

Micropropagation par bourgeonnement axillaire *in vitro* de clones juvéniles d'*Acacia auriculiformis* : influence du génotype

Godefroy IWANGOU^{1, 2}

¹ Faculté des sciences
agronomiques
de Gembloux
Département de biochimie appliquée
Unité de phytopathologie

² Cra-W
Département biotechnologie
Section multiplication végétative
234, chaussée de Charleroi
5030 Gembloux
Belgique

L'aptitude des acacias à fixer l'azote atmosphérique

a été largement utilisée pour le reboisement de régions humides et subhumides, notamment *Acacia auriculiformis*, *A. mangium* et *A. crassicarpa* pour la production de bois de chauffage et de pâte à papier. Parmi ces essences, *A. auriculiformis* s'adapte le mieux aux conditions environnementales et produit un bois plus dense. L'étude de micropropagation présentée ici révèle les caractéristiques avantageuses du clone 23 en termes de multiplication, de formation d'organes foliés et de croissance. Ainsi, la méthode de micropropagation décrite pourrait être appliquée à grande échelle.



Photo 1.

Touffes formées à partir de microboutures des clones 10 (à gauche) et 23 (à droite) cultivées en bouteilles « Le Parfait » de 0,5 l sur milieu C, pendant 2 mois.
Photo G. Iwangou.

RÉSUMÉ

MICROPROPAGATION PAR BOURGEONNEMENT AXILLAIRE *IN VITRO* DE CLONES JUVÉNILES D'ACACIA AURICULIFORMIS : INFLUENCE DU GÉNOTYPE

L'étude de la micropropagation *in vitro* d'*Acacia auriculiformis* est décrite à partir de germinations *in vitro* provenant d'un seul individu et soumises exactement aux mêmes conditions expérimentales. À l'issue de 3,5 mois de culture sur un milieu enrichi en benzylaminopurine (milieu D), le clone 23 se distingue de l'ensemble des autres clones demi-frères obtenus par des capacités supérieures de multiplication par bourgeonnement axillaire, de formation d'organes foliés et de croissance en absence de tout problème de dégénérescence (sénescence foliaire, nécrose de tige). Ces caractéristiques avantageuses du clone 23 pour une application à grande échelle de la méthode de micropropagation décrite nous ont incités à privilégier ce génotype pour la suite de notre étude, tout en le comparant au clone 10 plus représentatif de l'ensemble des autres clones demi-frères d'origine. Plusieurs hypothèses susceptibles d'expliquer de telles différences d'aptitude à la micropropagation *in vitro* par bourgeonnement axillaire entre génotypes juvéniles d'*A. auriculiformis* sont envisagées.

Mots-clés : *Acacia auriculiformis*, micropropagation, bourgeonnement axillaire, morphologie foliaire, rajeunissement.

ABSTRACT

MICROPROPAGATION BY *IN VITRO* AXILLARY BUDDING OF JUVENILE ACACIA AURICULIFORMIS CLONES: INFLUENCE OF THE GENOTYPE

This article describes a study on *in vitro* micropropagation of *Acacia auriculiformis*, germinated *in vitro* from a single individual and subjected to exactly the same experimental conditions. After 3.5 months of growth in a benzylaminopurine-enriched culture medium (medium D), clone 23 stood out distinctly amongst its half-siblings for its higher capacity for multiplication by axillary budding, for leaf organ formation and for the absence of degenerative problems during its growth (foliar senescence, stem necrosis). The advantageous characteristics of clone 23 for a large-scale application of the micropropagation method we describe has encouraged us to prefer this genotype for the next stages in our study, whilst also comparing it to clone 10 which is more representative of the full set of the other initial half-sibling clones. Several hypotheses may account for these differences between juvenile *Acacia auriculiformis* genotypes in their aptitudes for *in vitro* micropropagation by axillary budding.

Keywords: *Acacia auriculiformis*, micropropagation, axillary budding, leaf morphology, rejuvenation.

