par FISSR qui est une méthode améliorée d'ISSR appelé ISSR fluorescent, indiquait 105 marqueurs polymorphes. L'amorce CRR(ATT)₄ a distingué toutes les sélections et les profils ADN obtenus avec les ISSR et les essais FISSR serviraient de bibliothèque de référence à l'établissement de l'identité clonale chez les *Casuarina*. (Yasodha *et al.*, 2004).

La phylogénie et les rapports taxonomiques chez les *Casuarina* ont été étudiés au tout début en utilisant la dimension et le nombre de chromosomes, les modèles de distribution géographique (Barlow, 1959 - 1983) ; la diversification dans les caractéristiques morphologiques (Wilson & Johnson, 1989) ; ce qui a permis de distinguer les membres d'*Allocasuarina* et de *Casuarina*.

Récemment, les gènes chloroplastiques *rbcL* et *matK* ont été utilisés pour l'analyse de la diversité génétique des *Casuarinaceae* (Sogo *et al.*, 2001) ce qui a permis de mettre en

évidence les rapports phylogénétique entre 76 espèces et d'examiner la diversité au sein de la famille (Steane *et al.*, 2003).

La RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) ou ADN polymorphe amplifié au hasard (Williams *et al.*, 1990) est une technique dérivant de la PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Elle a l'avantage d'être simple, rapide, relativement peu coûteuse et ne nécessite ni radioactivité ni connaissance au préalable du génome cible ce qui étend son spectre d'application à toutes les espèces. Mais, la RAPD présente un inconvénient majeur de reproductibilité et de dominance des marqueurs (Chevallier, 1998).

Chez *Casuarina equisetifolia*, la RAPD a permis de révéler une variabilité inter et intraprovenance respectivement de 39,28 et 60,72% (Ho *et al.*, 2002b). Cependant, lorsque les provenances des hémisphères Nord et Sud sont traitées comme des groupes différents, la variabilité génétique est estimée à 2,42%, à 37,55% entre provenances du même groupe et à 60,03% entre individus d'une même provenance mais aucune différence significative n'a été trouvée entre les latitudes Nord et Sud. Les résultats discriminent nettement *C. equisetifolia* var. *incana* de *C. equisetifolia* var. *equisetifolia*.

Ayant comme particularité de pouvoir être utilisée sur quasiment tout type de matériel végétal (Hadrys *et al.*, 1992), la RAPD a permis de caractériser la diversité de plusieurs espèces d'arbres forestiers notamment :

- l'acajou dont on a évalué l'ampleur de la variation génétique (Chalmers *et al.*, 1994) ;
- le sapin noir pour la stabilité génétique des populations dérivées d'embryogenèse somatique (Isabel *et al.*, 1993) ;
- l'identification des marqueurs moléculaires liés vraisemblablement au défaut de fente du bois dans une population d'*Eucalyptus grandis* issue de pollinisation libre (Barros *et al.*, 2002) ;
- l'étude génétique préliminaire de peuplements naturels d'*Acacia senegal* et *Acacia laeta* du Burkina Faso (Yoda, 2004) ;
- l'étude génétique de peuplements belges de *Quercus petraea* et de *Quercus robur*. (Bizoux, 2002).

3.2.2. Les techniques basées sur la digestion et l'amplification de l'ADN

La RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) ou Polymorphisme de longueur de fragments de restriction est une technique qui a été publiée par Botstein *et al.*, en 1980. Elle est basée sur la digestion de l'ADN cible et l'hybridation par une sonde marquée, des fragments de restriction préalablement séparés par électrophorèse et transférés sur une membrane (technique de Southern). Ainsi, les mutations, les délétions et insertions au niveau des sites de restriction de l'enzyme sont à l'origine du polymorphisme observé. Cette technique assez lourde de part sa mise en œuvre et son coût a eu un gros succès auprès des généticiens, car elle donnait accès à un nombre très élevé de marqueurs distribués le long du génome. Elle a permis notamment d'évaluer la diversité génétique des populations sauvages cultivées d'*Hevea brasiliensis* et les résultats ont constitué un guide essentiel à l'incorporation de matériel sauvage dans des programmes de multiplication (Besse *et al.*, 1994).

L'AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) ou Polymorphisme de longueur des fragments d'amplification est une amplification PCR d'ADN génomique après digestion avec deux enzymes de restriction et ligation d'un adaptateur d'environ 20 paires de bases. Les amorces sont constituées de l'adaptateur plus 3 bases aléatoires en 3' (Vos *et al.*, 1995). Les fragments produits par cette amplification sont séparés par électrophorèse sur un gel d'acrylamide. Cette technique est fondée sur la mise en évidence conjointe de polymorphisme de site de restriction et d'hybridation d'amorce arbitraire. Dans le domaine végétal, l'AFLP connaît un engouement croissant en tant que technique d'empreintes génétiques, en raison du nombre élevé de bandes polymorphes qu'elle fournit et de la qualité des profils produits par l'acrylamide. Elle a notamment été utilisée pour :

- des études de génétique des populations chez le saule (Beismann *et al.*, 1997) ;
- caractériser les ressources génétiques de vigne et pour éliminer le germplasma superflu (Cervera *et al.*, 1998) ;
- effectuer le génotypage d'individus apomictiques chez le palmier-dattier (Snoussi Hager, 2000) ;
- établir les niveaux élevés de différenciation génétique parmi les populations de *Moringa oleifera* introduites en Afrique et suggérer la provenance comme un facteur important dans la conservation et l'exploitation des ressources génétiques de cette espèce (Muluvi *et al.*, 1999).

MATERIELS
&
METHODES

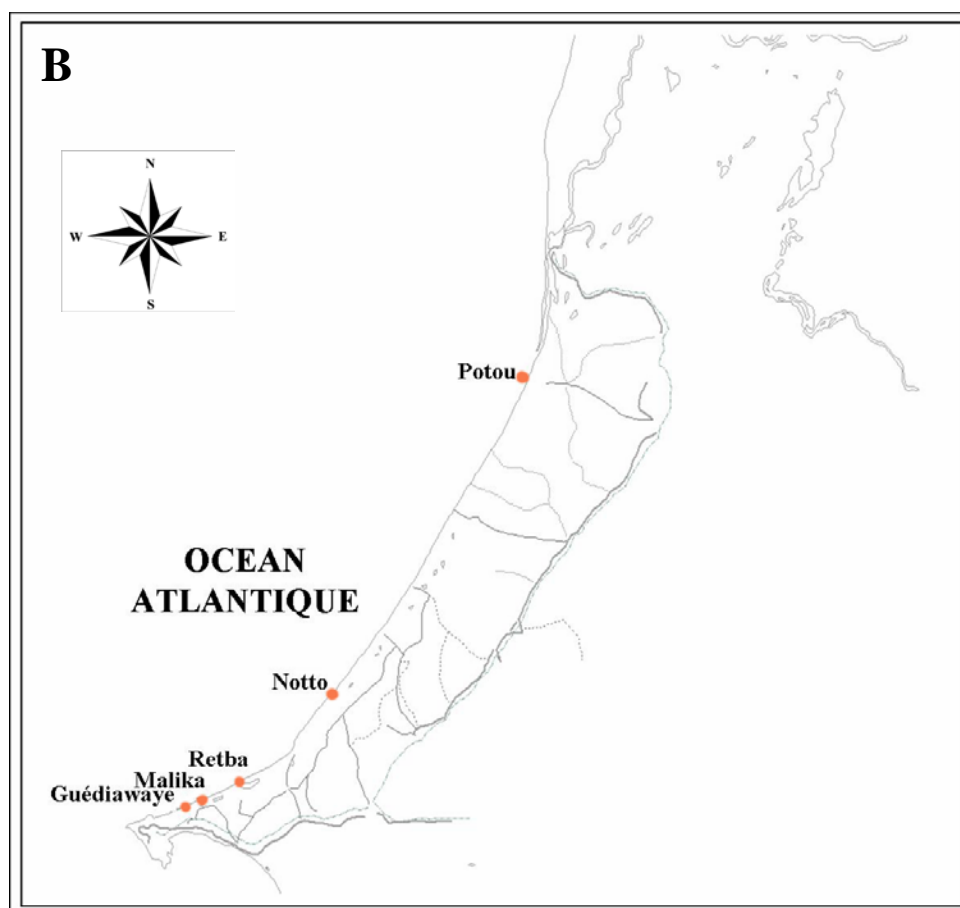


Planche 2 : Zones de prospection et de collecte des échantillons de *Casuarina equisetifolia*.

A : Vue aérienne de la barrière verte de *C. equisetifolia* le long du littoral Nord (Photo extraite du film réalisé par R. Kudelka : Niayes ak diéri, la fixation des dunes au Sénégal, 1991).

B : Situation géographique des sites de prospection et de collecte des échantillons (Source : CSE, Fann-Résidence).

I. Sélection et collecte des échantillons de *Casuarina equisetifolia*

Les échantillons de filao ont été prélevés au niveau de 5 différents sites de prospection situés le long de la bande côtière du littoral Nord et qui comprend les populations les plus vieillissantes : Guédiawaye, Malika, Retba, Notto et Potou (Planche 2). La collecte des échantillons s'est faite au niveau de chaque site sur 30 arbres de différents sexes ; soit 10 pieds femelles, 10 pieds hermaphrodites et 10 pieds mâles (Planche 3) sélectionnés sur la base essentiellement de 3 critères morphologiques : la circonférence, la hauteur et le port de l'arbre.

Des inflorescences femelles immatures (IFI) et des nœuds axillaires (Planche 4) ont été prélevés comme explants à introduire *in vitro*, puisque chez les arbres certaines zones conservent des caractères de juvénilité plus longtemps que d'autres (Bonga & Durzan, 1982). Sur les 5 sites de prospection, 150 individus ont été sélectionnés et 40 nœuds axillaires ont été récoltés sur les pieds mâles, femelles et hermaphrodites. De plus, 50 IFI ont été prélevés par arbre femelle. Ainsi, l'échantillonnage correspond au total à 2500 IFI et 6000 nœuds axillaires.

Les caractéristiques de chaque site sont données sur la base d'une liste de descripteurs précisée dans le formulaire de description (voir Annexe 1). Cette liste tient compte de l'humidité relative au niveau de la station, de son état de submersion, du mode d'exploitation de la station, de l'état de la surface du sol et de la structure des peuplements de filao au niveau du site.

Les coordonnées GPS (latitude et longitude) de chaque arbre sélectionné ont été à chaque fois précisées. Les relevés de végétation des 5 sites sont précisés en Annexes 2, 3, 4, 5 et 6.

Afin d'assurer une bonne conservation et permettre une reprise de croissance du matériel végétal destiné aux différentes introductions, les IFI et une moitié des nœuds axillaires récoltés par arbre ont été stockés dans des boîtes de Pétri (Ø : 10 cm) contenant du coton hydrophile imbibé d'eau et placés dans une glacière. L'autre moitié des rameaux chlorophylliens portant des nœuds axillaires est repiqué sur place dans des bacs en polystyrène préalablement préparés.

En même temps, des échantillons de rameaux photosynthétiques juvéniles sont prélevés par arbre puis conservé dans des sachets de congélation contenant du silicagel en vue des analyses moléculaires.

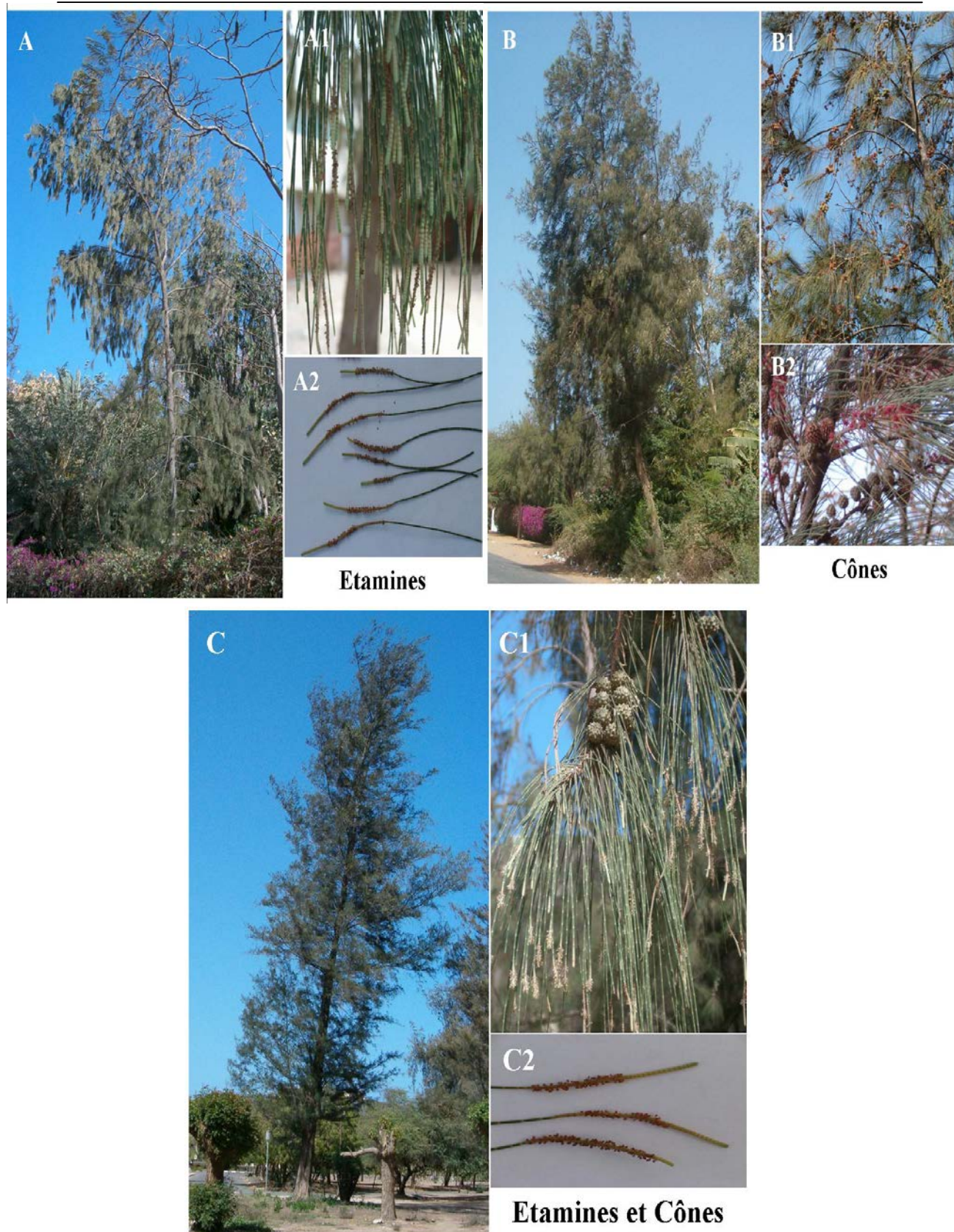


Planche 3 : Pieds de *Casuarina equisetifolia* de différents sexes.

A : Pied mâle ; **A1 et A2** : Etamines.

B : Pied femelle ; **B1** : Rameaux portant des cônes ; **B2** : Rameaux avec fleurs rouges et cônes

C : Pied hermaphrodite ; **C1** : Rameau avec cônes et étamines ; **C2** : Etamines.

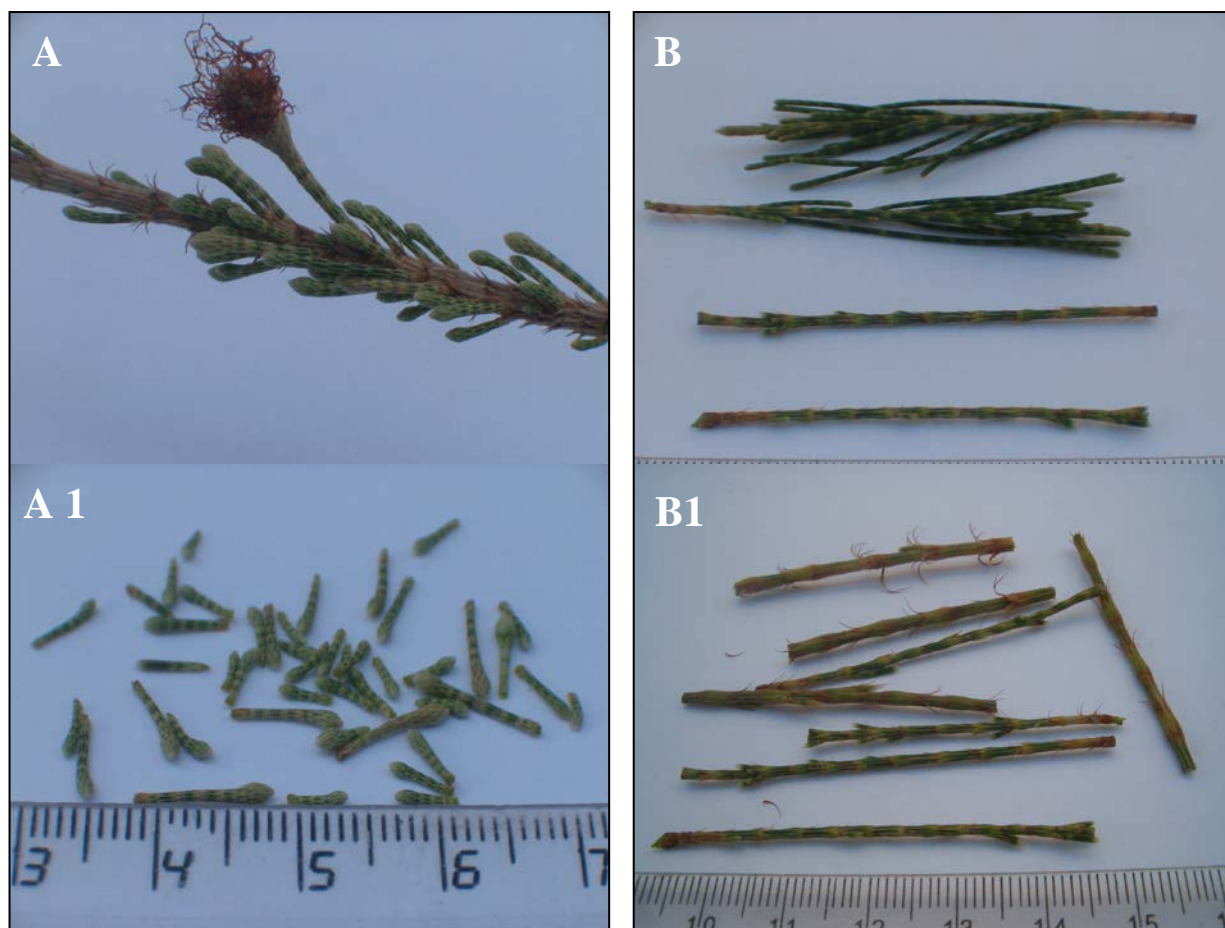


Planche 4 : Types d'explants utilisés pour la mise en culture *in vitro*.

