

**CULTURE *IN VITRO* DES BOURGEONS
AXILLAIRES DE CHÊNE-LIÈGE
(*QUERCUS SUBER* L.)^(*)**

**II - Influence des régulateurs de croissance sur la
multiplication et l'enracinement**

M. L. EL KBIACH ⁽¹⁾, **A. LAMARTI** ⁽¹⁾, **A. ABDALI** ⁽¹⁾,
A. BADO ⁽²⁾

L'influence de cytokinines et du thidiazuron, composé à activité cytokininique, seuls ou combinés à l'AG₃ ou à des auxines a été étudiée sur la multiplication des bourgeons axillaires du Chêne-liège. De même, différentes auxines ont été testées sur l'enracinement des pousses feuillées.

Dans le milieu de culture WPM, additionné des microéléments et du mélange vitaminique MS, la BA à 2,2 µM combinée à 1,44 µM d'AG₃ favorise la multiplication. En revanche, la BA associée à d'autres régulateurs de croissance ne permet pas une amélioration du taux de multiplication. La rhizogénèse est importante en présence d'AIB.

Les plantes enracinées en tube sont acclimatées en pot sur substrat horticole à une humidité relative élevée.

(*) *Manuscrit reçu le 20 septembre 2001.*

(1) *Unité de Biotechnologie et d'Amélioration des plantes, Département de Biologie, Faculté des Sciences M'hannech II, BP 2121, 93002 Tétouan, Maroc. alamarti@fst.ac.ma*

(2) *Laboratoire de Mycologie et Biotechnologie végétale, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Université Victor Segalen Bordeaux 2, 3, place de la Victoire, 33076 Bordeaux Cedex. jbtalenc@club-internet.fr*

INTRODUCTION

Dans ce travail, la régénération de plantes entières à partir de la micropropagation de bourgeons axillaires issus de plantules de Chêne-liège a été obtenue.

L'influence des cytokinines seules ou associées à d'autres régulateurs de croissance sur la multiplication et l'enracinement des bourgeons a été étudiée. Le thidiazuron, substance à propriétés cytokininique dérivée de l'urée, a aussi été testé.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les glands ont été récoltés en octobre 1999 sur un pied de Chêne-liège élite, stockés à l'obscurité et à 4 °C, puis imbibés 48 heures avant d'être mis à germer à l'obscurité dans des sachets de toile ouverts renfermant de la tourbe stérile, à 26 °C, 75 % d'humidité relative, sous une photopériode de 16 heures. Les cultures sont arrosées une fois par semaine par la solution minérale de Gautheret [12] additionnée du Fe-EDTA du milieu MS de Murashige et Skoog [18] et traitées par une solution de Benlate à 2 %. Après trois mois, les plantules mesurent environ 40 cm de longueur. Des nœuds de 1 cm de la partie médiane des plantules ont été prélevés, lavés, stérilisés et placés sur un milieu de base renfermant les macroéléments WPM de McCown et Lloyd [17], les microéléments et vitamines MS, 100 mg/l de méso-inositol, 3 % de saccharose et 0,7 % d'agar additionné de 4,5 μ M de BA (6-benzyladénine) [10].

Pour la phase de multiplication, les bourgeons induits sont transférés sur le milieu de base. La kinétine, la 2ip ($N_6-\Delta_2$ -isopenténylaminopurine), la zéatine, le TDZ (thidiazuron, Dropp[®]) et la BA ont été testés. La BA a été évaluée seule ou combinée à l'AG₃ (acide gibbérellique 3), l'AIA (acide indole 3-acétique), l'AIB (acide indole 3-butyrique) ou l'ANA (acide 2-naphthalène acétique). Les explants ont été placés dans des fioles de 125 ml contenant environ 30 ml de milieu fermées hermétiquement par un couvercle. Le pH des milieux est ajusté à 5,5-5,8 avant stérilisation vingt minutes à 120 °C.

Pour la phase d'enracinement, les pousses feuillées, débarrassées d'environ 0,3 cm de leur base, ont été soit placées sur le milieu de base dont les macroéléments WPM ont été dilués de moitié contenant de l'auxine

pendant une semaine, soit trempées deux minutes dans une solution auxinique. Elles sont ensuite transférées sur le milieu de base dépourvu de régulateur de croissance avec les macroéléments WPM 1/2. L'AIB a été testé seul ou combiné à l'ANA ou au 2,4-D (acide 2,4-dichlorophénoxyacétique). Les explants ont été disposés verticalement à la surface des milieux nutritifs dans des tubes à essais (18 x 180 mm) renfermant environ 15 ml de milieu bouchés par du coton hydrophile et recouverts d'une feuille d'aluminium. Le pH des milieux est ajusté à 5,5-5,8 avant stérilisation vingt minutes à 120 °C.

Après 30 jours, les pousses vigoureusement enracinées sont transférées dans des pots contenant de la perlite. Elles sont maintenues dans des sachets en plastique pour assurer un taux d'humidité relativement élevé. Les cultures sont arrosées deux fois par semaine avec la solution minérale WPM (macroéléments) à laquelle ont été ajoutés les microéléments MS.