RESUMEN

MICROPROPAGACIÓN MEDIANTE BROTAÇÃO AXILAR *IN VITRO* DE CLONES JUVENILES DE ACACIA AURICULIFORMIS: INFLUENCIA DEL GENOTIPO

Se describe el estudio de la micropropagación *in vitro* de *Acacia auriculiformis* a partir de germinaciones *in vitro* procedentes de un solo individuo y sometidas exactamente a las mismas condiciones experimentales. Luego de 3,5 meses de cultivo en un medio enriquecido con bencilaminopurina (medio D), el clon 23 se diferencia de los demás clones medio hermanos obtenidos por su superior capacidad de multiplicación mediante brotación axilar y su formación de órganos foliares y de crecimiento sin ningún problema de degeneración (senescencia foliar, necrosis del tronco). Estas ventajosas características del clon 23 para una aplicación a gran escala del método de micropropagación descritos nos llevaron a favorecer este genotipo para la continuación de nuestro estudio, comparándolo al mismo tiempo con el clon 10, el más representativo del conjunto de los demás clones medio hermanos de origen. Se plantean varias hipótesis que podrían explicar estas diferencias de aptitud entre genotipos juveniles de *Acacia auriculiformis* para la micropropagación *in vitro* mediante brotes axilares.

Palabras clave: *Acacia auriculiformis*, micropropagación, brotación axilar, morfología foliar, regeneración.

Introduction

Les espèces du genre *Acacia* sont des arbres et arbustes de la famille des fabacées (sous-famille des mimosacées), qui regroupe quelque 1 400 espèces distribuées sur les continents africain, asiatique, américain, en Australie et dans les îles du Pacifique. Ces espèces poussent sous différents types de climat (tropical, subtropical et tempéré chaud) et diverses conditions écologiques mais sont surtout représentées dans les zones arides et semi-arides. Leur aptitude à fixer l'azote atmosphérique a été largement utilisée pour favoriser le reboisement de certaines régions humides et sub-humides, notamment pour les espèces *A. auriculiformis*, *A. mangium* et *A. crassica* destinées à la production de bois de chauffage et de pâte à papier (Bénin, Congo, Fidji, Inde, Indonésie, îles Salomon, Java, Ouganda, Malaisie, Madagascar, Niger, Nigeria, Thaïlande, Tanzanie, Vietnam...). *A. auriculiformis* présente une meilleure adaptabilité aux conditions environnementales, et produit un bois plus dense que les autres espèces d'*Acacia* spp. de zone tropicale humide. Mais, bien qu'un certain nombre d'études sur les possibilités de micropropager *A. auriculiformis* *in vitro* aient été déjà réalisées, les succès obtenus à ce jour restent assez limités (MITTAL *et al.*, 1989 ; RANGA RAO *et al.*, 1991 ; DAS *et al.*, 1993), surtout en ce qui concerne leur application à des programmes de multiplication industrielle.

A. auriculiformis fait partie de ces espèces d'acacias à phyllodes qui constituent rapidement l'essentiel de leur système foliaire. Ces phyllodes sont en fait des pétioles modifiés qui assurent la fonction photosynthétique des feuilles. Ils succèdent très précocement et graduellement, en passant par un type morphologique intermédiaire, aux feuilles composées pennées qui caractérisent les tout premiers stades du développement ontogénétique des jeunes plants issus de graines. Toutefois, la production de phyllodes,

morphologie foliaire caractéristique de l'état mature, apparaît bien avant le rapide déclin de l'aptitude à l'enracinement adventif de ces jeunes semis (observations personnelles non publiées). Les relations pouvant exister entre la morphologie foliaire et l'aptitude à la micropropagation n'ont en fait que très peu été étudiées chez ces espèces d'acacias à phyllodes de zones tropicales humides (MONTEUUIS *et al.*, 1995 ; MONTEUUIS, 2004 a ; BAURENS *et al.*, 2004).