A : Inflorescences Femelles Immatures (IFI) insérées sur un rameau.

A1 : Aspects des IFI prélevées.

B : Rameaux décidus chlorophylliens portant des feuilles très réduites.

B1 : Rameaux comportant plusieurs nœuds et internœuds (articles).

Tableau 3 : Composition du milieu nutritif de Murashige & Skoog (1962).

<u>Macro éléments</u>	<u>Concentrations (mg. L⁻¹)</u>
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
MgSO ₄ , 7 H ₂ O.....	370
CaCl ₂ , 2 H ₂ O.....	440
KH ₂ PO ₄	170
<u>Micro éléments</u>	
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ , 4 H ₂ O.....	22,3
ZnSO ₄ , 7 H ₂ O.....	8,6
KI.....	0,83
Na ₂ MoO ₄ , 2 H ₂ O.....	0,25
CuSO ₄ , 5 H ₂ O.....	0,025
CoCl ₂ , 6 H ₂ O.....	0,025
Chélate de fer	
Na ₂ EDTA.....	37,25
FeSO ₄ , 7 H ₂ O.....	27,85
<u>Composés organiques</u>	
Sucre -alcool	
Méso-inositol.....	100
Aminoacides	
Glycine.....	2
Vitamines	
Acide nicotinique.....	0,5
Pyridoxine-HCL.....	0,5
Thiamine-HCL.....	0,1
Saccharose.....	20 g.L⁻¹
<u>Agent gélifiant</u>	
Agar.....	8 g. L ⁻¹
Le pH du milieu est ajusté à 5,7	

II. Micropropagation

1. Mobilisation du matériel végétal en serre

Le matériel mobilisé en serre est constitué de la seconde moitié des rameaux chlorophylliens portant des nœuds axillaires. Ces derniers ont été cultivés dans des bacs en polystyrène CK35 (58 x 36 x 22,5 cm) contenant un mélange (v/v) sable de dune/terreau stérilisé au préalable à 121°C pendant 1 heure. Le substrat de culture a été par la suite traité avec un anti fongique : aliette, deux jours avant la mise en culture des échantillons. La partie basale des nœuds axillaires est enduite d'une hormone de bouturage (KB Substral) avant le repiquage. Pour chaque provenance 600 nœuds ont été cultivés à raison de 20 nœuds par arbre sélectionné.

2. Culture *in vitro* de *Casuarina equisetifolia*

2.1. Multiplication

2.1.1. Désinfection des explants

Les explants prélevés ont été lavés à l'eau savonneuse additionnée de quelques gouttes de Tween 20 pendant 2 min, puis rincés à l'eau courante pendant 1 h. Ensuite, ils ont subi un trempage de 2 h dans une solution anti-oxydante d'acide ascorbique et d'acide citrique à 150 mg.L⁻¹ (w/v : w/v) puis désinfectés avec HgCl₂ à 1‰ pendant 2 min. Après 5 rinçages successifs à l'H₂O distillée stérile, les explants sont trempés à nouveau pendant 4 h dans une solution désinfectante de PPM (*Plant Preservative Mixture*) suivi de leur mise en culture sans rinçage dans des boîtes de Pétri pour les IFI et dans des bocaux pour les nœuds axillaires. Les taux de désinfection des nœuds et des IFI ont été déterminés pour chaque condition de culture, respectivement après 3 et 5 semaines d'incubation.

2.1.2. Milieux de culture

Pour optimiser les taux de réactivité et de croissance des explants prélevés, des tests ont été réalisés sur différents milieux constitués du milieu nutritif de base MS (Murashige & Skoog, 1962) dont la composition est indiquée au Tableau 3, additionné des vitamines de Nitsch & Nitsch (1965). Ces milieux sont complétés avec différentes concentrations de BAP seule ou associée à l'ANA à pH 5,7 et solidifié avec de l'agar à 8 g.L⁻¹ puis autoclavé à 110°C ; 20 min.

Pour ce faire, des IFI ont été cultivées en présence de BAP à 0 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 et 2,5 mg.L⁻¹ combinée à l'ANA à 9,31.10⁻³ mg.L⁻¹ et les nœuds axillaires en présence de BAP à 0 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 et 2,5 mg.L⁻¹ seule ou combinée à l'ANA à 9,31.10⁻³ mg.L⁻¹. (Tableau 4).

Tableau 4 : Combinaisons hormonales des divers milieux de cultures utilisés.

Milieux	Régulateurs de croissance (mg.L ⁻¹)	Types d'explants cultivés
M0	Témoins sans hormone : MS(0)	IFI
		rameaux chlorophylliens à entrenoeuds
M1	BAP 0,5	rameaux chlorophylliens à entrenoeuds
M2	BAP 1	
M3	BAP 1,5	
M4	BAP 2	
M5	BAP 2,5	
M6	BAP 0,5 + ANA 9,31.10 ⁻³	IFI
		rameaux chlorophylliens à entrenoeuds
M7	BAP 1 + ANA 9,31.10 ⁻³	IFI
		rameaux chlorophylliens à entrenoeuds
M8	BAP 1,5 + ANA 9,31.10 ⁻³	IFI
		rameaux chlorophylliens à entrenoeuds
M9	BAP 2 + ANA 9,31.10 ⁻³	IFI
		rameaux chlorophylliens à entrenoeuds
M10	BAP 2,5 + ANA 9,31.10 ⁻³	IFI
		rameaux chlorophylliens à entrenoeuds

Pour chaque milieu de culture, 50 IFI et 24 nœuds axillaires ont été utilisés. Cela correspond à des effectifs de 300 IFI et 264 nœuds introduits *in vitro*. S'agissant des IFI, leur culture s'est faite dans trois milieux successifs, d'abord ils sont stimulés dans des milieux MS contenant ou non de l'ANA et de la BAP, puis, après réaction ils sont transférés dans des milieux MS neuf de même composition que les premiers mais additionné de charbon actif à 20 g.L⁻¹. Ensuite, après développement des pousses néoformées sur les explants introduits en culture, ces derniers sont transférés de nouveau dans des milieux identiques à ceux de départ c'est-à-dire ne contenant pas du charbon actif.

Les explants sont ensemencés sous une hotte à flux laminaire stérile dans des bocaux et des boîtes de Pétri ; puis, ils sont incubés dans une salle éclairée avec des tubes fluorescents émettant une intensité lumineuse d'environ 19 watt.m⁻², sous une photopériode de 16 h de jour / 8 h de nuit et une thermopériode de 30°C ± 1°C de jour.

Les facteurs analysés ont été le taux de réactivité, le nombre moyen de pousses néoformées et la longueur moyenne de la pousse la plus longue pour chaque type de milieu.

2.2. Enracinement

L'enracinement s'est déroulé en deux phases successives et complémentaires, d'abord les vitroplants issus du milieu d'élongation sont introduits dans un milieu d'induction MS (1962) complété avec de l'ANA à 2,5 ou 5 mg.L⁻¹ puis incubés pendant 48 h à l'obscurité. Ils sont ensuite transférés dans une chambre de culture à 30°C ± 1°C sous une photopériode de 16 h de jour / 8 h de nuit et une lumière incidente de 19 watt.m⁻² sur un milieu d'expression MS sans hormone mais additionné de 40 g.L⁻¹ de saccharose, pour permettre l'allongement des ébauches racinaires. Le taux d'enracinement et la longueur moyenne de la racine principale sont déterminés 4 semaines après le transfert.

2.3. Acclimatation

Au bout de 4 semaines d'incubation dans le milieu d'expression, de jeunes plantes de *Casuarina equisetifolia* bien enracinées sont mises en condition de sevrage. Ces dernières sont retirées des bocaux et débarrassées de la gélose par un lavage de leur base à l'eau distillée. Les jeunes plantes produites *in vitro* sont ensuite repiquées dans des pots contenant un substrat composé d'un mélange de sable et de terreau (v/v) préalablement stérilisé (121°C ; 1 heure). Le substrat est conditionné dans des gobelets en plastique transpercé d'un trou à la base dans lesquels on transfère les plantes. Ces pots sont déposés dans une mini-serre où les plantes, sous cloche en plastique transparent dont l'ouverture est réglable, sont maintenues en atmosphère humide. D'après Skolmen & Mapes (1978), ce procédé est une pratique courante qui permet de réduire la transpiration et éviter leur dessèchement.

L'arrosage est fait avec de l'eau de robinet et la cloche est ouverte progressivement. Le nombre de plantes qui ont survécu après 15 jours et 1 mois d'acclimatation a été dénombré ; ce qui a permis de déterminer le taux de survie ou de reprise.

2.4. Analyse statistique des résultats

Les différents traitements effectués ont été discriminés par comparaison multiple des moyennes après analyse de variance suivie du test de Student, Newman et Keuls au seuil de probabilité de 5% (logiciels SPSS).

III. Caractérisation moléculaire

1. Extraction d'ADN

Des aiguilles sèches de filao sont prélevées et broyées dans un mortier contenant 0,2 g de Carborundum (Prolabo) et 200 µl de tampon microprep (Annexe 7)

préparé le jour même de l'extraction et conservé à la température ambiante. L'ADN est extrait selon le protocole décrit par Fulton *et al.*, 1995. Après le broyage dans 200 µl du tampon microprep et ajouté 550 µl du même tampon, le broyât est transféré dans un tube Eppendorf stérile puis incubé pendant 1 h à 65°C sous agitation (160 rpm). L'extrait est ensuite refroidi à la température ambiante pendant 5 min et enfin centrifugé à 13 000 rpm (Rotor Nr. 12024-H Sigma) pendant 15 min à 4°C. Le surnageant (700 µl) a été récupéré dans un tube Eppendorf et un volume équivalent de chloroforme-alcoolisoamylique (24:1) a été ajouté. Après avoir homogénéisé la solution, l'extrait a été centrifugé à 13 000 rpm (Rotor Nr. 12024-H Sigma) pendant 10 min à 4°C, 600 µl du surnageant ont été récupérés et l'ADN précipité avec un volume équivalent d'isopropanol refroidi à -20°C. Les tubes sont à nouveau centrifugés à 13 000 rpm pendant 10 min à 4°C. Après avoir éliminé le surnageant, l'ADN est lavé avec 100 µl d'Ethanol 70% (Prolabo), centrifugé à 13 000 rpm (Rotor Nr. 12024-H Sigma) pendant 10 min à 4°C. Il est ensuite séché pendant 1 h à la température ambiante, dissout dans 100 µl de TE x 0,1. L'ADN est conservé à -20°C ou utilisé pour les réactions d'amplification.

2. Quantification de l'ADN

L'ADN est dosé au spectrophotomètre (8500-II Spectrophotometer, Techcomp, LTD, Hongkong) à l'aide d'une cuve en quartz. Les mesures de densité optique (DO) effectuées à des longueurs d'onde de 230 nm, 260 nm et 280 nm donnent une estimation de la quantité et de la qualité des extraits d'ADN.

3. Amplification enzymatique de l'ADN

L'amplification de l'ADN a été réalisée par la méthode PCR dans un tube Eppendorf de 0,2 ml contenant 200 µM de dNTPs, 1 µM d'amorces (Génosphère Biotechnologies, Paris, France), 2,5 µl de tampon d'incubation (Appligene), 1 U de Taq lyophilisée (Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco, California, USA), 25 ng d'ADN dans un volume final de 25 µl. Les tubes sont par la suite mis dans un thermocycleur PTC 100 (MJ Research, Inc) programmé à 94°C pendant 3 min pour une prédénaturation suivi de 45 cycles de 94°C pendant 1 min, 36°C pendant 1 min et 72°C pendant 2 min suivi d'une extension finale de 72°C pendant 10 min.

4. Electrophorèse

Dans chaque tube, 5 µl de tampon de dépôt (50% glycérol, 50% TES et 0,07% de bleu de bromophénol) sont ajoutés. L'électrophorèse est réalisée sur un gel horizontal à 1,8% d'agarose (Sigma) immergé dans un tampon TBE x 1 [89 mM Tris (Sigma), 89 mM d'acide borique (Sigma), 2 mM EDTA, pH 8,3] à 120 volts pendant 4 h. Après électrophorèse, les fragments d'ADN sont colorés au bromure d'éthidium à 1 mg.L⁻¹ pendant 30 min suivi d'un lavage de 15 min dans de l'eau distillée, les bandes d'ADN sont visualisées aux UV à 320 nm puis photographiées à l'aide du logiciel BioCapt (Vilber Lourmat, Marne-La-Vallée, France).

5. Construction du dendrogramme

Les bandes reproductibles des gels sont décodées en terme de présence ou d'absence. Les bandes présentes sont notées 1 et celles absentes 0. Les bandes présentes chez tous les génotypes (marqueurs invariables) ont été exclues de l'analyse parce qu'elles ne sont pas instructives. Ce décodage binaire (1/0) obtenu à partir des données RAPD est utilisé pour confectionner une matrice de données brute qui a servi à construire un dendrogramme. Ce dernier est construit à l'aide de l'algorithme UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic*) en utilisant le logiciel Population.exe. L'algorithme ne tient pas compte des bandes absentes mais ne prend en compte que celles qui sont présentes, lesquelles sont considérées comme un indice de similarité.

RESULTATS

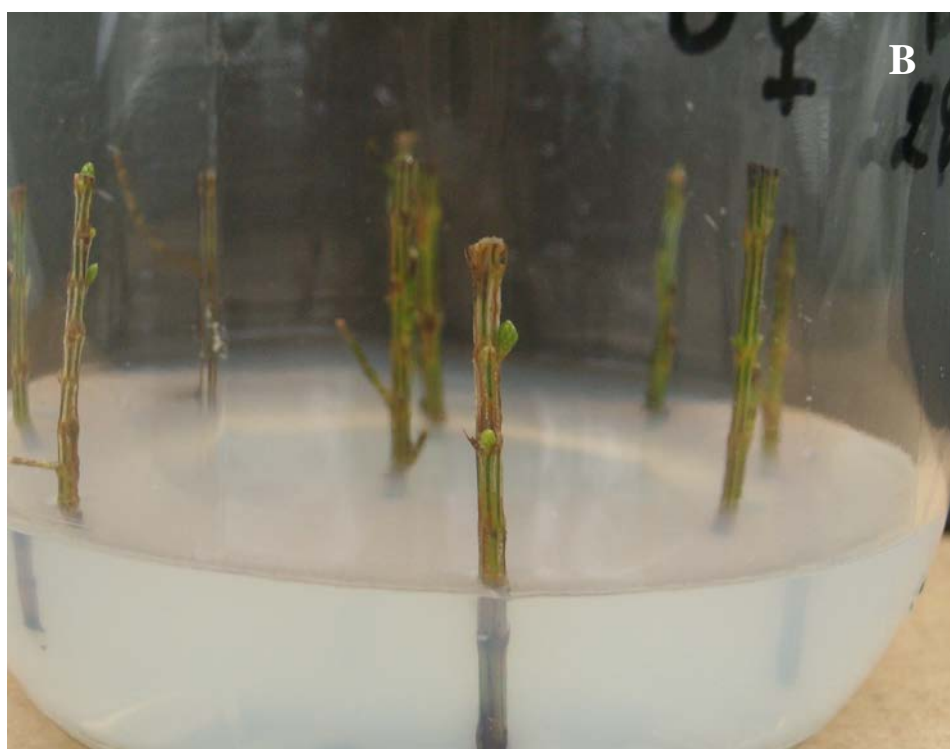


Planche 5 : Néof ormation de pousses sur des explants de *C. equisetifolia* en culture dans un milieu MS combiné ou non avec des hormones.

A : Pousses néoformées au niveau des boutons floraux d'IFI en culture dans le milieu M10 (MS + BAP 2,5 mg.L⁻¹ + ANA 9,31.10⁻³ mg.L⁻¹).

Grossissement : x 72

B : Pousses néoformées au niveau de la jonction entre deux nœuds de rameaux chlorophylliens cultivés dans le milieu MS(0).

Grossissement : x 68

I. Micropropagation

1. Culture *in vitro* de *Casuarina equisetifolia*

1.1. Désinfestation des explants

Des taux élevés de désinfestation ont été enregistré aussi bien pour les IFI que pour les nœuds axillaires mis en culture (Tableaux 5 et 6) justifiant la réussite des introductions *in vitro* à partir du matériel végétal prélevé directement sur le terrain. Ces taux varient de 62% à 96% pour les IFI (Figure 1) et de 58% à 100% pour les nœuds axillaires (Figure 2).

Cela nous a permis de poursuivre l'analyse de la réactivité des explants qui se manifeste sous forme de néoformation de pousses au niveau de la partie boursouflée des IFI et au niveau de la jonction entre deux nœuds pour les nœuds axillaires cultivés dans les conditions *in vitro* (Planche 5).

1.2. Multiplication végétative des inflorescences femelles immatures

Au bout de 5 semaines de culture des IFI dans des milieux MS solides contenant ou non des hormones, la reprise d'activité (Planche 6) la plus élevée s'obtient en présence du milieu M9 (MS + BAP 2,0 mg.L⁻¹ + ANA 9,31.10⁻³ mg.L⁻¹) avec un taux de 84% (Tableau 5, Figure 1). En revanche, dans le milieu témoin MS(0), le taux de réactivité est nul. Par la suite, les IFI poursuivent leur développement dans des milieux neuf de même combinaisons hormonales mais additionnés de charbon actif à 20 g.L⁻¹ puis, ils sont transférés dans des milieux identiques à ceux de départ ; c'est-à-dire dépourvu de charbon actif, (Planche 7). Nous constatons que le taux de réactivité augmente corrélativement avec le taux de désinfestation (Tableau 5).

1.3. Multiplication végétative des nœuds axillaires

Après 3 semaines de culture, la reprise d'activité des nœuds axillaires varie de 16,66% à 87,5% (Tableau 6). La BAP utilisée seule à 2 mg.L⁻¹ (milieu M4) a permis d'enregistrer le taux de réactivité le plus élevé ; il est de 87,5% (Figure 2). Le milieu témoin M0 donne les plus faibles taux de reprise d'activité (16,66%).