Les cultures sont placées dans une chambre climatisée à 26 °C pourvue de tubes "Phillips – 40 W" assurant un éclairage 2000-2500 lux. La photopériode est de 16 heures de lumière par jour.

Trente explants ont été utilisés pour chaque expérience et les résultats sont la moyenne de trois répétitions. La comparaison de ces résultats est faite par analyse de variance (test ANOVA).

RÉSULTATS

La réponse des bourgeons axillaires aux cytokinines exogènes est variable selon le type et la concentration des cytokinines utilisées (Tableau I).

En présence de 2,32 μM de kinétine, le pourcentage de multiplication est faible (26,7 %), avec 1,2 bourgeons d'environ 0,6 cm. À cette concentration, on observe une légère hyperhydrie touchant la totalité des bourgeons. En doublant la dose de la kinétine, le taux de multiplication (41,7 %) ainsi que le nombre moyen de bourgeons par culture (1,4) augmentent. La longueur moyenne des bourgeons reste pratiquement inchangée. Les bourgeons présentent des feuilles jaunes. La chlorose s'accroît surtout après la quatrième semaine de culture. Quelle que soit la concentration de kinétine, les bourgeons sont compacts et les feuilles larges.

La 2ip stimule faiblement la multiplication. Le nombre moyen de bourgeons par culture ainsi que leur longueur moyenne augmentent avec la plus forte concentration, mais les bourgeons restent toujours hyperhydriques et les feuilles sont jaunes et larges.

Le pourcentage important de multiplication (46,7 %) obtenu avec 2,28 μM de zéatine reste inchangé avec une concentration double. On note la formation d'un cal vert, de petite taille, à la base de quelques bourgeons non multipliés (26,7 et 15,4 % de callogenèse pour 2,28 et 4,56 μM de zéatine respectivement). Les bourgeons sont compacts et vert foncé. L'hyperhydrie est généralement marquée.

Tableau I :

Effet de 4 cytokinines et du TDZ, composé à activité cytokinique, sur la multiplication des bourgeons axillaires de Chêne-liège après un mois de culture sur le milieu de base

(macroéléments WPM, microéléments et vitamines MS, 100 mg/l de méso-inositol, 30 g/l de saccharose, 0,7 % agar). Les valeurs suivies d'une même lettre ne présentent pas de variation significative à 5 %.

Cytokinine (μM)	Pourcentage de multiplication	Nombre moyen de bourgeons	Longueur moyenne des bourgeons (cm)	
Kinétine	2,32	26,7 ^{ab}	1,21 \pm 0,10 ^a	0,62 \pm 0,05 ^a
	4,64	41,7 ^{bc}	1,40 \pm 0,13 ^b	0,66 \pm 0,06 ^a
2ip	2,46	25,0 ^{ab}	1,13 \pm 0,30 ^a	0,56 \pm 0,01 ^a
	4,92	30,0 ^b	1,32 \pm 0,10 ^{ab}	0,73 \pm 0,02 ^{ab}
Zéatine	2,28	46,7 ^c	2,50 \pm 0,20 ^c	0,79 \pm 0,04 ^{ab}
	4,56	46,1 ^c	2,31 \pm 0,11 ^c	0,80 \pm 0,06 ^{ab}
BA	2,20	71,9 ^d	5,30 \pm 0,24 ^e	1,15 \pm 0,03 ^b
	4,40	50,1 ^c	4,30 \pm 0,10 ^d	0,96 \pm 0,01 ^b
TDZ	2,27	20,0 ^a	2,11 \pm 0,10 ^c	0,62 \pm 0,02 ^a
	4,54	14,3 ^a	1,71 \pm 0,21 ^{bc}	0,60 \pm 0,03 ^a

BA : benzyladénine

2ip : 2-isopenténylamino purine

TDZ : Thidiazuron

La BA à 2,2 μM donne une multiplication intense des bourgeons (71,9 %), un maximum de bourgeons par culture (5,3) et une longueur moyenne maximale (1,15 cm). Les bourgeons présentent des feuilles chlorophylliennes. En doublant la dose de BA (4,5 μM), le degré de chlorose s'accroît après la troisième semaine de culture.

Le thidiazuron (TDZ), composé à activité cytokinine, donne un pourcentage de multiplication et un nombre moyen de bourgeons par culture d'autant plus faibles que sa concentration est élevée, sans pour autant avoir une influence sur la longueur moyenne des bourgeons. Les bourgeons obtenus sont compacts, munis de feuilles larges, et forment à leur base un cal vert, dur et moyennement développé. Le pourcentage de callogenèse atteint 42,9 % pour 4,54 μM .

D'après ces résultats, la BA s'avère être la cytokinine la plus adaptée à la multiplication des bourgeons axillaires de Chêne-liège.

Pour étudier en détail l'influence de la BA sur la multiplication des bourgeons axillaires, la gamme de concentrations testées (0 ; 1,33 ; 2,2 ; 3,1 ; 4,5 et 6,6 μM) a été augmentée. Les résultats sont rapportés dans le Tableau II.