Un certain nombre d'observations montrent que le rajeunissement de la morphologie foliaire peut être obtenu chez ces espèces d'acacias à phyllodes, susceptibles dans certaines conditions de produire des feuilles composées pennées caractérisant la phase juvénile. Cette réversion morphologique a pu être observée notamment à partir de microboutures d'*Acacia auriculiformis* en propagation *in vitro* en présence de BAP (6-benzylaminopurine) (MITTAL *et al.*, 1989). Les feuilles pennées de type juvénile peuvent également apparaître au niveau de la souche d'*A. mangium* fructifères, donc physiologiquement matures, après recépage de ces derniers (MONTEUUIS *et al.*, 1995). Le microbouturage *in vitro* de génotypes âgés d'*A. mangium* peut aussi stimuler la formation des feuilles composées pennées (MONTEUUIS, 2004 a), sans qu'aucune relation bien nette ait été trouvée entre ce changement de morphologie foliaire et l'aptitude à l'enracinement adventive d'*A. mangium* tant en pépinière (MONTEUUIS *et al.*, 1995) qu'en conditions de culture *in vitro* (MONTEUUIS, 2004 a et b).

Matériel végétal et méthodes

Les clones juvéniles d'*A. auriculiformis* sont issus de la germination d'un même lot de graines de provenance Queensland (Wenlock R Rocky Creek, Australie) fourni par le laboratoire de graines du département Forêt du Cirad (lot n° 95/10265N). Les graines de ce lot ayant été récoltées sur un seul arbre « mère » au sein d'un peuplement, les semis ou génotypes résultant de la germination de ces graines peuvent être considérés comme des demi-frères, dans la mesure où le taux d'allogécondation naturelle est très élevé chez *A. auriculiformis* (MORAN *et al.*, 1989).

Ces graines ont d'abord été immergées dans H₂SO₄ à 95 % pendant 15 min avant d'être rincées abondamment à l'eau courante, puis désinfectées par un trempage dans l'hypochlorite de sodium à 5 % (50 g/l) pendant 15 min, suivi de trois rinçages à l'eau distillée stérile. La germination est réalisée en conditions axéniques en boîtes de Petri standard placées en conditions contrôlées en salle de culture (voir conditions ci-dessous), sur de l'eau gélosée contenant 5,8 g/l d'agar (Pastagar B de marque Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) et 30 g/l de saccharose. Le pH du milieu est ajusté à 5,8 avant d'être autoclavé à 110 °C pendant 35 min.

Trois semaines plus tard, les 33 plantules ayant germé dans ces conditions sont sectionnées à environ 2 cm en dessous des cotylédons. L'ensemble axe épicotylé d'une hauteur moyenne de 5 mm comprenant les deux premières feuilles alternes et les cotylédons à sa base est ensuite inoculé en position verticale et en conditions axéniques dans des bouteilles « Le Parfait » de 0,5 l. Chacune de ces bouteilles contient environ 10 explants sur 100 ml du milieu de culture de base B détaillé ci-après, additionné de 1 mg/l d'AIB (acide indole-3-butérique) et de 0,5 g/l de charbon actif. Le milieu B est constitué des

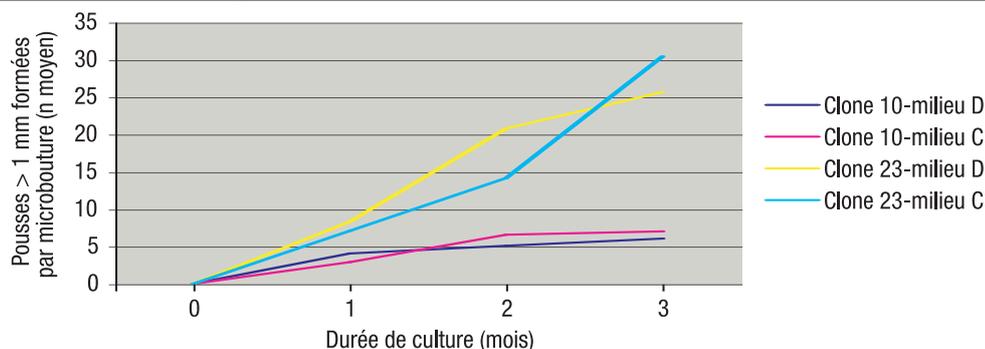


Figure 1.

Évolution du nombre moyen de pousses supérieures à 1 mm formées par microbouture des clones 10 et 23 cultivée sur chacun des milieux C et D, après respectivement 1, 2 et 3 mois.