Le nombre moyen de pousses néoformées le plus élevé est d'environ 7 par explant primaire quand les nœuds axillaires sont cultivés dans le milieu M10 c'est-à-dire en présence de 2,5 mg.L⁻¹ de BAP combinée avec de l'ANA à 9,31.10⁻³ mg.L⁻¹ (Figure 3 ; Planche 8). Cependant, ce nombre n'est pas significativement différent de celui obtenu dans le milieu M8 (MS + BAP 1,5 mg.L⁻¹ + ANA 9,31.10⁻³ mg.L⁻¹). Le nombre moyen de pousses néoformées le plus faible

Tableau 5 : Taux de désinfestation et de réactivité d'IFI issus de pieds sélectionnés de *C. equisetifolia* après 5 semaines de culture sur différents milieux MS additionné de BAP et d'ANA.

	Milieux (mg.L ⁻¹)	Nombre d'IFI introduites	Désinfestation (%)	Taux de réactivité (%)
M0	MS(0)	50	62	0
M6	MS + BAP 0,5 + ANA 9,31.10 ⁻³	50	80	38
M7	MS + BAP 1,0 + ANA 9,31.10 ⁻³	50	80	60
M8	MS + BAP 1,5 + ANA 9,31.10 ⁻³	50	88	68
M9	MS + BAP 2,0 + ANA 9,31.10 ⁻³	50	96	84
M10	MS + BAP 2,5 + ANA 9,31.10 ⁻³	50	88	70

Tableau 6 : Taux de désinfestation et de croissance de nœuds axillaires issus de pieds sélectionnés de *C. equisetifolia* après 3 semaines de culture sur différents milieux MS enrichis en BAP et ANA.

	Milieux (mg.L ⁻¹)	Désinfestation (%)	Taux de réactivité (%)	Nombre moyen de pousses néoformées	Longueur moyenne des pousses (cm)
M0	MS(0)	71	16,66	0,50 a	0,029 a
M1	MS + BAP 0,5	67	33,33	1,81 abc	0,112 b
M2	MS + BAP 1	67	16,66	1,18 ab	0,031 a
M3	MS + BAP 1,5	67	58,33	5,75 de	0,162 b
M4	MS + BAP 2	96	87,5	4,13 bcde	0,130 b
M5	MS + BAP 2,5	88	45,83	4,83 cde	0,183 b
M6	MS + BAP 0,5 + ANA 9,31.10 ⁻³	63	50	2,86 abcd	0,173 b
M7	MS + BAP 1,0 + ANA 9,31.10 ⁻³	67	58,33	5,31 de	0,181 b
M8	MS + BAP 1,5 + ANA 9,31.10 ⁻³	67	62,5	6,56 e	0,131 b
M9	MS + BAP 2,0 + ANA 9,31.10 ⁻³	100	79,16	3,50 abcde	0,145 b
M10	MS + BAP 2,5 + ANA 9,31.10 ⁻³	58	58,33	7,00 e	0,135 b

(Effectifs : 24 explants / condition de culture)

Dans une même colonne et pour un même type d'explant, les chiffres suivis de la même lettre ne sont pas significativement différents au seuil de 5% du test de Newman-Keuls.

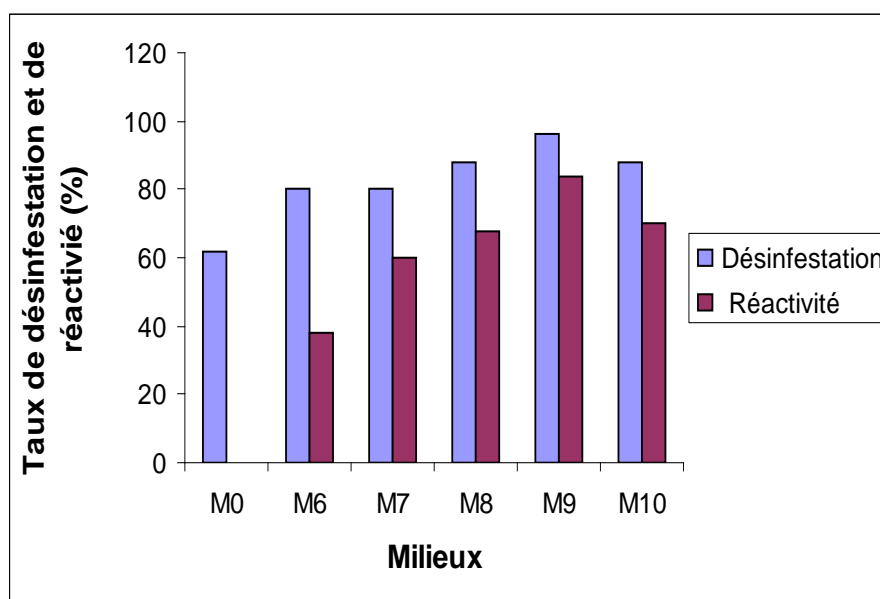


Figure 1 : Taux de désinfestation et influence de différents milieux MS (1962) sur la réactivité d'IFI de *C. equisetifolia* après 5 semaines de culture.
Chaque valeur correspond à la moyenne de 50 répétitions.

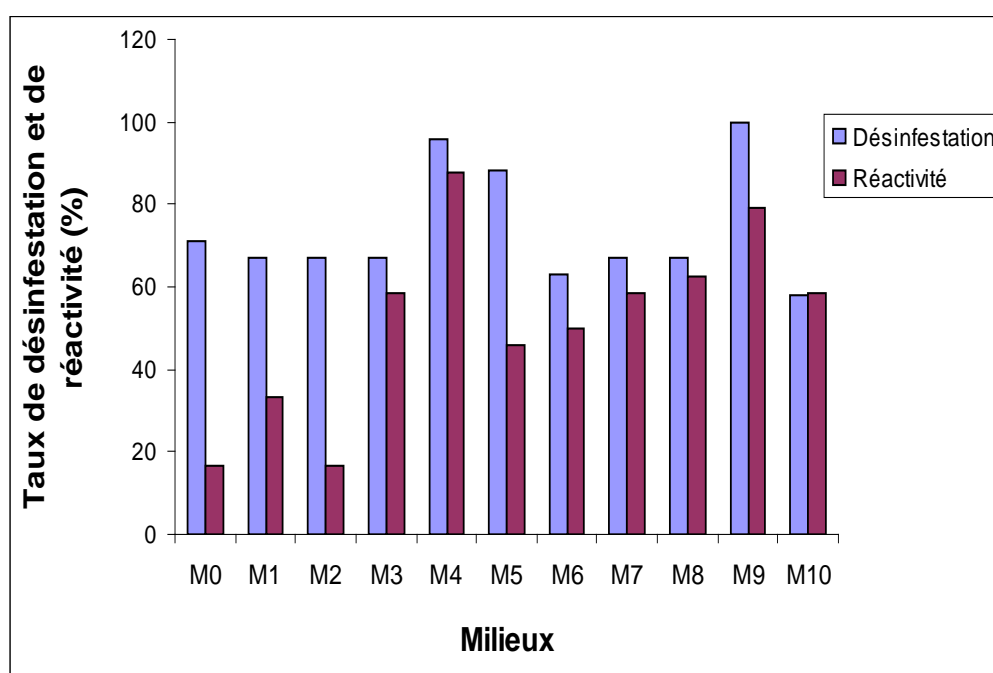


Figure 2 : Taux de désinfestation et influence des différents milieux de culture sur la réactivité de nœuds axillaires de *C. equisetifolia* après 3 semaines de culture.
Chaque valeur correspond à la moyenne de 24 répétitions.

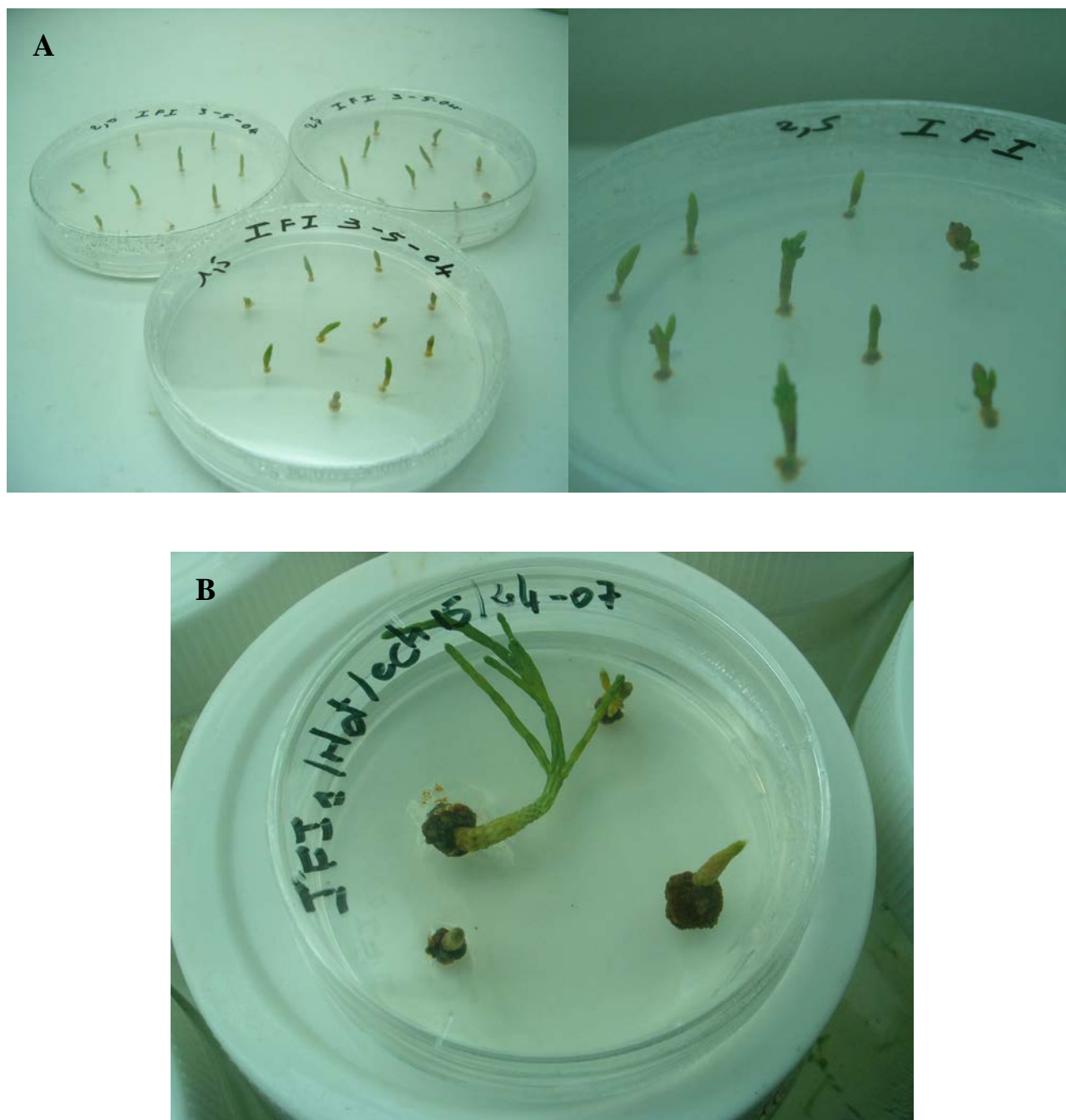


Planche 6 : Développement des IFI sur des milieux MS enrichis en ANA ($9,31.10^{-3}$ mg.L⁻¹) et à différentes concentrations en BAP.

A : Milieux avec de la BAP à 1,5 ; 2,0 ; 2,5 mg.L⁻¹ ; après 5 semaines de culture.

B : Milieu contenant de la BAP à 1,5 mg.L⁻¹ après 8 semaines de culture.



Planche 7 : Allongement des IFI en rameaux dans des milieux d'élongation contenant (A) ou non (B) du charbon actif à 20 g.L⁻¹ après 4 semaines d'incubation.

a été obtenu dans le milieu témoin M0 ; dans ce milieu, des racines apparaissent à la base des rameaux (Planche 9). En résumé, l'adjonction d'hormone est indispensable pour stimuler la néoformation des pousses. Nous avons constaté une nette amélioration du taux de multiplication lorsque la BAP est combinée à l'ANA.

Durant les 3 premières semaines de culture, les pousses s'allongent lentement avec une longueur moyenne variant entre 0,029 cm et 0,183 cm (Tableau 6). Le plus faible allongement (0,029 cm) a été obtenu dans le milieu témoin, cette valeur et celle obtenue dans le milieu M2 (MS + BAP 1 mg.L⁻¹) sont significativement différentes des autres milieux. La longueur moyenne de pousses la plus élevée (0,183 cm) a été obtenue dans le milieu M5 (MS + BAP 2,5 mg.L⁻¹). A l'exception, des milieux M0 et M2, les autres milieux ne provoquent pas d'effet significatif sur l'allongement des pousses.

Parallèlement, nous avons testé dans le milieu M0, la réactivité et le taux de multiplication de nœuds axillaires issus d'une dizaine de pieds hermaphrodites sélectionnés sur le terrain suivant leurs critères morphologiques (Tableau 7).

Les taux de désinfestation enregistrés sont élevés et varient entre 60 et 100% (Figure 4 ; Tableau 7). Après 4 semaines de culture, le plus fort taux de réactivité a été noté chez le pied numéro 8 (p8) et est égale à 90% ; de même que le plus fort taux de multiplication avec un nombre moyen de pousses néoformées égale à 5,22 (Figure 5). Cette valeur est significativement différente de celles obtenue avec les nœuds axillaires issus des autres pieds testés.

La longueur moyenne des pousses néoformées est faible et varie entre 0,022 et 1,378 cm. Les pousses les plus allongées (1,378 cm) ont été observés sur les explants issus du pied numéro 3 (p3). Cette élongation est significativement différente de celle des explants des autres pieds sélectionnés. On constate aussi que les explants du pied 9 (p9) n'ont pas réagi et présentent un nombre moyen de pousses néoformées nul.

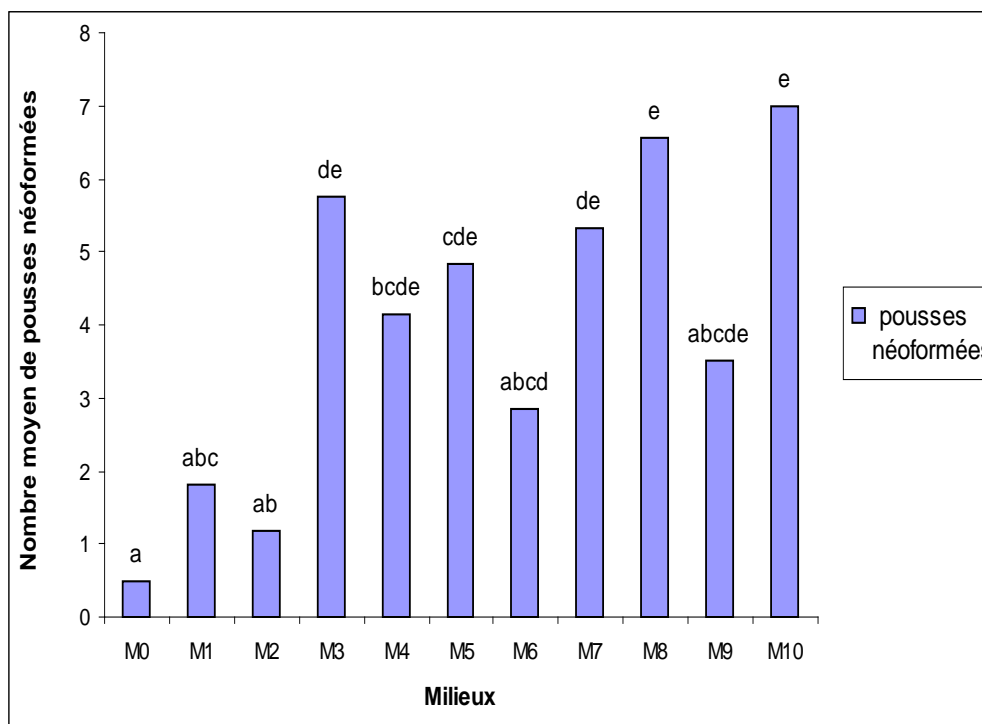


Figure 3 : Influence des différents milieux de culture sur la néoformation de pousses issus d'explants axillaires de *C. equisetifolia* après 3 semaines de culture.
Chaque valeur correspond à la moyenne d'au moins 24 répétitions.

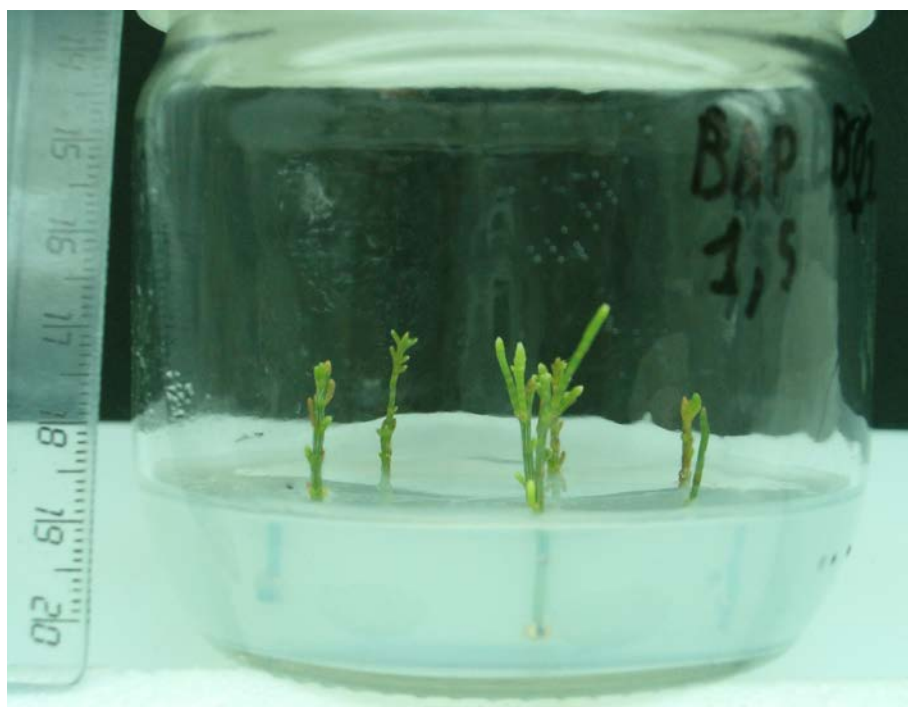


Planche 8 : Influence du milieu M8 (MS + BAP 1,5 mg.L⁻¹ + ANA 9,31. 10⁻³ mg.L⁻¹) sur le bourgeonnement d'explants axillaires de *C. equisetifolia* après 3 semaines de culture.