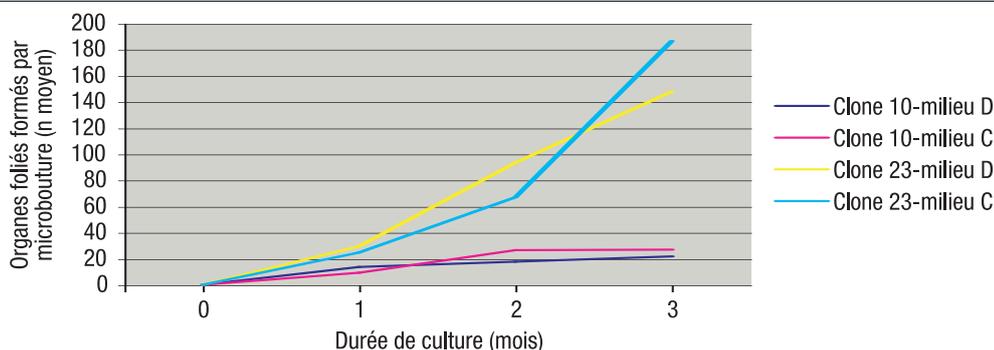


Figure 2.

Évolution du nombre moyen d'organes foliés (phylloides + feuilles intermédiaires + feuilles composées pennées) formés par microbouture des clones 10 et 23 cultivée sur chacun des milieux C et D, après respectivement 1, 2 et 3 mois.

macroéléments NH_4NO_3 (0,9 g/l), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,44 g/l), KNO_3 (1,3 g/l), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,37 g/l), KH_2PO_4 (0,3 g/l), $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (0,1 g/l), des microéléments MS (Murashige et Skoog 1962) incluant du chélate de fer (37,25 mg/l de Na_2EDTA + 27,85 mg/l de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0,4 mg/l de thiamine HCl, 100 mg/l d'inositol, 30 g/l de saccharose et 5,8 g/l d'agar (Pastagar B de marque Bio-Rad). Le pH du milieu est ajusté à 5,8 avant autoclavage à 110 °C pendant 35 min. Les cultures sont maintenues 6 mois dans ces conditions à une température de 23 ± 1 °C, sous une photopériode de 16 heures par jour d'intensité lumineuse – 45 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ – produite par des tubes fluorescents de 36 W type « Sylvania Gro-lux ». Sauf indication contraire, toutes les cultures de l'étude sont soumises à ces conditions.

À l'issue de ces 6 mois de culture, les 33 axes épicotylés se sont allongés, éventuellement ramifiés, et sont essentiellement composés de phylloides. Les microboutures (4 à 6 bourgeons axillaires pour une hauteur

moyenne d'environ 2 cm) prélevées sur les pousses de chacun des 33 axes épicotylés originels sont alors repiquées séparément pour former 33 clones distincts sur un milieu de prolifération D correspondant au milieu B additionné de BAP à 1 mg/l, d'AIB à 0,5 mg/l et d'AG (acide gibbérellique) à 0,5 mg/l. Après 3,5 mois de culture sur ce milieu D, les touffes (clusters) nouvellement formées sont repiquées et maintenues durant 3 mois sur un milieu d'enracinement et de croissance H correspondant au milieu B additionné d'AIB à 0,5 mg/l et d'AG3 à 0,5 mg/l. Les observations réalisées sur l'ensemble des 33 clones (représentés par 184 microboutures dont 16 microboutures du clone 23) durant les 3,5 mois de culture sur milieu D, puis les 3 mois sur milieu H (voir ci-dessous « Résultats »), nous ont incités à privilégier les deux clones 10 et 23 pour la suite de notre étude.

Des microboutures des clones 10 et 23 prélevées sur les clusters de la culture précédente sont à nouveau repiquées sur le milieu D et les clus-

ters formés sont maintenus en culture 10 mois durant sans repiquage intermédiaire. À l'issue de cette période, des microboutures (2 à 3 bourgeons d'environ 1 cm) présentant essentiellement des phylloides prélevées sur chacun des clones 10 et 23 sont réparties dans deux lots avant d'être cultivées séparément mais exactement dans les mêmes conditions sur milieu C – correspondant au milieu B additionné de BAP à 1 mg/l – et sur milieu D. Les observations de micropropagation sont réalisées après chaque mois (trois mois durant) à partir de pousses de plus d'un millimètre séparées des touffes formées par la culture de chaque clone sur chacun des milieux C et D (30 à 40 touffes par traitement). Alors que l'enracinement des touffes des clones 10 et 23 formées sur chacun des milieux C et D est observé après 4 mois de culture sans repiquage intermédiaire (environ 30 touffes par traitement).