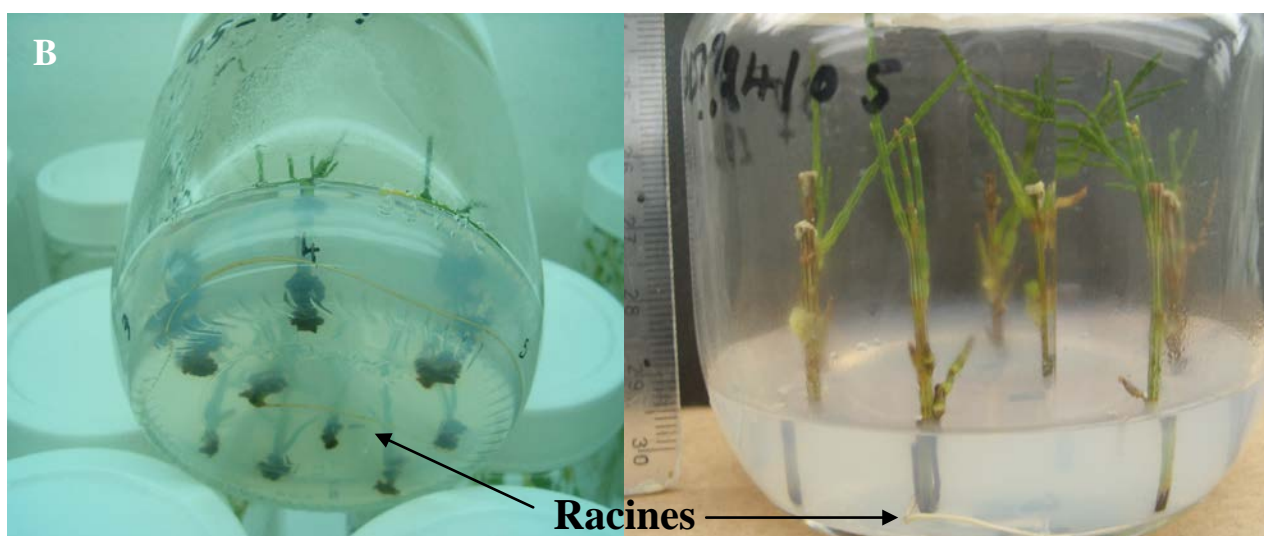


Planche 9 : Développement des nœuds axillaires en vitroplants par élongation et ramification des pousses néoformées après 8 semaines de culture sur milieu MS(0) (A), puis néoformation de racines à la base des vitroplants (B).

Tableau 7 : Taux de désinfestation, de réactivité et de croissance de nœuds axillaires issus de pieds sélectionnés de *C. equisetifolia* après 4 semaines de culture sur le milieu MS(0).

Pieds	Désinfestation (%)	Taux de réactivité (%)	Nombre moyen de pousses néoformées	Longueur moyenne des pousses (cm)
p1	90	15	0,50 a	0,166 ab
p2	85	20	0,29 a	0,200 ab
p3	95	70	2,89 b	1,378 c
p4	90	5	0,05 a	0,022 ab
p5	90	30	0,50 a	0,144 ab
p6	85	60	2,41 b	0,682 b
p7	60	25	0,83 a	0,400 ab
p8	90	90	5,22 c	0,477 ab
p9	75	0	0,00 a	0,000 a
p10	100	50	1,05 a	0,400 ab

Dans une même colonne et pour un même type d'explant, les chiffres suivis de la même lettre ne sont pas significativement différents au seuil de 5% du test de Newman-Keuls.

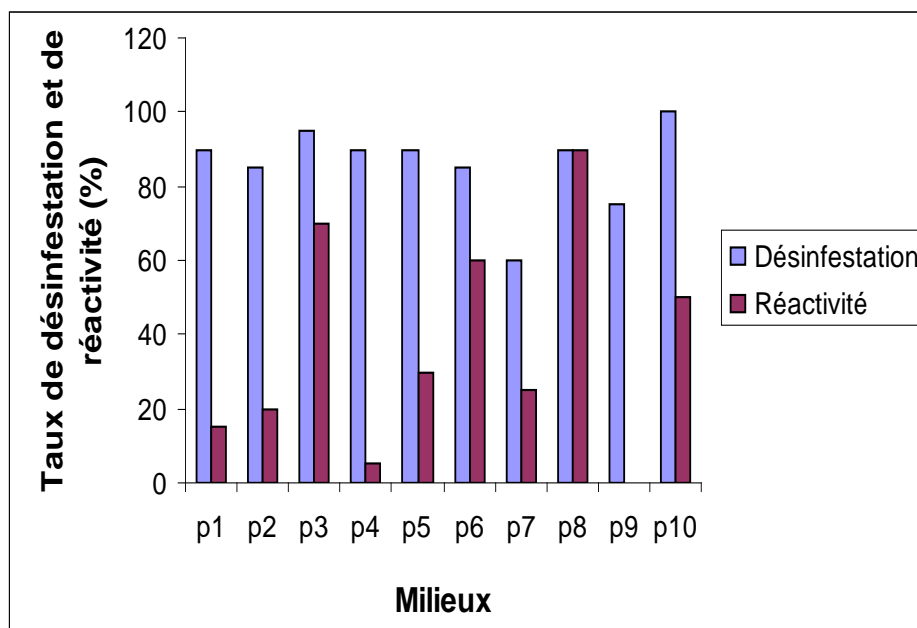


Figure 4 : Taux de désinfestation et de réactivité de nœuds axillaires issus de divers pieds sélectionnés de *C. equisetifolia* après 4 semaines de culture.
Chaque valeur correspond à la moyenne de 20 répétitions.

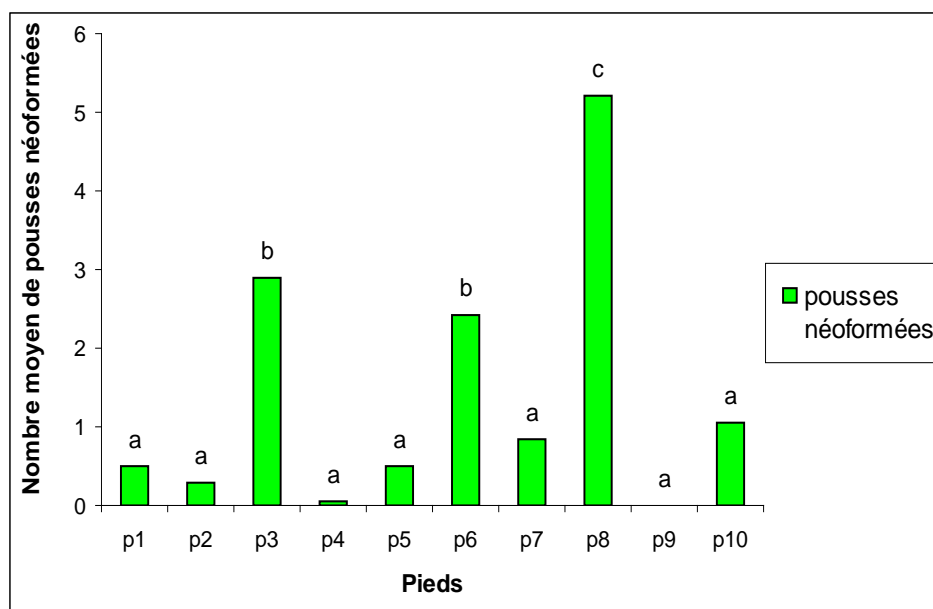


Figure 5 : Taux de multiplication d'explants axillaires issus de différents pieds sélectionnés de *C. equisetifolia* après 4 semaines de culture dans un même milieu MS(0).
Chaque valeur correspond à la moyenne de 20 répétitions.

2. Enracinement

Après 4 semaines de culture dans un milieu d'expression rhizogène, 6 microplantes sur 33 issues des IFI du milieu d'élongation et induites pendant 48 h dans un milieu MS additionné d'ANA à 5 g.L⁻¹ ont développé des racines à leur base (Planche 10). Cela correspond à un taux d'enracinement de 18,88% ; avec un nombre moyen de 1 racine principale, 3 racines secondaires et une longueur moyenne de racines principales égale à 7,16 cm. Aucune racine n'est apparue à la base des microplantes dans le milieu témoin MS(0), de même que les microplantes induites avec le milieu MS additionné d'ANA à 2,5 g.L⁻¹ (Tableau 8).

Tableau 8 : Taux d'enracinement après 4 semaines de culture sur milieu d'expression dépourvu d'hormones pour des microplantes de *C. equisetifolia* issus d'IFI et préalablement induit pendant 48 h avec divers teneur en ANA.

Milieux	Taux d'enracinement (%)	Nombre moyen de racines principales	Nombre moyen de racines secondaires	Longueur moyenne de racines principales (cm)
MS(0)	0	0	0	0
MS + ANA 2,5 g.L ⁻¹	0	0	0	0
MS + ANA 5 g.L ⁻¹	18,18	1	3	7,16

(Effectifs : 33 microplantes / condition d'induction rhizogène)

3. Acclimatation

Au cours de l'acclimatation (Planche 11 A), la fermeture complète de la mini-serre pendant 15 jours dans une atmosphère saturée d'humidité, a permis de maintenir une certaine vigueur de la partie aérienne des microplants avec un taux de survie de l'ordre de 43,75%.

Au 15^{ème} jour, tenant compte du bon comportement de la majorité des plantes placée en conditions de sevrage, nous les avons mis en contact avec l'atmosphère ambiante. Cependant, l'ouverture progressive de la mini-serre a entraîné un flétrissement des aiguilles des plantes les plus exposées à l'air ambiant ; ce qui nous a amené à limiter l'ouverture de la mini-serre à 2 ou 3 heures par jour.

Ainsi, au 30^{ème} jour d'acclimatation, le taux de survie est de 25% pour les microplants soumis à une exposition graduelle à l'air ambiant (Planche 11 B).



Planche 10 : Néof ormation de racines sur des vitroplants de *C. equisetifolia* issus d'IFI après induction pendant 48 h sur le milieu MS additionné d'ANA à 5 g.L⁻¹ et expression dans le milieu rhizogène MS(0).



Planche 11 : Acclimatation sous mini-serre fermée de vitroplants de *C. equisetifolia* néoformés à partir d'IFI.

A : Vitroplants âgés de 3 jours.

B : Plant vigoureux acclimaté pendant 30 jours.

II. Caractérisation moléculaire

Les amorces des kits A, B, F, N, O, Q, R, et T de Génosphère Biotechnologies (Paris, France) ont été testées. Parmi celles-ci, 5 amorces avec de meilleurs résultats ont été choisies pour cette étude. Un total de 1396 bandes reproductibles et 61 bandes polymorphes ont été obtenues par amplification à l'aide de ces amorces (Tableau 9). Le taux de polymorphisme (4,36 %) et le nombre moyen de bandes polymorphes pour une amorce (12,2) constituent un indicateur de variation génétique importante de cette espèce.

Tableau 9 : Nombre de bandes produites et taux de polymorphisme pour chaque amorce.

Amorces	Nombre total de bandes	Nombre de bandes polymorphes	Taux de polymorphisme (%)
A7	308	9	2,92
F4	228	16	7,01
O15	192	6	3,125
T1	329	14	4,25
T16	339	16	4,71
Total	1396	61	4,36

1. Analyse de profils RAPD

L'analyse des profils RAPD obtenus par amplification avec les amorces A7, F4 et O15 porte sur l'ensemble des 74 échantillons testés mais nous n'avons présenté pour illustration que les profils portant sur quelques échantillons.

La Figure 6A montre l'amplification de l'ADN réalisée avec l'amorce A7. Dans le puits M, nous avons un marqueur de taille moléculaire (2 Log ladder, Biolabs, New England) servant à estimer la taille des fragments d'ADN amplifiés en comparaison avec ceux du marqueur dont la quantité correspondant à chaque bande nous a été donnée par le fournisseur (Annexe 8). Dans les puits 1 à 17 se trouve l'ADN des échantillons amplifiés en utilisant l'amorce A7. Au total, 67 bandes reproductibles ont été obtenues en utilisant l'amorce A7. La taille des bandes varie entre 0,7 kb et 0,1 kb. Seules les bandes discriminantes c'est-à-dire celles qui ne sont présentes que chez certains échantillons ont été retenues pour notre analyse car étant informatives. En revanche, les bandes présentes chez tous les échantillons ont été exclues car elles n'apportent aucune information à notre analyse. Les résultats mettent en évidence une bande de 0,7 kb exclusivement présente chez les pieds mâles (3), femelles (7 ; 10) et hermaphrodites (12 ; 13 ; 14 ; 15) récoltés dans le site de Guédiawaye. Quant à la bande 0,4 kb, elle est présente chez les pieds mâles (2 ; 5), femelles (7) et hermaphrodites (15) de Guédiawaye, mais également chez le mâle (16) de Potou ; cependant, elle est absente chez les femelles et les hermaphrodites dudit site. Cette bande est également présente chez les hermaphrodites (59) de Retba, les mâles (61) et les hermaphrodites (62 ; 72) de Malika.

Sur la Figure 6B, nous avons la suite de l'amplification avec l'amorce A7, le marqueur de taille moléculaire 2 Log ladder (Biolabs, New England) étant au premier puits. Dans les puits 59 à 75 se trouve l'ADN des échantillons amplifiés en utilisant l'amorce A7. Au total 103 bandes reproductibles ont été obtenues après amplification de l'ADN des 21 échantillons. La taille des bandes varie entre 0,7 kb et 0,1 kb. Les résultats mettent en évidence une bande de 0,25 kb présente que chez les pieds mâles (62 ; 64 ; 65), femelles (66 ; 69 ; 70) et hermaphrodites (71 ; 72 ; 75) de Malika. Elle est aussi présente chez des mâles (1 ; 2) et une femelle (7) de Guédiawaye, un mâle (31) et des hermaphrodites (42 ; 43) de Notto, une femelle (25) et des hermaphrodites (26 ; 27 ; 30) de Potou, des mâles (47 ; 48 ; 49) et des femelles (51 ; 55) de Retba.

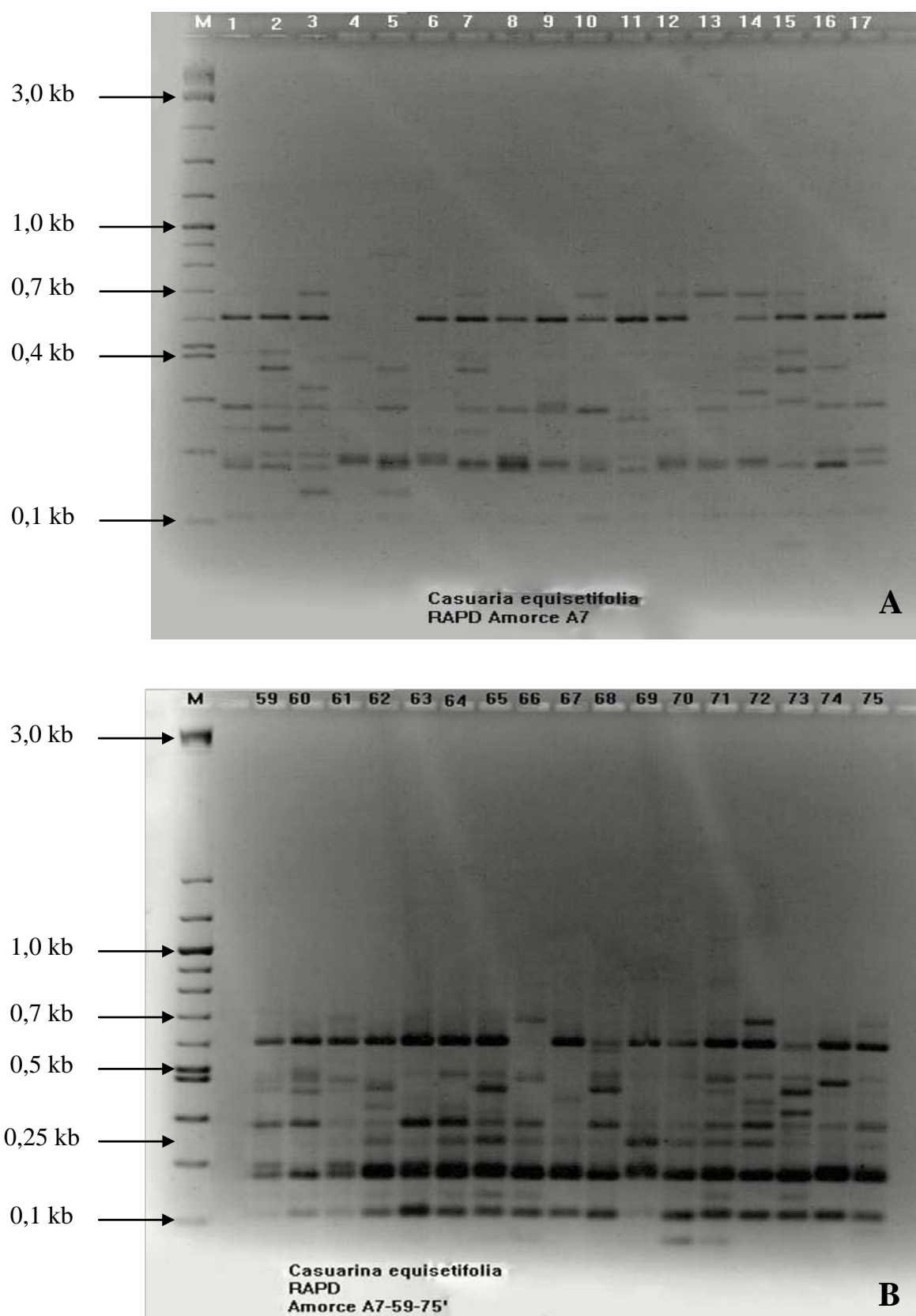


Figure 6 : Profils RAPD obtenus par amplification avec l'amorce A7 de l'ADN de divers échantillons de *C. equisetifolia*.

A : échantillons 1 à 17.

B : échantillons 59 à 75.