Résultats

Observation de la micropropagation par bourgeonnement axillaire de la descendance de 33 clones juveniles d'*A. auriculiformis*

À l'issue de 3,5 mois sur milieu de prolifération D, le clone 23 se distingue de l'ensemble des autres clones par des capacités supérieures de multiplication par bourgeonnement axillaire, de formation des organes foliés de type feuilles composées pennées voire de feuilles intermédiaires et par l'absence de tout problème de dégénérescence (sénescence foliaire, nécrose de tige). L'ensemble des touffes du clone 23 repiquées sur le milieu d'enracinement (milieu H) développent rapidement des systèmes caulinaires et racinaires vigoureux et équilibrés, contrairement à la grande majorité des 32 autres clones qui, placés dans les mêmes conditions, dégénèrent à l'exception des clones 10, 17 et 30 qui figurent parmi les rares clones survivants.

Observation de la micropropagation par bourgeonnement axillaire des clones 10 et 23

Durant les trois premiers mois de culture sur chacun des deux milieux de prolifération C et D, le clone 23 se distingue du clone 10 par des capacités de formation et de développement des pousses bien supérieures (figures 1 et 2 ; photos 1 et 2), les deux clones montrant par ailleurs une variabilité intraclonale notable, comme l'indiquent les valeurs des écarts-types (tableaux I et II).

Les pousses des clones 10 et 23 observées après 1 mois de culture sont généralement des axes d'ordre 1 qui proviennent du débourrement des bourgeons axillaires des microboutures cultivées. La supériorité du clone 23 par rapport à son homo-



Photos 2.

Touffe (cluster) formée à partir d'une microbouture du clone 23 comprenant au départ uniquement trois bourgeons axillaires et cultivée sur le milieu D, pendant 3 mois (a) ; détail des microboutures produites (b).

Photos G. Iwangou.

logue 10 en matière de multiplication provient essentiellement d'un degré croissant de ramification, principalement basitone, alors que le clone 10 se limite à la production d'axes axillaires d'ordre 1, se ramifiant rarement en ordre 2.

Le nombre élevé d'organes foliés formés au sein des touffes du clone 23 s'explique par l'abondance

des pousses résultant de ce processus de ramification bien plus prononcé que pour le clone 10 cultivé sur chacun des milieux C et D.

Le clone 10 se distingue par une proportion bien plus forte d'organes foliés de type phyllodes, alors que les feuilles de type composées voire intermédiaires prédominent chez le clone 23.

Tableau I.
Nombre moyen (\pm écart-type) de pousses de plus d'un millimètre formées par microbouture cultivée sur chacun des milieux C et D, après respectivement 1, 2 et 3 mois.

Clone - milieu	Après 1 mois	Après 2 mois	Après 3 mois
10 - D	4,0 (\pm 1,5)	5,1 (\pm 1,9)	6,1 (\pm 2,3)
10 - C	2,9 (\pm 1,7)	6,6 (\pm 3,0)	7 (\pm 3,1)
23 - D	8,3 (\pm 10,3)	20,8 (\pm 9,8)	25,7 (\pm 8,8)
23 - C	7,1 (\pm 7,9)	14,2 (\pm 5,1)	30,4 (\pm 12,2)

Tableau II.
Nombre moyen (\pm écart-type) d'organes foliés (phyllodes + feuilles intermédiaires + feuilles composées pennées) formés par microbouture cultivée sur chacun des milieux C et D, après respectivement 1, 2 et 3 mois.

Clone - milieu	Après 1 mois	Après 2 mois	Après 3 mois
10 - D	13,5 (\pm 5,3)	17,6 (\pm 7,7)	21,6 (\pm 8,8)
10 - C	9,2 (\pm 7,1)	26,3 (\pm 15,3)	27,0 (\pm 13,5)
23 - D	29,5 (\pm 12,4)	93,4 (\pm 43,8)	147,7 (\pm 57,7)
23 - C	24,6 (\pm 11,1)	66,8 (\pm 25,3)	186,4 (\pm 61,7)

Tableau III.
Proportion de touffes (clusters) des clones 10 et 23 racinées après 4 mois de culture sur chacun des milieux C et D.

Clone - milieu	Touffes racinées
10 - D	6/29
10 - C	1/28
23 - D	30/30
23 - C	23/30

Observation de l'enracinement des touffes (clusters) des clones 10 et 23 formées durant 4 mois de culture sur chacun des milieux C et D

Après 4 mois de culture sur chacun des milieux C et D, la plupart des clusters du clone 23 observés développent un système racinaire en même temps que les pousses s'allongent (tableau III), alors que ces phénomènes sont beaucoup plus limités pour le clone 10 qui présente en outre des signes évidents de dégénérescence (jaunissement et chute des structures foliaires). Indifféremment du génotype, l'allongement des pousses favorise la formation d'organes foliés de type phyllodes.

Discussion

La variabilité de comportement constatée dans les mêmes conditions *in vitro* au sein de la descendance étudiée et plus précisément entre les deux génotypes 10 et 23 laisse penser que ce dernier, bien différent de ses autres demi-frères, pourrait être un hybride interspécifique d'*A. auriculiformis* x *A. mangium*. D'autant plus que la source de pollen à l'origine de la descendance des graines étudiées est inconnue.

Ces génotypes hybrides qui apparaissent entre *A. auriculiformis* et *A. mangium* présentent généralement des caractères morphologiques intermédiaires des deux parents (couleur des fleurs, aspect des gousses, taille et forme des structures foliaires, aspect et couleur de l'écorce, densité du bois) et une croissance au champ beaucoup plus vigoureuse que celle des parents purs (CHIA, 1993). Par ailleurs, GALIANA *et al.* (2003) ont pu constater une bien meilleure réactivité organogène *in vitro* de ces hybrides par rapport à l'espèce parentale « pure » *A. mangium*. Il pourrait en être de même vis-à-vis de l'autre espèce parentale *A. auriculiformis*, comme le suggèrent nos observations. La singularité génotypique du clone 23 par rapport à ses autres demi-frères mériterait d'être vérifiée par des marqueurs moléculaires qui se sont révélés fort utiles pour distinguer des clones d'*A. mangium* de clones hybrides interspécifiques d'*A. mangium* x *A. auriculiformis* dans une situation similaire (GALIANA *et al.*, 2003).

La réactivité bien contrastée de réponse aux cytokinines exogènes (BAP) observée au sein de la descendance étudiée pourrait alors s'expliquer par ces différences génétiques. Une réceptivité et une sensibilité différentes en fonction du génotype aux conditions de milieu, et non seulement vis-à-vis des phytorégulateurs exogènes (BAP, AIB, AG), peuvent induire rapidement des écarts de croissance et de développement significatifs des microboutures, et modifier considérablement les

échanges des vitroplants avec le même milieu de culture, et par suite leur comportement. Ainsi l'ampleur du bourgeonnement axillaire, du développement des pousses et des racines observés au niveau du clone 23 sont autant de facteurs susceptibles de faire évoluer les activités de synthèse endogène et de transport de l'auxine et de la cytokinine. En effet, l'auxine est synthétisée au niveau des apex de tige (primordium de feuilles et jeunes feuilles) alors que la cytokinine est synthétisée au niveau des apex de racine (DAVIES, 2004).

Des dosages en phytohormones (cytokinine et auxine) au sein des tissus des deux clones devraient permettre de mieux interpréter d'un point de vue physiologique les différences de comportement constatées, à l'instar d'autres études (FOURET *et al.*, 1986). Des analyses en hormones endogènes notamment des pousses formées entre 1 et 2 mois au niveau des clones 10 et 23 cultivés dans les mêmes conditions seraient utiles pour suivre l'évolution du rapport auxine/cytokinine dans cette période et pour essayer de cerner les conditions physiologiques qui favorisent les performances de micropropagation élevées (clone 23) par rapport à celles qui ne le permettent pas (clone 10). Alors que des analyses en hormones endogènes réalisées entre 2 et 3 mois permettraient de révéler les conditions physiologiques qui précèdent ou favorisent les difficultés de développement et la dégénérescence au niveau du clone 10. De tels dosages pourraient également permettre de vérifier l'influence du rapport auxine/cytokinine sur les changements de morphologie foliaire.