M = Marqueur de taille moléculaire

La Figure 7 représente l'amplification avec l'amorce F4, 2 Log ladder (Biolabs, New England) est utilisé comme marqueur de taille moléculaire. Dans le puit C se trouve le témoin négatif contenant tous les produits de la réaction d'amplification sauf l'ADN. Aucune amplification n'a été notée ce qui prouve que nos réactions ont été exemptes d'une contamination par de l'ADN étranger. Du puits 21 à 40, on a l'ADN des échantillons amplifiés en utilisant l'amorce F4, 94 bandes reproductibles ont été obtenues avec cette amorce après amplification de 18 échantillons. La taille des bandes varie entre 1,5 kb et 0,1 kb. La bande de taille moléculaire 0,75 kb discrimine les pieds suivants des divers sites de récoltes : les femelles (21 ; 23 ; 24) et l'hermaphrodite (26) de Potou ; le mâle (1) de Guédiawaye ; le mâle (65), la femelle (67) et les hermaphrodites (71 ; 74) de Malika et l'hermaphrodite (60) de Retba.

La Figure 8 représente l'amplification de l'ADN de 20 échantillons avec l'amorce O15. Les puits M et C représentent respectivement le 2 Log ladder (Biolabs, New England) servant de marqueur de taille moléculaire et le témoin négatif. Un total de 57 bandes reproductibles a été obtenu avec l'amorce O15. La taille des bandes varie entre 0,75 kb et 0,2 kb. Une bande de taille moléculaire 0,75 kb exclusivement présente chez les pieds : hermaphrodites (41 ; 44) de Notto ; mâles (47 ; 48 ; 50), femelles (51 ; 52 ; 54) et hermaphrodites (57 ; 58 ; 60) de Retba ; mâles (61 ; 63), femelle (70) et hermaphrodite (71) de Malika ; mâle (1) et femelle (7) de Guédiawaye ; femelle (25) et hermaphrodites (30) de Potou.

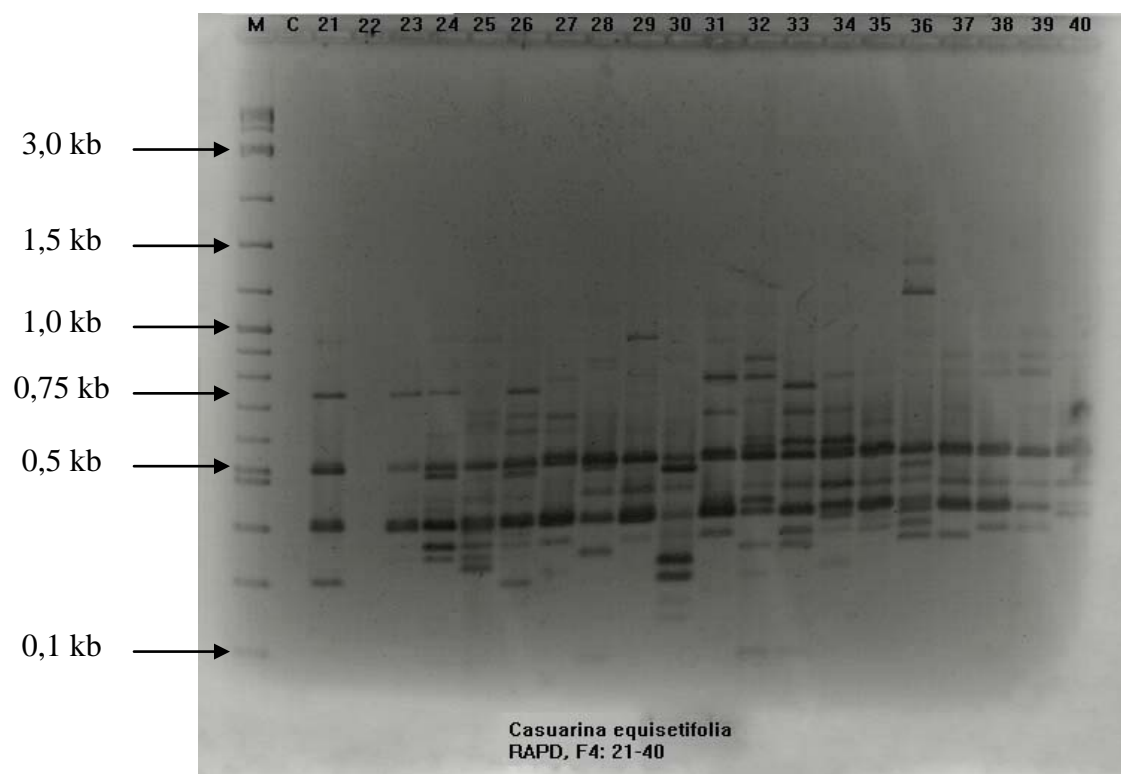


Figure 7 : Profils RAPD obtenus par amplification avec l'amorce F4 de l'ADN des échantillons 21 à 40 de pieds de *C. equisetifolia*.

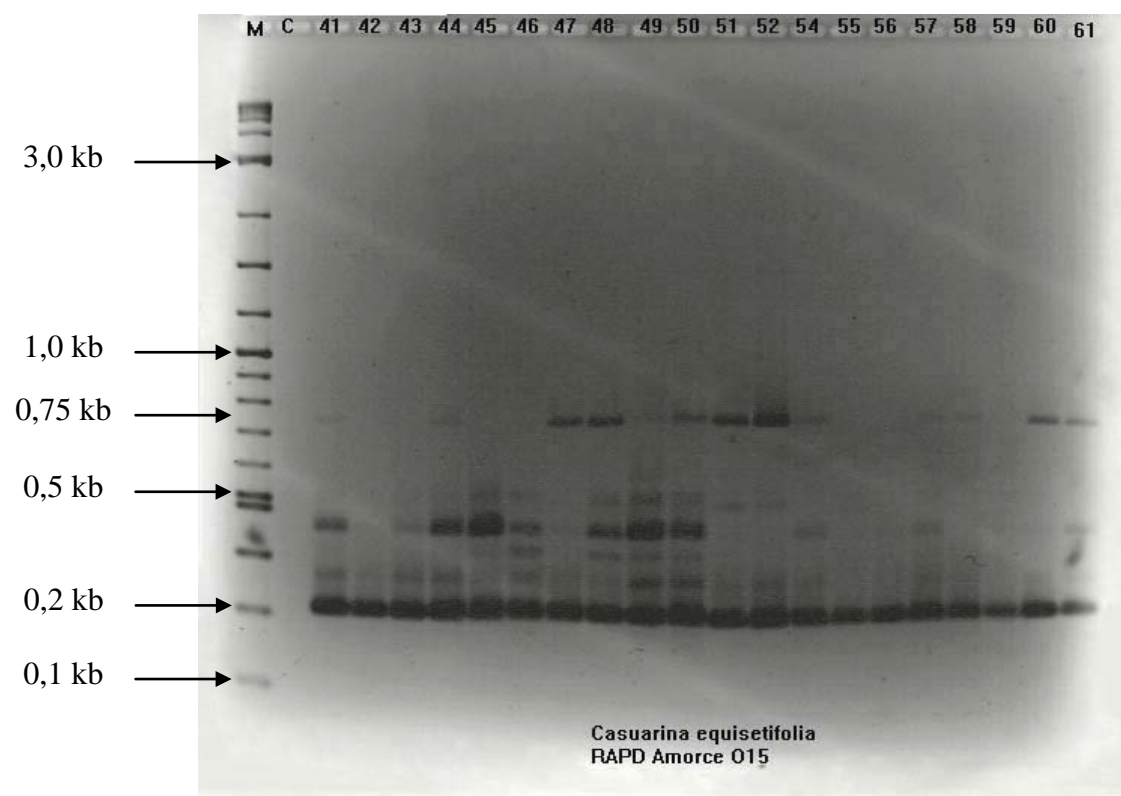


Figure 8 : Profils RAPD obtenus par amplification avec l'amorce O15 de l'ADN des échantillons 41 à 61 de pieds de *C. equisetifolia*.

2. Analyse du degré de similarité entre les échantillons de *C. equisetifolia*

Le dendrogramme a été construit à l'aide de l'algorithme UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic*) basé sur la matrice des distances génétiques de Nei entre les pieds sélectionnés des divers sites de prospection.

Deux groupes principaux ont pu être identifiés avec le dendrogramme représenté sur la Figure 9 :

Le groupe I est composé essentiellement de pieds provenant de Guédiawaye (Gue) et de Potou (Pot) et se subdivise en 2 sous-groupes (A et B). Le groupe B n'est constitué que du pied Gue07 qui s'individualise bien par rapport au sous-groupe A qui se scinde en 2 sous-groupes.

Le groupe II est constitué d'individus provenant pour la plupart des sites de Malika (Mal) Retba (Ret) et Notto (Not). Il se subdivise aussi en 2 sous-groupes (C et D) dont l'un (D) englobe la majorité des individus et présente un pied Pot30 qui s'isole en un seul sous-groupe. On remarque aussi que la majorité des individus de Malika appartiennent à ce sous-groupe D, par contre on retrouve moins d'individus de Guédiawaye.

Les pieds Gued07 (sous-groupe B) et Pot30 (dans sous-groupe D) s'isolent du reste des sous-groupes dans leur groupement respectif marquant ainsi leur différence génétique.

Légende :

- Guédiawaye
- Potou
- Notto
- Retba
- Malika

Echelle :

- = 1 unité

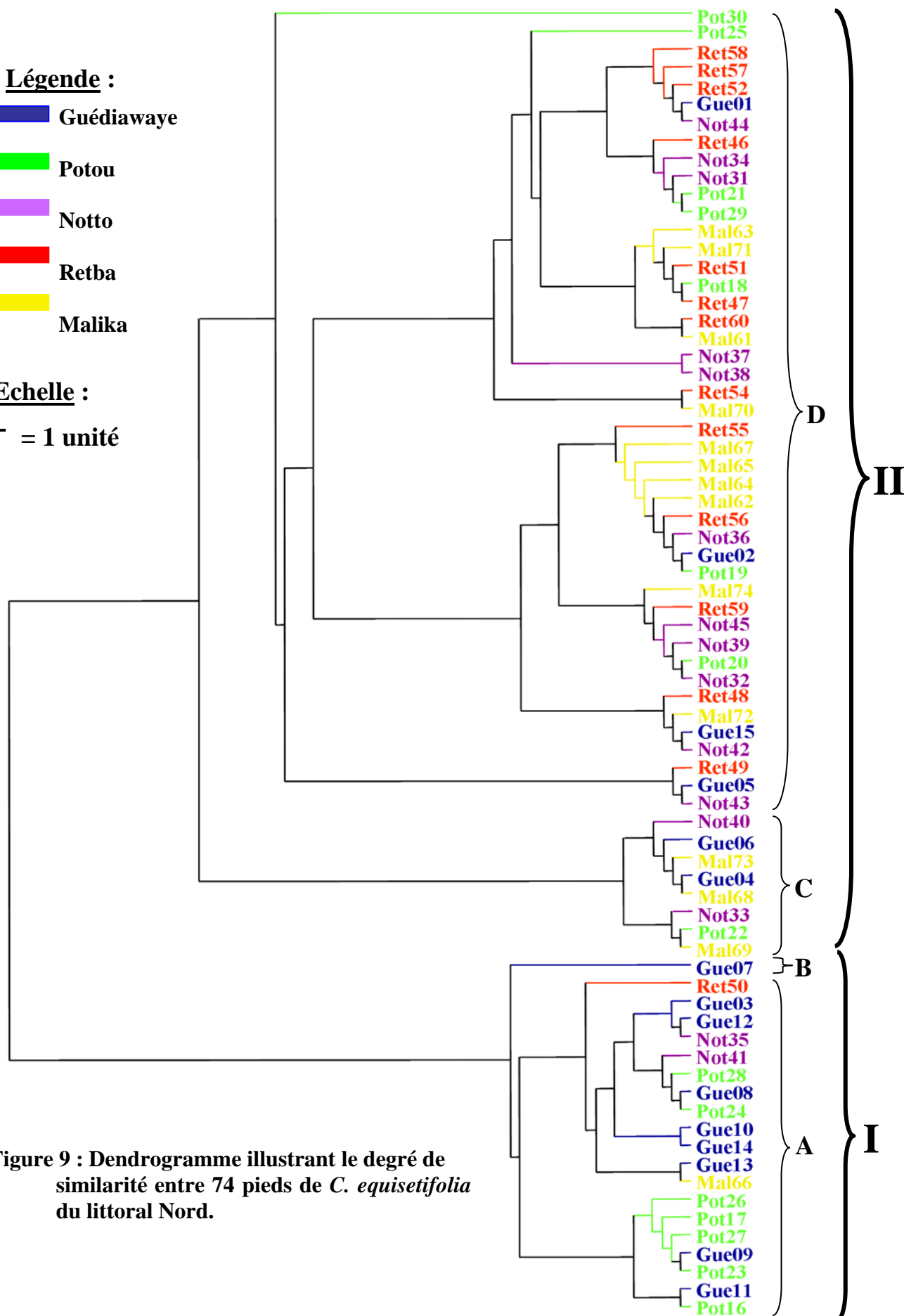


Figure 9 : Dendrogramme illustrant le degré de similarité entre 74 pieds de *C. equisetifolia* du littoral Nord.

DISCUSSION

I. Micropropagation

1. Culture *in vitro* de *Casuarina equisetifolia*

L'originalité de cette manipulation réside dans le fait qu'hormis les IFI, aucun autre type d'explants n'avait été utilisé pour micropropager *in vitro* *C. equisetifolia*. Nous avons alors testé, en même temps que les IFI, la réactivité d'un autre type d'explant, les nœuds axillaires que renferment les rameaux lignifiés et dont les résultats sont rapportés ci-avant.

L'utilisation conjointe du HgCl_2 (1‰) et du PPM qui est un biocide à large spectre et évalué comme une alternative à l'utilisation des antibiotiques et des fongicides conventionnels dans la culture de tissu végétal (George & Tripepi, 2001), s'est révélée nécessaire du fait du haut degré d'infection des explants. Ceci nous a permis d'obtenir des taux de désinfection élevés aussi bien pour les IFI que pour les nœuds axillaires. En effet, l'élimination des bactéries et des champignons du tissu végétal issu d'une serre ou d'un champ peut être extrêmement difficile car les traitements qui sont souvent efficaces dans l'enlèvement des contaminants sont également toxiques au tissu végétal. Les contaminants peuvent être efficacement enlevés de la surface des explants, mais ceux internes (si présent) resteront et vont également s'accroître et ruiner les cultures (Niedz, 2002). Le PPM a été utilisé sur la culture *in vitro* de diverses espèces végétales notamment : *Dendranthema grandiflora* Kitam, *Betula pendula* Roth et *Rhododendron catawbiense* Michx par George & Tripepi (2001) ; melon, pétunia et tabac par Compton & Jenniffer (2001) et *Guadua angustifolia* Kunth par Jimenez *et al.* (2006). La même concentration de HgCl_2 avait été utilisée par Duhoux *et al.* (1986) pour la désinfection d'IFI de *C. equisetifolia* mais pendant un temps plus court (1 min).

Les taux de réactivité des IFI les plus élevés sont obtenus dans les milieux comportant de l'ANA et de la BAP alors que dans le milieu dépourvu d'hormones, ce taux est nul. Ceci montre l'importance des hormones pour stimuler la reprise d'activité des IFI. En effet, Duhoux *et al.* (1986) avaient constatés que l'adjonction de BAP dans un milieu contenant de l'ANA $0,05 \mu\text{mol.L}^{-1}$ favorise considérablement l'initiation des pousses des IFI mises en culture. Néanmoins, les taux de réactivité des IFI que nous avons obtenus, sont plus élevés que ceux de Duhoux *et al.* en 1986.

Ainsi, après 3 semaines de culture, des ébauches de pousses néoformées sont visibles chez les IFI et les nœuds axillaires et sont plus nombreux dans les milieux enrichis en hormones. La néoformation de pousses se fait pour les IFI au niveau de leur partie boursouflée et pour les nœuds axillaires au niveau des nœuds (Planche 5). L'action favorable

des régulateurs de croissance constatée sur la néoformation de pousses de *C. equisetifolia* est aussi mentionnée par Giang & Hong (1997) sur le papayer avec un meilleur taux de prolifération de pousses dans un milieu MS enrichi en BAP $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ + ANA à $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$. Mroginski *et al.* (1981) avaient observé sur un milieu MS contenant de l'ANA à $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ et de la BAP à 1 mg.L^{-1} , un développement des bourgeons d'*Arachis hypogaea* en tiges. Des résultats similaires ont été également obtenus par Casado *et al.* (2002) sur *Santolina canescens*, Fraternali *et al.* (2000) sur *Bupleurum fruticosum* et par Ndoye *et al.* (2003) sur *Balanites aegyptiaca*.

Cinq semaines après repiquage des IFI dans des milieux MS contenant des hormones, les pousses néoformées sont bien vertes, vigoureuses et longues de quelques centimètres. Cependant, en l'absence de charbon actif dans le milieu de culture MS aucune croissance de l'IFI ni l'allongement des pousses néoformées n'a été observé ; l'élongation des pousses nouvellement formées s'est produite seulement quand le charbon actif a été ajouté au milieu nutritif MS.

L'effet bénéfique d'une adjonction de charbon actif dans le milieu de culture n'est pas encore clarifié et plusieurs hypothèses pour l'expliquer ont été proposées (Bonga & Durzan, 1982 ; Mission *et al.*, 1983) ; par exemple, le charbon actif aurait un effet adsorbant sur les polyphénols produits par l'explant et qui constituent un frein à son développement.

A la différence des IFI, les nœuds axillaires issus de rameaux chlorophylliens et mis en culture dans le milieu MS (M0 dépourvu d'hormones) ont réagi en donnant des pousses nouvellement formées (16,66% de réactivité). Comme l'avait constaté Margara en 1984 ; le milieu de Murashige & Skoog (1962) s'est révélé essentiellement efficace pour le déclenchement de l'organogenèse chez les espèces ligneuses, en particulier pour la néoformation de pousses, ainsi son utilisation est très fréquente. L'effet de ce milieu de culture, proviendrait des interactions des différents éléments chimiques qui le composent. Ils stimuleraient favorablement des processus morphogénétiques, à savoir le débourrement ou la néoformation des bourgeons. En particulier, l'azote sous forme de nitrate ou d'ammonium serait bénéfique dans le contrôle de la biosynthèse des hormones endogènes responsables de l'organogenèse. D'ailleurs, l'enracinement des nœuds axillaires dans le milieu MS(0) confirme la présence d'hormones endogènes et reflète des teneurs auxiniques endogènes élevées.

Fort du constat de réactivité des nœuds axillaires dans le milieu MS(0) nous avons voulu tester le développement de ce type d'explants en culture *in vitro* en fonction de la

différence génétique des pieds dont ces derniers sont issus. Cette différence manifeste si l'on considère les critères morphologiques a été confirmée par les tests moléculaires.

Il ressort du test de culture *in vitro* réalisé que le pouvoir morphogénétique des nœuds axillaires est fortement tributaire du pédigré des pieds de *C. equisetifolia* où ils ont été prélevé. C'est ce qui fait que pour les nœuds axillaires issus du pied 9 (p9), on a un taux de réactivité nul lorsque toutes les conditions de culture étaient réunie et pour les nœuds axillaires issus du pied 8 (p8), le taux de réactivité est satisfaisant avec 90%. La meilleure élongation de pousses néoformées, significativement différente des autres, a été obtenue avec le pied 3 (p3).

L'importante variation constatée sur les capacités morphogénétiques des divers échantillons de nœuds axillaires lorsqu'ils sont soumis aux mêmes conditions de culture (c'est-à-dire milieu MS dépourvu d'hormones) ne peut être dû qu'à des propriétés intrinsèques propres aux divers échantillons et notamment liées à leur différence génétique.

Les meilleurs milieux pour la multiplication végétative *in vitro* des nœuds axillaires semblent être les milieux M4 (MS + BAP 2 mg.L⁻¹) pour la réactivité et M10 (MS + BAP 2,5 mg.L⁻¹ + ANA 9,31.10⁻³ mg.L⁻¹) pour le taux de multiplication. En revanche, pour la multiplication des IFI, le meilleur coefficient de réactivité est obtenu dans le milieu M9 (MS + BAP 2,0 mg.L⁻¹ + ANA 9,31.10⁻³ mg.L⁻¹), qui, supplémenté par la suite avec du charbon actif à 20 g.L⁻¹ donnent le meilleur taux de multiplication.

Il ressort de ces résultats que la BAP, aidée de l'effet adsorbant qu'a le charbon actif sur les polyphénols, semble être efficace pour la régénération et le développement des pousses néoformés. La BAP permettrait d'améliorer la réactivité des explants mis en culture *in vitro*. En particulier, les fortes concentrations de BAP seraient favorables au développement et à l'élongation des tigelles issues de nœuds axillaires (Sabapathy & Nair, 1992). Le même constat a été fait par Seck (1996) sur *Prosopis chilensis* et *Prosopis juliflora*, par Dione (2001) sur *Detarium microcarpum*, par Ndoeye *et al.* (2003) sur *Balanites aegyptiaca* et Sambe (2005) sur *Parkia biglobosa*.

La BAP seule semble plus efficiente pour stimuler la réactivité des nœuds axillaires et le développement des pousses néoformées (milieu M5). Mais l'utilisation conjointe de la BAP et de L'ANA a permis d'obtenir les meilleurs taux de multiplication. Cette action favorable de la combinaison cytokinine/auxine sur la morphogenèse traduit une action synergétique renforcé et est mentionnée par Casado *et al.* (2002) sur *Santolina canescens*, Fraternal *et al.* (2002) sur *Bupleurum fruticosum* et Ndoeye *et al.* (2003) sur *Balanites aegyptiaca*.

2. Enracinement

L'étape de l'enracinement des vitroplants constitue une phase décisive qui conditionne la réussite de l'acclimatation des plants et finalement leur transfert au champ.

Les essais d'enracinement appliqués au cours de nos expériences ont révélé qu'une induction rhizogène en présence d'auxine est indispensable pour favoriser la formation des racines à partir des vitroplants issus d'IFI de *C. equisetifolia* car aucune racine ne s'est formée dans le milieu témoin MS(0). Durant cette phase, l'utilisation de l'ANA à la dose de 5 g.L⁻¹ en induction rhizogène courte de 48 heures, s'est révélée efficace pour stimuler la croissance et le développement des racines pendant la phase d'expression de l'enracinement. Cet effet favorable de l'ANA sur l'enracinement de vitroplants a également été observé par Badji *et al.*, 1991 sur *Acacia senegal* ; Basbaa *et al.*, 1993 sur *Gleditsia triacanthos* et Laberche *et al.*, 1995 sur *Lotus alpinus*.

En effet l'ANA à 5 g.L⁻¹ a permis d'obtenir après 4 semaines de culture un taux d'enracinement de 18,18% ; avec en moyenne 1 racine principale qui est très allongée (7,16 cm), elle est parfois accompagnée de 2 à 3 racines secondaires.

Ce faible taux d'enracinement des vitroplants pourrait constituer une étape limitante pour la production en masse de plants de *C. equisetifolia*. Ceci peut s'expliquer, selon Chèvre (1985), par le fait que l'enracinement est souvent plus difficile chez les ligneux que chez les plantes herbacées.

En revanche, des racines ont été observées chez les nœuds axillaires mis en culture dans un milieu MS dépourvu d'hormone ; cela pourrait confirmer l'existence d'auxine endogène synthétisée au niveau de l'apex. Il se pourrait, comme l'avait souligné Ndoye (2004), que le milieu étant appauvri en cytokinines, la quantité d'auxines synthétisée par la jeune pousse modifie le rapport auxine / cytokinine en faveur de l'enracinement.

2. Acclimatation

Les résultats obtenus ont montré que le substrat constitué de sable de dune additionné de terreau est le meilleur support pour le développement de *C. equisetifolia*. Ce type de sol est caractéristique de la zone dunaire des Niayes, qui est la zone d'expansion de cette espèce sur le littoral Nord sénégalais.

L'objectif visé avec la fermeture complète de la mini-serre durant les 15 premiers jours de l'acclimatation était de maintenir une atmosphère ambiante saturée en humidité qui nous a permis d'obtenir des plants dont la partie aérienne est bien vigoureuse avec un taux de survie de 43,75%.

Tenant compte du fait qu'un confinement excessif accompagné d'une température élevée dans une atmosphère saturée d'eau pourrait asphyxier les microplants et pourrait être propice au développement de micro-organismes pathogènes, nous avons dû procéder à une ouverture progressive de la mini-serre à 2 ou 3 heures par jour pour éviter de perdre des microplants.

Ceci les a exposé à la dessiccation avec la baisse de l'humidité relative. En effet, d'après Mapes *et al.* (1981), cités par Ndoye (2004), les plantes issues de culture *in vitro* possèdent en général une cuticule plus fine que celle des plantes mères, ce qui provoque leur dessiccation rapide lorsque l'humidité relative est abaissée. Ainsi, au 30^{ième} jour d'acclimatation la combinaison de tous ces facteurs fait chuter le taux de survie de 43,75% à 25%.

Cette fragilité des vitroplants constitue la principale difficulté au cours de la phase de transplantation. Ainsi, 43% des plantes de *Prosopis juliflora* et *Prosopis chilensis* sont nécrosées pendant cette étape d'acclimatation (Seck, 1996).

II. Caractérisation moléculaire

A notre connaissance, c'est la première fois qu'une étude portant sur l'analyse de la diversité génétique au niveau moléculaire des populations de filaos plantés sur le littoral Nord sénégalais est réalisée. Nos résultats montrent une diversité génétique des pieds de filaos aussi bien à l'intérieur d'un site qu'entre différents sites (taux de polymorphisme 4,36 %).

La variabilité génétique notée dans notre étude, entre pieds de filao d'un même site ou entre différents sites est similaire à celui obtenue par Ho *et al.*, (2002a). Cela pourrait s'expliquer par le fait que les filaos plantés dans le littoral Nord du Sénégal appartiennent à des variétés différentes. En effet, il existe au moins deux variétés de *Casuarina equisetifolia* : *Casuarina equisetifolia* var *incana* et *Casuarina equisetifolia* var *equisetifolia*. La variété *incana* qui est distribuée en Australie de Darwin à la côte du nord de la Nouvelle Galle du Sud et la variété *equisetifolia* plus largement distribuée s'étendant de la Malaisie à l'Australie subtropicale en recouvrant géographiquement la Mélanésie, la Micronésie, les Philippines, et la Polynésie (Wilson & Johnson, 1989). En revanche, cette variabilité est plus élevée lorsque la technique ISSR est utilisée ou chez les hybrides de *Casuarina* issus d'espèces différentes (Ho *et al.*, 2002b ; Yasodha *et al.*, 2004). Des résultats similaires ont été également décrits.

Les résultats de l'étude génétique basés sur les données RAPD nous ont permis de construire un dendrogramme (Figure 9) dont l'analyse indique un regroupement des pieds de Potou et Guédiawaye entre eux dans le groupe I / sous-groupe A et ceux de Malika, Retba et Notto entre eux dans le groupe II / sous-groupe C et D avec les pieds Gued07 (sous-groupe

B) et Pot30 (dans sous-groupe D) qui s'isolent dans leur groupe respectif. Cela s'explique par leur différence génétique avec le reste des individus des sous-groupes A et D.

Ainsi, les individus Gued07 et Pot30, considérés lors des prospections sur le terrain comme appartenant à la variété *equisetifolia*, pourraient plutôt appartenir à la variété *incana*.

Dans les autres sous groupes A, C et D (exception fait du pied Pot30) contenant la majorité des individus et qui semblent probablement appartenir à la variété *equisetifolia*, quelques associations en fonction des localités ont été observées notamment avec les individus de Potou et Guédiawaye.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

Casuarina equisetifolia est une ressource phytogénétique importante pour le littoral nord sénégalais car il sert à fixer les dunes de sable qui ensevelissent les cuvettes maraîchères des Niayes. La pression anthropique exercée sur cette espèce végétale et son défaut de régénération naturelle constituent des contraintes majeures qui ont conduit actuellement à un dépérissement des populations de l'espèce dans ce milieu.

Les travaux réalisés avaient pour objectif principal :

- d'étudier les conditions optimales de régénération *in vitro* de pieds élités de *C. equisetifolia* permettant une production massale de plants en vue de leur introduction ultérieure dans les aires de plantation du littoral nord.
- d'évaluer la diversité génétique par la technique RAPD des populations de *C. equisetifolia* pour renforcer les connaissances sur la génétique de ces populations adaptées à l'écosystème sahélien.

Au terme de cette étude, nos résultats ont montré que :

Micropropagation

- L'utilisation conjointe du HgCl_2 et du PPM a permis d'obtenir des taux de désinfection élevés aussi bien pour les Inflorescences femelles immatures (IFI) que pour les rameaux lignifiés comportant des nœuds axillaires.
- Le milieu de Murashige et Skoog (1962) est efficient pour la régénération *in vitro* d'explants de *C. equisetifolia*.
- La reprise d'activité des IFI nécessite la présence concomitante dans le milieu de culture d'une cytokinine (BAP) et d'une auxine (ANA) contrairement aux nœuds axillaires qui réagissent spontanément dans le milieu de culture MS dépourvu d'hormones.
- La capacité morphogénétique des nœuds axillaires de *C. equisetifolia* est tributaire du pédigré des individus dont ils sont issus, car plusieurs échantillons différents soumis aux mêmes conditions de culture présentent des taux de réactivité et de croissance très variables.
- Le meilleur milieu pour la réactivité et la croissance des IFI est le milieu M9 (MS + BAP $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ + ANA $9,31.10^{-3} \text{ mg.L}^{-1}$). En revanche, pour les nœuds axillaires, le meilleur milieu pour la réactivité est le milieu M4 (MS + BAP 2 mg.L^{-1}) et pour la multiplication le milieu M10 (MS + BAP $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ + ANA $9,31.10^{-3} \text{ mg.L}^{-1}$).
- Les essais d'enracinement des microplants issus d'IFI ont révélé la nécessité d'appliquer une induction rhizogène courte de 48 h en présence d'auxine (ANA à 5 g.L^{-1}) pour favoriser l'émergence des primordia racinaires et leur développement en un système racinaire fonctionnel. Ceci n'est pas le cas pour les rameaux chlorophylliens mis en culture

dans le milieu MS(0) : ils s'enracinent naturellement ce qui démontre l'existence de teneurs auxiniques endogènes élevées.

- L'acclimatation en mini-serre fermée avec contact progressif des microplants avec le milieu ambiant a permis d'obtenir un taux de survie appréciable de 25%. Le meilleur substrat d'acclimatation s'est révélé être un substrat sableux mélangé avec du terreau qui nous a permis d'enregistrer au début un taux de survie d'environ 44% qui diminue par la suite du fait de l'intervention des facteurs contraignants de l'acclimatation.

Caractérisation moléculaire

L'analyse des profils RAPD a permis de révéler la diversité génétique des populations de *C. equisetifolia* implantées sur la zone côtière nord du Sénégal. Cette diversité se manifeste par le regroupement des individus (pieds) suivant leur degré de similitude et indépendamment de la localité. Dans le groupe I : les pieds du sous-groupe A constituent des individus proches tandis que l'individu Gue07 en est très éloigné. Pour le groupe II, seul le pied Pot30 s'individualise des autres individus du sous-groupe D.

A l'issue de nos travaux, des perspectives intéressantes peuvent être dégagées, en tenant compte de l'importance socio-économique et écologique de l'espèce pour la zone des Niayes. Elles portent sur :

- ✓ L'amélioration du taux de multiplication des explants et leur enracinement par l'utilisation d'autres combinaisons hormonales ; ce qui pourrait améliorer le taux de survie à la sortie de la phase d'acclimatation.
- ✓ L'utilisation d'autres types d'explants de l'arbre adulte susceptible de conserver la juvénilité qui fait défaut aux espèces ligneuses comme *C. equisetifolia*.
- ✓ La multiplication de variétés de *C. equisetifolia* sélectionnées pour leur performance de productivité et leur capacité à établir une symbiose actinorhizienne fixatrice azote avec *Frankia*.
- ✓ L'établissement d'un test de conformité génétique entre clones issus de la micropropagation et les sujets élites.
- ✓ Le repeuplement de la zone côtière Nord par des individus élites issus de la morphogenèse *in vitro*.
- ✓ L'élargissement des études moléculaires à d'autres provenances afin de déterminer leur degré de similarité, l'origine des populations de filaos plantés au Sénégal et établir d'éventuelles hybridations entre variétés, espèces ou genre.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Ajibade S.R., Weeden N.F. & Chite S.M.** (2000). Inter simple sequence repeat analysis of genetic relationships in the genus *Vigna*. *Euphytica*, 111: 47-55.
- Allioux B.** (1990). Mémoire ENSH, Paris, 64 p.
- Alloli T.B., Nalawadi U.G. & Patil C.C.** (1991). Les casuarinas améliorent la production fruitière dans une région aride de l'Inde. *Agroforesterie*, 3 (4) : 12.
- Ayad W.G., Hodgkin T., Jaradat A. & Rao V.R.** (1997). Molecular Genetic Techniques for Plant Genetic Resources (report of an IPGRI workshop, 9-11 October 1995, Rome, Italy). *International Plant Genetic Resources Institute, Rome*.
- Badji S., Merlin G., Ndiaye I., Mairone Y., Doire P., Palma B., Colonna P.J., Geslot A. & Neville P.** (1991). Multiplication végétative *in vitro* d'*Acacia sénégale* (L.) Willd., In: *Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi-arides*. Libbey J. Eurotext (ed.), Groupe d'Etude de l'Arbre. Paris, France : 303-308.
- Bajaj Y.P.S.** (1989). Biotechnology in agriculture and forestry 1 and 5, Trees I and II. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Baker D.D. & Mullin B.C.** (1992). Actinorhizal symbioses. In: Biological nitrogen fixation. Stacey G.S., Burris R.H. and Evans H.J. (eds.), Chapman and Hall, New York, 259-291.
- Baker D.D. & Schwintzer C.R.** (1990). Introduction. The biology of *Frankia* and actinorhizal plants. In: Schwintzer C.R. and Tjepkema J.D. (eds.), New York, *Academic Press Inc.*, 1-33.
- Barlow B.A.** (1959). Chromosome numbers in *Casuarinaceae*. *Aust. J. Bot.*, 7: 230-237.
- Barlow B.A.** (1983). The *casuarinas* - A taxonomic and biogeographic review, in *Casuarina Ecology, Management and Utilization*, edited by Midgley S.J., Turnbull J. & Johnston R.D.; CSIRO, Australia. pp. 10-18.
- Barros E., Verryn S. & Hettasch M.** (2002). Identification of PCR-based markers linked to wood splitting in *Eucalyptus grandis*. *Ann. For. Sci.*, 59: 675-678.
- Basbaa A.K., Geslot A. & Neville P.** (1993). Multiplication végétative *in vitro* de *Gleditsia triacanthos* L., I.- Microbouturage d'explants primaires issus de jeunes plants, *Rev. Cytol. Biol. Végét. -Bot.*, 16 : 147-161.
- Bayliss M.W.** (1973). Origin of chromosome number variation in cultured plant cells. *Nature*, 246: 529-30.
- Beismann H., Barker H.A., Karp A. & Speck T.** (1997). AFLP analysis sheds light on distribution of two salix species and their hybrid along a natural gradient. *Mol. Ecol.*, 6: 989-993.

- Besse P., Seguin M., Lebrun P., Chevallier M.H., Nicolas D. & Lanaud C.** (1994). Genetic diversity among wild and cultivated populations of *Hevea brasiliensis* assessed by nuclear RFLP analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 88: 199-207.
- Bizoux J.-P.** (2002). Etude génétique de peuplements belges de *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. et de *Quercus robur* L. à l'aide de marqueurs moléculaires du type RAPD. *Gembloux : FUSAGx*, 78 p.
- Bonga J.M. & Durzan D.J.** (1982). *Tissue culture in forestry*. ed. Martinus Nijhoff, Dordrecht, 387 p.
- Botstein D., White R.L., Skolnick M. & Davis R.W.** (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am. J. Human Genet.*, 32: 314-331.
- Bretting P.K. & Widrlechner M.P.** (1995). Genetic markers and plant genetic resources. *Plant Breeding Reviews*, 13: 11-86.
- Brown S.M. & Kresovich S.** (1996). Molecular characterization for plant genetic resources conservation, In: *Paterson H (ed.), Genome Mapping of Plants. Academic Press, San Diego.* pp. 85-93.
- Budowski G. & Russo R.O.** (1993). Live fence posts in Costa Rica: a compilation of the farmer's beliefs and technologies. *J. Sustainable Agric.*, 3: 65-87.
- Cao Y.H., Phelep M. & Duhoux E.** (1990). Effects of some organic compounds (maltose, sucrose, vitamins) on the shoot biomass of *Allocasuarina verticillata* (Casuarinaceae) grown *in vitro*. *Bull. Soc. Bot. Fr. Actual. Bot.*, 137 (3/4): 7-13.
- Casado J.P., Navarro M.C., Utrilla M.P., Martinez A. & Jimenez J.** (2002). Micropropagation of *Santolina canescens* Lagasca and *in vitro* volatiles production by shoot explants. *Plant Cell Tissue Organ. Cult.*, 69: 147-153.
- Cervera M.T., Cabezas J.A., Sancha J.C., Martinez de Toda F. & Martinez-Zapater J.M.** (1998). Application of AFLPs to the characterization of grapevine *Vitis vinifera* L. genetic resources. A case study with accessions from Rioja (Spain). *Theoretical and Applied Genetics*, 97: 51-59.
- Chalmers K.J., Newton A.C., Waugh R., Wilson J. & Powell W.** (1994). Evaluation of the extent of genetic variation in mahoganies (*Meliaceae*) using RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 89: 504-508.
- Chevallier M.H.** (1998). Les marqueurs moléculaires In. Ouédraogo A.S. et Boffa J.M. (Eds). Actes du premier atelier régional de formation sur la conservation et l'utilisation durable des ressources génétiques forestières en Afrique de l'ouest, Afrique centrale et Madagascar – 19-27 mars – Centre National de Semences Forestières, Ouagadougou, Burkina Faso, 130-137.
- Chevre A.M.** (1985). Recherche sur la multiplication végétative *in vitro* sur le châtaigner. Thèse de Doctorat de l'Université de Bordeaux II, mention Science et Vie, 100 p.