Les clones 10 et 23 constituent un excellent matériel d'étude dont l'issue pourrait avoir un impact réel sur les possibilités d'application de cette méthode de micropropagation aussi bien pour la multiplication d'un clone performant que pour celle d'un clone récalcitrant chez *A. auriculiformis*.

Remerciements

Je tiens particulièrement à remercier M. Olivier Monteuis (Cirad, département Bios, Umr 1098 Dap) pour l'aide apportée lors de la rédaction de cet article.

Références bibliographiques

- BAURENS F.-C., NICOLLEAU J., LEGAVRE T., VERDEIL J.-L., MONTEUUIS O., 2004. Genomic DNA methylation of juvenile and mature *Acacia mangium* micropropagated in vitro with reference to leaf morphology as phase change marker. *Tree Physiology*, 24 : 401-407.
- CHIA E., 1993. Recent developments in *Acacia* improvement at Sabah Softwoods. *In* : Kamis A., Taylor D. A. (éd.). *Acacias for rural, industrial and environmental development*. Proceedings of the second meeting of the Consultative Group for Research and Development of Acacias (COGREDA), Udorn Thani, Thailand, 15-18 February 1993. Bangkok, Thaïlande, Winrock International Institute for Agricultural Research, p. 179-185.
- DAS P. K., CHAKRAVARTI V., MAITY S., 1993. Plantlet formation in tissue culture from cotyledon of *Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth. *India J. For.*, 16 : 189-192.
- DAVIES P. J. (éd.), 2004. *Plant hormones. Biosynthesis, signal transduction, action !* Dordrecht, Pays-Bas, Kluwer Academic.
- FOURET Y., ARNAUD Y., MALDINEY R., SOTTA B., MIGINIAC E., 1986. Relation entre rhizogenèse et teneur en auxine et acide abscissique chez trois clones de *Sequoia sempervirens* issus d'arbres d'âge différent. *Comptes rendus de l'Académie des sciences, série 3, Sciences de la vie*, 303 (4) : 135-138.
- FRANCLLET A., FRANCLLET-MIRVAUX M. C., 1992. Elimination of topophysis in *Sequoia sempervirens* clone NP 29 : A model plant useful to progress in understanding the concept of rejuvenation. *In* : Mass production technology for genetically improved fast growing forest tree species. Symposium Afofel-lufro, Bordeaux (France). Nançis, France, Afofel, vol. 1, p. 113-125.
- GALIANA A., GOH D., CHEVALLIER M.-H., GIDIMAN J., MOO H., HATTAH M., JAPARUDIN Y., 2003. Micropropagation of *Acacia mangium* x *A. auriculiformis* hybrids in Sabah. *Bois et Forêts des Tropiques*, 275 (1) : 77-82.
- MITTAL A., AGARWAL R., GUPTA S. C., 1989. In vitro development of plantlets from axillary buds of *Acacia auriculiformis* – a leguminous tree. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 19 : 65-70.
- MONTEUUIS O., 2004 a. *In vitro* rooting of juvenile and mature *Acacia mangium* microcuttings with reference to leaf morphology as a phase change marker. *Trees*, 18 (1) : 77-82.
- MONTEUUIS O., 2004 b. *In vitro* micropropagation and rooting of *Acacia mangium* microshoots from juvenile and mature origins. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 40 : 102-107.
- MONTEUUIS O., VALLAURI D., POUPARD C., CHAUVIÈRE M., 1995. Rooting *Acacia mangium* cutting of different physiological age with reference to leaf morphology as a phase change marker. *Silvae Genetica*, 44 : 2-3.
- MORAN G. F., MUONA O., BELL J. C., 1989. Breeding systems and genetic diversity in *Acacia auriculiformis* and *A. crassicarpa*. *Biotropica*, 21 : 250-256.
- RANGA RAO G. V., PRASAD M. N. V., 1991. Plantlet regeneration from the hypocotyl callus of *Acacia auriculiformis*-multipurpose tree legume. *Plant Physiology*, 137 : 625-627.