Clegg M.T., Cummings M.P. & Durbin M.L. (1997). The evolution of plant nuclear genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94: 7791- 7798.

Compton M.E. & Jenniffer M.K. (2001). Influence of Plant Preservative Mixture (PPM) on adventitious organogenesis in melon, petunia and tobacco. *In Vitro Cell Dev. Biol.- Plant*, 37: 259-261.

CSE (Centre de Suivi Ecologique) (2002). Rapport d'exécution du Centre de Suivi Ecologique pour le PAEP, Etat du Sénégal, Dakar, 57 p.

CSE & CERPOD (1996). Etudes des interrelations Population - Environnement - Développement au Sénégal. MEFP., DPRH, projet SEN 94 - P02 / FNUAP, 109 p.

Cunningham S.D. & Ow D.W. (1996). Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiol.*, 110: 715-719.

Danière C., Capellano A. & Moiroud A. (1986). Dynamique de l'azote dans un peuplement naturel d'*Alnus incana* (L.) Moench. *Oecol. Plant.*, 7: 165-175.

De Vienne D. (1998). Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies. Coédition INRA-CNED. p. 35-37.

Diem H.G. & Dommergues Y.R. (1990). Current and potential uses and management of *Casuarinaceae* in the tropics and subtropics. In: The Biology of *Frankia* and Actinorhizal Plants. Schwintzer C.R. and Tjepkema J.D. (eds.). San Diego, California, *Academic Press*, 15: 316-342.

Dione F.G.B. (2001). Etude des facteurs de la germination et de la multiplication végétative chez *Detarium senegalense* Gmel. et *Detarium microcarpum* Guill et Perr., Mémoire DEA, Biologie végétale, Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal, 63 p.

Domenach A.M., Moiroud A. & Jocteur-Monrozier L. (1994). Leaf carbon and nitrogen constituents of some actinorhizal trees species. *Soil Biol. Biochem.*, 26: 649-654.

Dommergues Y.R. (1996). La fixation d'azote chez les plantes actinorhiziennes et ses applications. *Act. Bot. Gallica*, 143 (7) : 663-679.

Dommergues Y.R., Duhoux E. & Diem H.G. (1999). Les arbres fixateurs d'azote : Caractéristiques fondamentales et rôle dans l'aménagement des écosystèmes méditerranéens et tropicaux ; avec référence particulière aux zones subhumides et arides. Ganry F. collection, CIRAD/EDITIONS ESPACES 34/FAO/IRD (eds.), Impressions Dumas, St. Etienne, France, 499 p.

Duhoux E. (1995). Applications des biotechnologies végétales aux arbres tropicaux fixateurs d'azote, *Rev. Cytol. Biol. Végét.- Bot.*, 18 : 75-79.

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.

- Durand-Cresswell R., Boulay M. & Franclet A.** (1982) Vegetative propagation of *Eucalyptus*. In: Bonga J.M., Durzan D.J. (eds). Tissue culture in forestry. Martinus Nijhoff, Dordrecht, pp 150-181.
- Dutcher R.D. & Powell L.E.** (1972). Culture of apple shoots from buds *in vitro*. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 97: 511-4.
- El-Lakany M.H. & Shepherd K.R.** (1984). Preliminary observations on stump propagation in *Casuarina cunninghamiana* and *C. glauca*. *Aust. For. Res.*, 14: 243-247.
- Fraternal D., Giamperi L., Ricci D. & Rocchi M.B.L.** (2002). Micropropagation of *Bupleurum fruticosum*: the effect of triacontanol. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 69: 135-140.
- Fulton T.M., Chungwognse J. & Tanksley S.D.** (1995). Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and herbaceous plants. *Plant Mol. Biol.*, 13: 207-209.
- Gautheret R.J.** (1940a). Recherches sur le bourgeonnement du tissu cambial d'*Ulmus campestris* cultivé *in vitro*. *CR Acad. Sci. Paris*, 210 : 632-634.
- Gautheret R.J.** (1940b). Nouvelles recherches sur le bourgeonnement du tissu cambial d'*Ulmus campestris* cultivé *in vitro*. *CR Acad. Sci. Paris*, 210 : 744-746.
- Gauthier D., Diem H.G. & Dommergues Y.R.** (1985). Assessment of N₂ fixation by *Casuarina equisetifolia* inoculated with *Frankia* ORS21001 using ¹⁵N methods. *Soil Biology and Biochemistry*, 17: 375-9.
- Ge X.J. & Sun M.** (1999). Reproductive biology and genetic diversity of a cryptoviviparous mangrove *Aegiceras corniculatum* (Myrtinaceae) using allozyme and inter simple sequence repeat (ISSR) analysis. *Mol. Ecol.*, 8: 2061-2069.
- George E.F. & Sherrington P.D.** (1984). Plant propagation by tissue culture. England: *Exegetics Ltd.*
- George M.W. & Tripepi R.R.** (2001). Plant Preservative Mixture can affect shoot regeneration from leaf explants of chrysanthemum, European birch, and rhododendron. ed., American Society for Horticultural Science, Alexandria, VA, Etats-Unis; HortScience ISSN 0018-5345 CODEN HJHSAR, 36: 639-644
- Giang D.T. & Hong L.T.A.** (1997). Multiplication *in vitro* du papayer au Vietnam, *Cahiers agricultures, Agriculture et développement*, AUPELF – UREF / CIRAD, 15 : 209-12.
- Gilbert J.E., Lewis R.V., Wilkinson M.J. & Caligari P.D.S.** (1999). Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections. *Theor. Appl. Genet.*, 98: 1125-1131.
- Gouyon P.H., Henry J.P. & Arnould J.** (1997). Les Avatars du Gène : la théorie Néodarwinnienne de l'évolution. *Coll. Regards / Sciences. ed. Bellin.*, 335 p.

- Gupta P.K. & Mascarhenas A.F.** (1987). Cell and tissue culture in Forestry. *In*: Bonga J.M., Durzan D.J., eds. Dordrecht, The Netherlands Martinus Nijhoff: 385-99.
- Haberlandt G.** (1902). Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Sber. Akad. Wiss. Wien*, 111: 69-92.
- Hadrys H., Schierwater B., Dellaporta S.L., Desalle R. & Buss L.W.** (1992). Determination of paternity in dragonflies by Random Amplified Polymorphic DNA fingerprinting. *Molecular Ecology*, 2: 79-87.
- Ho K.Y., Yang J.C. & Hsiao J.Y.** (2002a). An assessment of genetic diversity and documentation of hybridization of *Casuarina* grown in Taiwan using RAPD markers. *Int. J. plant Sci.*, 163: 831-836.
- Ho K.Y., Ou C.H., Yang J.C. & Hsiao J.Y.** (2002b). An assessment of DNA polymorphism and genetic relationships of *Casuarina equisetifolia* using RAPD markers. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 43: 93-98.
- Hu C.Y. & Wang P.J.** (1983). Handbook of plant cell culture, vol 1. *In*: Evans D., Sharp W.R., Ammirato P.V., Yamada Y., eds. New York: Mac Millan Publishing Company.
- Huang J.C. & Sun M.** (2000). Genetic diversity and relationships of sweet potato and its wild relatives in *Ipomoea* series Batatas (*Convolvulaceae*) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA. *Theor. Appl. Gen.*, 100: 1050-1060.
- Husain A.M.M. & Ponnuswamy P.K.** (1980). Propagation of *Casuarina junghuhniana* by planting shoots and root suckers. *Indian Forester*, 106: 298-299.
- Isabel N., Tremblay L., Michaud M., Tremblay F.M. & Bousquet J.** (1993). RAPDs as an aid to evaluate the genetic integrity of somatic embryogenesis-derived populations of *Picea mariana* (Mill.) B.S.P. *Theoretical and Applied Genetics*, 86: 81-87.
- Jimenez V.M., Castillo J., Tavares E., Guevara E. & Montiel M.** (2006). *In vitro* propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 86: 389-395.
- Johnson L.A.S.** (1988). Notes on *Casuarinaceae*. III: The new genus *Ceuthostoma*. *Telopea*, 3: 133-137.
- Jones O.P.** (1967). Effect of benzyl adenine on isolated apple shoots, *Nature*, 215: 1514.
- Jones O.P. & Hatfield S.G.S.** (1976). Root initiation in apple shoots cultured *in vitro* with auxins and phenolic compounds. *J. Hort. Sci.*, 51: 495-9.
- Kameswara-Rao N.** (2004). Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology, *African Journal of Biotechnology*, 3 (2): 136-145.

- Kidwell M.G. & Lisch D.** (1997). Transposable elements as sources of variation in animals and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94: 7704-7711.
- Laberche J.C., Boitel-Conti M., Gontier E. & Sangwan-Norreel B.S.** (1995). Micropropagation *in vitro* du *Lotus alpinus* (DC.) Schleicher par microbouturage d'entre-nœuds, *Rev. Cytol. Biol. végét.-Bot.*, 18 : 65-74.
- Lundquist R. & Torrey J.G.** (1984). The propagation of *Casuarina* species from rooted stem cuttings. *Botanical Gazette*, 145: 378-384.
- Maggia L.** (1991). Diversité génétique de *Frankia* symbiote de *Casuarina equisetifolia* (L.) Forst. Johnson en Afrique de l'Ouest (Sénégal et Gambie). Thèse de l'Université de Paris VII, 153 p.
- Maggia L. & Bousquet J.** (1994). Molecular phylogeny of the actinorhizal *Hamamelidae* and relationships with host promiscuity towards *Frankia*. *Mol. Ecol.*, 3: 459-467.
- Mahlderg P.G., Turner F.R., Walkinshaw C., Venketeswaran S. & Mehrotra B.** (1975). Observations of incomplete cytokinesis in callus culture. *Bot. Gas.* (Chicago), 136: 18-995.
- Maily D. & Margolis H.K.** (1992). Forest floor and mineral soil development in *Casuarina equisetifolia* plantations on the coastal sand dunes of Senegal. *Forest Ecol. Manage.*, 55: 259-278.
- Margara J.** (1984). Bases de la multiplication végétative. Les méristèmes et l'organogenèse, INRA-Versailles, 262 p.
- Martin J.P. & Sanchez-Yelamo M.D.** (2000). Genetic relationships among species of the genus *Diplotaxis* (*Brassicaceae*) using inter-simple sequence repeat markers. *Theor. Appl. Genet.*, 101: 1234-1241.
- Mission J.P., Boxus P.H., Coumans M., Giot-Wirgot P. & Gaspar T.H.** (1983). Med Fac Landbouwn Rijksuniv Gent, 48/4: 1151-1157.
- Moiroud A.** (1996). Diversité et écologie des plantes actinorhiziennes. *Act. Bot. Gallica*, 143 (7) : 651-661.
- Mroginski L.A., Kartha K.K. & Shyluk J.P.** (1981). Regeneration of Peanut (*Arachis hypogaea*) plantlets by *in vitro* culture of immature leaves. *Can. J. Bot.*, 5: 826-830.
- Muluvi G.M., Sprent J.I., Soranzo N., Provan J., Odee D., Folkard G., McNicol J.W. & Powell W.** (1999). Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of genetic variation in *Moringa oleifera* Lam. *Molecular Ecology*, 8: 463-470.
- Murashige T.** (1974). Plant propagation through tissue culture, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 25: 135-166.
- Murashige T. & Skoog F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.*, 15: 473-497.

- National Research Council** (1984). Casuarinas: nitrogen-fixing trees for adverse sites. Washington, D.C. : *National Academy Press*.
- Navatel J. et al.** (1988). Pommier, comportement en marcottières et aux vergers des porte greffe micropropagés de type Malus. *Infos Ctifl*, 44 : 25-8.
- Ndoye M.** (2004). Biologie de la reproduction et potentialités organogènes *in vitro* chez *Balanites aegyptiaca* (L.) Del. Thèse de doctorat de troisième cycle de Biologie Végétale. F.S.T - U.C.A.D, 93 p.
- Ndoye M., Diallo I. & Gassama/Dia Y.K.** (2003). *In vitro* multiplication of the semi-arid forest tree *Balanites aegyptiaca* (L.) Del., *African J. of Biotech.*, 2 (11): 421-424.
- Neale D.B., Wheeler N.C. & Allard R.W.** (1986). Paternal inheritance of chloroplast DNA in Douglas fir. *Canadian Journal of Forest Research*, 16: 1152-1154.
- Neale D.B. & Sederoff R.R.** (1989). Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in loblolly pine. *Theoretical and Applied Genetics*, 77: 212-216.
- Nekrasova T.V.** (1964). **Nair Y.** (1982). Induction of adventitious rooting *in vitro* in difficult - to - propagate cultivars of apple. In: Sriskandarajah S., Mullins M.G., Nair Y., eds. *Plant Sci. Lett.*, 24: 1-9.
- Niedz, Randall P., Bausher & Michael G.** (2002). Control of *in vitro* contamination of explants from greenhouse and field-grown trees. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 38: 468-471.
- Nitsch J.P. & Nitsch C.** (1965). Néof ormation de fleurs *in vitro* chez une espèce de jours courts : *Plumbago indica* L., *Ann. Physiol. vég.*, 7 : 251-256.
- Parducci L., Szmidt A.E., Madaghiele A., Anzidei M. & Vendramin G.G.** (2001). Genetic variation at chloroplast microsatellites (cpSSRs) in *Abies nebrodensis* (Lojac.) Mattei and three neighboring *Abies* species. *Theor. Appl. Genet.*, 102: 733-740.
- Proven J., Powell W. & Waugh R.** (1996). Analysis of cultivated potato (*Solanum tuberosum*) using inter microsatellite amplification. *Genome*, 39: 767-769.
- Rancillac M.** (1981). Mise au point d'une méthode de multiplication végétative *in vitro* du Pin maritime (*Pinus pinaster* Sol.) pour la constitution de clones à partir de semences, *AFOCEL*, 41-48.
- Sabapathy P. & Nair H.** (1992). *In vitro* propagation of taro with spermine, arginine and ornithine. Plantlet regeneration from primary shoot apices and axillary buds. *Plant Cell Reports*, 11: 290-294.
- Salimath S.S., De Oliveira A.C., Godwin I.D. & Bennetzen J.L.** (1995). Assessment of genome origins and genetic diversity in the genus *Eleusine* with DNA markers. *Genome*, 38: 757-763.

- Sambe M.A.N.** (2005). Evaluation *in vitro* des potentialités germinatives et morphogénétiques de *Parkia biglobosa* (Jacq.) Benth. Mémoire DEA, Biologie Végétale, F.S.T, Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal, 68 p.
- Seck M.** (1996). Etude des conditions de régénération *in vitro* chez *Prosopis juliflora* (Swart) DC et chez *Prosopis chilensis* (Molina) Stuntz., Mémoire DEA, Biologie Végétale, FST, Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal, 60 p.
- Skolmen R.G. & Mapes M.O.** (1978). Aftercare procedures required for field survival of tissue culture propagated *Acacia koa*. Proc. Intern. Plant prop. Soc., 28: 156-164.
- Snoussi Hager** (2000). Génotypage d'individus apomictiques chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) au moyen de la technique AFLP. Gembloux : FUSAGx, 121 p.
- Sogo A., Setoguchi H., Noguchi J., Jaffre T. & Tobe H.** (2001). Molecular phylogeny of *Casuarinaceae* based on rbcL and matK gene sequences. *J. Plant Res.*, 114: 259-464.
- Somasundaran T.R. & Jagadees S.S.** (1977). Propagation of *Casuarina equisetifolia* Forst. by planting shoots. *Indian Forest*, 103: 737-738.
- Steane D.A., Wilson K.L., & Hill R.S.** (2003). Using matK sequence data to unravel the phylogeny of *Casuarinaceae*. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 28: 47-59.
- Subbarao N.S. & Rodriguez-Barrueco C.** (1995). *Casuarinas*. New Delhi: Oxford & IBH.
- Swensen S.M.** (1996). The evolution of actinorhizal symbioses: evidence for multiple origins of the symbiotic association. *Amer. J. Bot.*, 83: 1503-1512.
- Tamba A.** (2000). Aménagement des peuplements forestiers pour la protection des cuvettes maraîchères le long du littoral Nord du Sénégal. ISRA/DRPF (DEFCCS) - Projet FNRAA, 16 p.
- Tautz D.** (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acid Research*, 17: 6463-6471.
- Theiler-Hedtrich R. & Badoux S.** (1986). Utilisation de la multiplication *in vitro* dans un programme de sélection de chicorée amère rouge (*Cichorium intybus* L.) *Revue Suisse Vitic. Arboric.*, 18 (5) : 271-275.
- Tsumura Y., Ohba K. & Strauss S. H.** (1996). Diversity and inheritance of Inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) and Sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theor. Appl. Genet.*, 92: 40-45.
- Vendramin G.G., Lelli L., Rossi P. & Morgante M.** (1996). A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in *Pinaceae*. *Molecular Ecology*, 5: 595-598.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. & Zabeau M.** (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Research*, 23: 4407-4414.

Walali Loudyi D. (1993). La multiplication *in vitro* des espèces ligneuses : état actuel et perspectives de développement. In : *Le progrès génétique passe-t-il par le repérage et l'inventaire des gènes ?* Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext, Paris, 399-409.

Webster C.A. & Jones O.P. (1989). Effects of sustained subculture on apparent rejuvenation of apple rootstock Mg *in vitro* and *in vivo*. *Arzn. Sci. For.*, 46: 1875-95.

Wheeler C.T. & Miller I.M. (1990). Current and potentiel uses of actinorhizal plants in Europe. In: *The biology of Frankia and actinorhizal plants*. Schwintzer C.R. and Tjepkema J.D. (eds.), San Diego: *Academic Press*, 365-389.

Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A. & Tingey S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids Research*, 18 (22): 6531-6535.

Wilson K.L. & Johnson L.A.S. (1989). *Casuarinaceae*: In: *Flora of Australia, Hamamelidales to Casuarinales*. Aust. Gov. Publ. Serv., Canberra, 3: 100-203.

Wolfe A.D., Xiang Q.Y. & Kephart S.R. (1998). Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (*Scrophulariaceae*) using hypervariable inter simple sequence repeat markers. *Mol. Ecol.*, 7: 1107-1125.

Yasodha R., Kathirvel M., Sumathi R., Gurumurthi K., Archak S. & Nagaraju J. (2004). Genetic analyses of *Casuarinas* using ISSR and FISSR markers. *Genetica*, 122: 161-172.

Yoda Lucien Bakré (2004). Etude génétique préliminaire des peuplements naturels de *Acacia senegal* (L.) Willd. et *Acacia laeta* Benth. du Burkina Faso à l'aide de marqueurs moléculaires du type RAPD. *Gembloux : FUSAGx*, II, 67 p.

Zietkiewicz E., Rafalski A. & Labuda D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20: 176-183.

ANNEXES

Annexe 1 : Formulaire de description des sites de prospection de *Casuarina equisetifolia*.**Nom de la station :****N° de relevé :**

Auteurs :

Date du relevé :

Lieu : CR :

Département :

Région :

Caractéristiques de la station**Climat**

- Pluviométrie :
- Température :

Humidité apparente de la station

- Très sèche :
- Sèche :
- Moyenne :
- Humide :
- Très humide :
- Entièrement humide :

Submersion

- Station jamais inondée :
- Station accidentellement inondée :
- Station submergée périodiquement :

Mode d'exploitation

- Pâturage :
- Jachère récente (< 2 ans)
- Jachère ancienne
- Champs
- Plantation forestière récente (= 2 ans)
- Plantation forestière ancienne

Etat de surface du sol

- Croûtes sable
- Affleurement rocheux
- Couvert
- Non couvert
- Dunes de sable

VEGETATION

- Recouvrement
- Degré d'ouverture
 - . Ferme
 - . Peu ouvert
 - . Assez ouvert
- Formation
 - . Végétation très claire
 - . Végétation ligneuse haute dense
 - . Végétation ligneuse haute assez claire
 - . Végétation ligneuse haute claire
 - . Végétation ligneuse basse
- Composition
 - . 1^{ère} espèce dominante :

Annexe 2 : Relevé de végétation à Guédiawaye, Hamo 6

Espèce	Numéros pied de filao		Hauteur de l'arbre (en m)	Circonfé- rence du tronc (en cm)	Port de l'arbre	N° et positions GPS	Observations
<i>Casuarina equisetifolia</i>	♂	1	12,50	60	Incliné coté terre	P 005	Le port des arbres est très affecté par la direction du vent.
		2	10,50	45,5	Droit	P 006	
		3	17,03	61,0	Droit	P 007	
		4	18	55,3	Droit		
		5	17,50	76,5	Incliné côté terre		
		6	12,20	82	Incliné côté terre		
		7	14	48	Incliné côté terre		
		8	11,20	38	Incliné côté terre		
		9	15	56	Incliné côté terre		
		10	21	62	Incliné côté terre		
	♀	11	15	64	Droit	P 021	Les branches et les aiguilles des filao sont affectées par des dépôts qu'apporte l'embrun marin.
		12	23	78	Droit	P 022	
		13	15,50	68	Incliné	P 023	
		14	15	54	Incliné	P 024	
		15	22	59	Incliné	P 025	
		16	11	50	Incliné	P 027	
		17	17,20	65	Droit	P 028	
		18	24	80	Droit	P 029	
		19	13	101	Incliné	P 030	
		20	16	87	Droit	P 031	
	♂	21	17	74	Droit	P 026	La circonférence du tronc est prise à 1m 30 du sol
		22	20	57	Droit	P 032	
		23	22	44	Incliné ramifié	P 033	
		24	23	64	Incliné	P 034	
		25	13	56	Incliné	P 035	
		26	18	51	Droit	P 036	
		27	12	47,5	Droit	P 037	
		28	11	54	Droit ramifié	P 038	
		29	14	40	Incliné ramifié	P 039	
		30	16	71	Incliné ramifié	P 040	

Annexe 3 : Relevé de végétation à Potou

Espèce	Numéros pied de filao		Hauteur de l'arbre (en m)	Circonfé- rence du tronc (en cm)	Port de l'arbre	N° et positions GPS	Observations
<i>Casuarina equisetifolia</i>	♂	1	14	43	Droit	P 052	Le port des arbres est peu affecté par la direction du vent.
		2	13	40	Incliné côté terre	P 054	
		3	14	42	Incliné côté terre	P 055	
		4	23	63	Droit	P 057	
		5	18	55	Droit	P 058	
		6	21	69	Droit	P 059	
		7	16,7	45	Droit	P 060	
		8	19	54	Droit	P 062	
		9	24	63	Droit	P 063	
		10	25	69	Incliné côté terre	P 068	
	♀	11	25	50	Droit	P 051	les pieds de filao qui composent la station sont jeunes.
		12	18,5	46	Droit	P 050	
		13	17	51	Droit	P 049	
		14	14,5	54	Incliné côté terre	P 048	
		15	17	70	Droit	P 053	
		16	12	55	Droit	P 047	
		17	09	42	Incliné côté terre	P 046	
		18	23	60	Incliné	P 045	
		19	10,5	51	Incliné	P 044	
		20	20	50	Droit	P 043	
	♂	21	22	67	Incliné côté terre	P 069	Les branches et les aiguilles des filao sont grasses c'est- à-dire gorgées d'eau, elles sont aussi très affectées par des dépôts qu'apporte l'embrun marin.
		22	22	55	Droit	P 071	
		23	24	57	Droit	P 070	
		24	13	53	Droit	P 072	
		25	18	53	Droit	P 067	
		26	15	51	Droit	P 064	
		27	23	58	Droit	P 065	
		28	20	57	Incliné côté terre	P 066	
		29	18,5	40	Droit	P 061	
		30	12,2	35	Incliné côté terre	P 056	

Annexe 4 : Relevé de végétation à Notto

Espèce	Numéros pied de filao		Hauteur de l'arbre (en m)	Circonfé- rence du tronc (en cm)	Port de l'arbre	N° et positions GPS	Observations
<i>Casuarina equisetifolia</i>	♂	1	15,5	40	Droit ramifié	P 074	Le port des arbres est peu affecté par la direction du vent. les pieds de filao qui composent la station sont jeunes et très ramifié. La circonférence du tronc est prise à 1m 30 du sol
		2	11	57	Incliné côté terre	P 075	
		3	14	49	Incliné côté terre	P 076	
		4	22	92	Incliné côté terre	P 077	
		5	16	46	Droit	P 078	
		6	12	53	Droit ramifié	P 079	
		7	24	40	Droit ramifié	P 080	
		8	25	65	Droit	P 081	
		9	19	55	Droit	P 082	
		10	23	73	Droit	P 083	
	♀	11	16	43	Droit	P 084	
		12	22	61	Droit	P 089	
		13	25	79	Incliné côté terre	P 091	
		14	20	59	Incliné côté terre	P 092	
		15	18	89	Droit ramifié	P 096	
		16	15	68	Droit ramifié	P 099	
		17	22	85	Incliné côté terre	P 100	
		18	25	55	Incliné côté terre	P 101	
		19	25	74	Droit ramifié	P 102	
		20	18	63	Incliné côté terre	P 103	
	♂+	21	25	72	Incliné côté terre	P 085	
		22	23	62	Incliné côté terre	P 086	
		23	22	64	Droit ramifié	P 087	
		24	17	49	Droit ramifié	P 088	
		25	24	76	Droit ramifié	P 090	
		26	25	55	Droit ramifié	P 093	
		27	24	57	Incliné côté terre	P 094	
		28	25	45	Droit ramifié	P 095	
		29	16	51	Incliné côté terre	P 097	
		30	25	62	Droit	P 098	

Annexe 5 : Relevé de végétation à Retba

Espèce	Numéros pied de filao		Hauteur de l'arbre (en m)	Circonfé- rence du tronc (en cm)	Port de l'arbre	N° et positions GPS	Observations
<i>Casuarina equisetifolia</i>	♂	1	25	61	Droit ramifié	P 114	<p>Le port des arbres est très affecté par la direction du vent.</p> <p>La plupart des pieds de filao qui composent la plantation sont très ramifiés</p> <p>La circonférence du tronc est prise à 1m 30 du sol</p>
		2	21	81	Droit	P 116	
		3	25	66	Incliné côté terre	P 122	
		4	18	85	Incliné côté terre	P 123	
		5	15	76	Incliné côté terre	P 125	
		6	25	97	Incliné côté terre	P 126	
		7	25	74	Incliné côté terre	P 127	
		8	25	64	Incliné côté terre	P 134	
		9	13	48	Incliné côté terre	P 135	
		10	15	64	Incliné côté terre	P 137	
	♀	11	19	68	Droit	P 110	
		12	20	57	Incliné côté terre	P 111	
		13	23	82	Incliné côté terre	P 115	
		14	17	46	Droit ramifié	P 118	
		15	13	63	Droit ramifié	P 121	
		16	24	60	Incliné côté terre	P 124	
		17	18	89	Incliné côté terre	P 132	
		18	17	64	Droit ramifié	P 133	
		19	18	65	Droit ramifié	P 136	
		20	12	57	Droit ramifié	P 138	
	♀	21	23	67	Incliné côté terre	P 109	
		22	24	57	Incliné côté terre	P 112	
		23	22	66	Droit	P 113	
		24	19	56	Droit	P 117	
		25	12	46	Droit ramifié	P 119	
		26	19	60	Droit ramifié	P 120	
		27	25	79	Droit ramifié	P 128	
		28	17	63	Incliné côté terre	P 129	
		29	25	74	Droit	P 130	
		30	25	68	Incliné côté terre	P 131	

Annexe 6 : Relevé de végétation à Malika

Espèce	Numéros pied de filao		Hauteur de l'arbre (en m)	Circonfé- rence du tronc (en cm)	Port de l'arbre	N° et positions GPS	Observations
<i>Casuarina equisetifolia</i>	♂	1	37	111	Incliné coté terre	P 143	Le port des arbres qui sont de grande taille est très affecté par la direction du vent. La plupart des pieds de filao qui composent la plantation manifeste des signes de vieillesse avec leur sommet qui est le plus souvent mort. La circonférence du tronc est prise à 1m 30 du sol
		2	28	69	Incliné coté terre	P 144	
		3	16	95	Incliné coté terre	P 146	
		4	32	119	Incliné coté terre	P 152	
		5	16	84	Incliné coté terre	P 153	
		6	25	65	Incliné coté terre	P 157	
		7	30	65	Incliné coté terre	P 159	
		8	35	84	Incliné coté terre	P 164	
		9	34	69	Incliné coté terre	P 166	
		10	35	64	Incliné coté terre	P 165	
	♀	11	35	58	Incliné coté terre	P 141	
		12	27	61	Incliné coté terre	P 142	
		13	35	72	Droit	P 147	
		14	20	64	Droit	P 150	
		15	19	101	Incliné coté terre	P 154	
		16	20	70	Incliné coté terre	P 162	
		17	23	65	Incliné coté terre	P 163	
		18	17	63	Incliné coté terre	P 167	
		19	16	56	Incliné coté terre	P 168	
		20	23	66	Incliné coté terre	P 169	
	♂	21	30	77	Droit	P 140	
		22	33	120	Incliné coté terre	P 145	
		23	23	86	Incliné coté terre	P 148	
		24	30	56	Incliné coté terre	P 149	
		25	11	60	Incliné coté terre	P 151	
		26	16	100	Incliné coté terre	P 155	
		27	24	60	Incliné coté terre	P 156	
		28	30	59	Incliné coté terre	P 158	
		29	23	142	Incliné coté terre	P 160	
		30	24	140	Incliné coté terre	P 161	

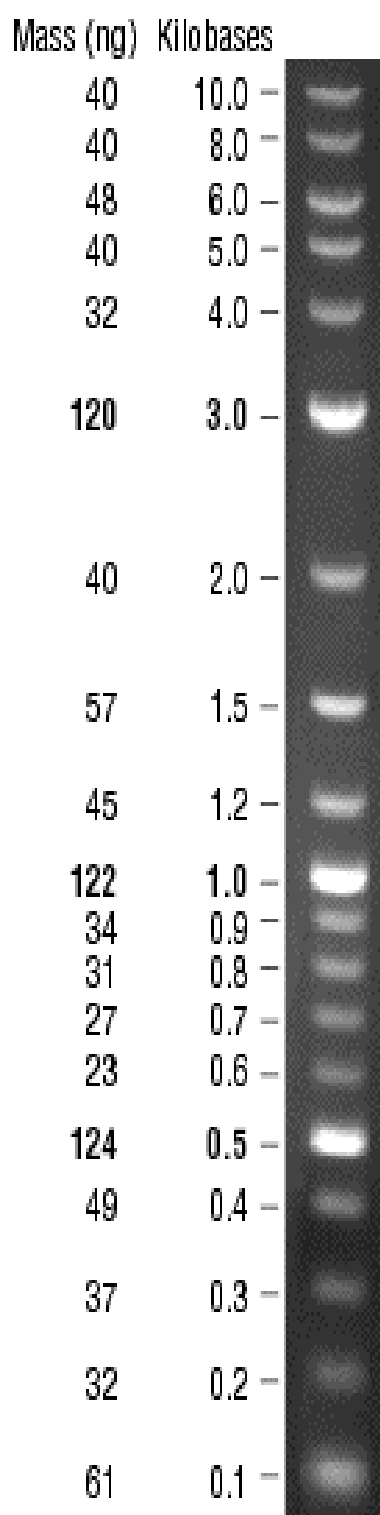
Annexe 7 : Composition du tampon Microprep (à préparer juste avant l'extraction).**Tampon A**

Sorbitol.....	0,35 M
Tris.....	0,1 M
EDTA.....	5 mM

Tampon B

Tris.....	0,2 M
EDTA.....	0,05 M
NaCl.....	2 M
CTAB (cethyl-trimethyl-ammonium bromide).....	2%

Tampon A.....	5 ml
Tampon B.....	5 ml
Sarkosyl 5%.....	2 ml
Bisulfite de Sodium.....	0,05 g

Annexe 8 : Echelle de masse moléculaire du marqueur 2 Log ladder (Biolabs, New England)

TITRE : Morphogenèse *in vitro* et caractérisation moléculaire de génotypes de *Casuarina equisetifolia* (L.) Forst. adaptés aux biotopes sahéliens

Prénom et Nom : Amadou Lamine NDOYE

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

<u>Jury</u> : Président :	M. Ibrahima NDOYE	Professeur Titulaire	UCAD
Membres :	M. Pape Mbacké SEMBENE	Maître de Conférences	UCAD
	M. Samba Ndao SYLLA	Maître de Conférences	UCAD
	Mme Mame Ourèye SY	Maître Assistante	UCAD

Directeurs du mémoire : Mme Mame Ourèye SY
M. Diaga DIOUF

RÉSUMÉ

Le littoral Nord du Sénégal a bénéficié de programmes successifs de reboisement et d'actions de protection suite à la dégradation des systèmes forestiers résultant des différents cycles de sécheresse. Cette barrière verte de *Casuarina equisetifolia* qui s'étend sur 185 km de long, de Dakar à Saint-Louis, sert de brise-vents, permet de fixer les dunes afin de lutter contre l'ensablement des cuvettes maraîchères de la zone des Niayes et préserve la biodiversité locale. Cependant, des contraintes majeures liées au vieillissement et à l'absence de régénération des populations existantes de *C. equisetifolia* compromettent la pérennisation de cette bande verte. Il devient donc crucial de résoudre ces problèmes par des techniques *in vitro* en multipliant des sujets élités sélectionnés sur la base de critères morphologiques et par des techniques moléculaires en évaluant par RAPD, la diversité génétique de ces populations.

C'est dans ce cadre que la collecte du matériel végétal a été réalisée au niveau de 5 différents sites de prospection qui comprenaient les populations les plus vieillissantes. Les explants introduits *in vitro* ont été des inflorescences femelles immatures (IFI) et des nœuds axillaires prélevés sur des arbres de différents sexes (femelle, hermaphrodite, mâle) pour chaque localité.

Pour optimiser les taux de réactivité et de croissance des explants, le milieu nutritif de base MS (Murashige & Skoog, 1962) complété avec de la BAP seule ou associée à l'ANA à pH 5,7 et solidifié avec de l'agar à 8 g.L⁻¹ a été choisi. Le protocole de désinfection adopté a permis d'observer des taux élevés de décontamination variant de 62 à 96% pour les IFI et de 58 à 100% pour les nœuds axillaires. Quant à l'analyse de la réactivité des explants, une meilleure reprise d'activité a été obtenue respectivement pour 84% des IFI maintenues pendant 5 semaines dans le milieu M9 (MS + BAP 2,0 mg.L⁻¹ + ANA 9,31.10⁻³ mg.L⁻¹) et pour 87,5% des nœuds axillaires au bout de 3 semaines dans le milieu M4 (MS + BAP 2,0 mg.L⁻¹). Un meilleur taux de multiplication (7,00) a été enregistré dans le milieu M10 (MS + BAP 2,5 mg.L⁻¹ + ANA 9,31.10⁻³ mg.L⁻¹) pour les nœuds axillaires. Un taux d'enracinement de 18,18 % a été observé sur les rameaux issus des IFI au bout de 4 semaines de transfert dans le milieu rhizogène. Après sevrage en mini-serre, le taux de survie observé est de 25% pour les microplants issus d'IFI.

L'analyse par RAPD a révélé que les populations de *C. equisetifolia* plantées dans le littoral Nord sont constituées d'individus génétiquement différents. Cependant, le faible taux de polymorphisme obtenu (4,36%) traduit un fort degré de parenté entre les pieds. Cela suggère que différentes variétés de *C. equisetifolia* constituent le peuplement du littoral Nord.

Mots clés : *Casuarina equisetifolia*, Micropropagation *in vitro*, Biodiversité, Cytokinines, Auxines, RAPD, Littoral Nord.