Tableau II :

Effet de diverses concentrations de benzyladénine sur la multiplication des bourgeons axillaires de Chêne-liège après un mois de culture sur le milieu de base

(macroéléments WPM, microéléments et vitamines MS, 100 mg/l de méso-inositol, 30 g/l de saccharose, 0,7 % agar). Les valeurs suivies d'une même lettre ne présentent pas de variation significative à 5 %.

BA (μM)	Pourcentage de multiplication	Nombre moyen de bourgeons	Longueur moyenne des bourgeons (cm)
0,00	0 ^a	—	—
1,33	46,7 ^c	4,41 \pm 0,24 ^b	1,10 \pm 0,02 ^a
2,20	72,2 ^d	5,65 \pm 0,62 ^c	1,12 \pm 0,03 ^a
3,10	66,7 ^d	4,21 \pm 0,33 ^b	0,93 \pm 0,06 ^a
4,40	50,0 ^c	4,18 \pm 0,35 ^b	0,91 \pm 0,02 ^a
6,60	35,7 ^b	3,29 \pm 0,15 ^a	0,86 \pm 0,05 ^a

En absence de toute phytohormone, le taux de multiplication est nul et les bourgeons finissent par mourir après un mois de culture.

Le taux de multiplication est maximal à 2,2 μM de BA (72,2 %) ainsi que le nombre moyen de bourgeons par culture (5,6) et leur longueur moyenne (1,1 cm). Les bourgeons sont généralement vert foncé et vigoureux.

À 1,33 μM , les bourgeons font 1,1 cm et sont vert clair. Les concentrations élevées modifient faiblement la longueur moyenne des bourgeons et accentuent les symptômes de chlorose. La concentration de 2,2 μM a donc été conservée.

L'effet de 2,2 μM de BA combinées à différentes concentrations d'AG₃ (0 ; 0,29 ; 0,87 ; 1,44-2 et 2,89 μM), réputé stimuler l'allongement des tiges, a été étudié sur la multiplication des bourgeons. Le Tableau III résume les résultats obtenus.

Tableau III :

Effet de 2,2 μM de benzyladénine combinée à diverses concentrations d'acide gibbérellique sur la multiplication des bourgeons axillaires de Chêne-liège après un mois de culture sur le milieu de base

(macroéléments WPM, microéléments et vitamines MS, 100 mg/l de méso-inositol, 30 g/l de saccharose, 0,7 % agar). Les valeurs suivies d'une même lettre ne présentent pas de variation significative à 5 %.

AG ₃ (μM)	Pourcentage de multiplication	Nombre moyen de bourgeons	Longueur moyenne des bourgeons (cm)
0,00	71,1 ^c	5,21 \pm 0,19 ^c	1,14 \pm 0,02 ^a
0,29	51,7 ^b	4,42 \pm 0,21 ^b	1,21 \pm 0,03 ^{ab}
0,87	53,3 ^b	5,46 \pm 0,13 ^c	1,44 \pm 0,04 ^b
1,44	80,0 ^d	5,56 \pm 0,25 ^c	1,90 \pm 0,02 ^c
2,00	66,7 ^c	3,12 \pm 0,64 ^a	1,11 \pm 0,06 ^a
2,89	33,3 ^a	3,19 \pm 0,46 ^a	1,10 \pm 0,01 ^a

À 0,29 μM , l'AG₃ combiné à 2,2 μM de BA fournit un taux non négligeable de multiplication (51,7 %). Ce dernier augmente avec la dose d'AG₃ jusqu'à 80 % à 1,44 μM . Le nombre moyen de bourgeons par culture est alors porté à 5,6 et leur longueur à 1,9 cm. Tous ces paramètres diminuent avec l'augmentation de la teneur en acide gibbérellique. Pour 2,89 μM d'AG₃, le degré de chlorose s'accroît après la troisième semaine de culture et les feuilles apicales se nécrosent.

L'action des auxines AIA (0,57 ; 1,71 ; 2,85 ; 4,00 et 5,71 μM), AIB (0,49 ; 1,48 ; 2,46 ; 3,44 et 4,92 μM) et ANA (0,54 ; 1,61 ; 2,68 ; 4,00 et 5,71 μM) associées à 2,2 μM de BA et 1,44 μM d'AG₃ est résumée dans le Tableau IV.

Tableau IV :

Effet de 3 auxines associées à 2,2 μM de BA et 1,44 μM d'AG₃ sur la multiplication des bourgeons axillaires de Chêne-liège après un mois de culture sur le milieu de base

(macroéléments WPM, microéléments et vitamines MS, 100 mg/l de méso-inositol, 30 g/l de saccharose, 0,7 % agar). Les valeurs suivies d'une même lettre ne présentent pas de variation significative à 5 %.

Concentration (μM)	Pourcentage de multiplication	Nombre moyen de bourgeons	Longueur moyenne des bourgeons (cm)
Témoin	85,4 ^c	5,53 ± 0,63 ^d	1,84 ± 0,06 ^d
AIA			
0,57	68,5 ^d	3,61 ± 0,40 ^c	1,45 ± 0,02 ^c
1,71	62,3 ^{cd}	3,35 ± 0,21 ^{bc}	1,22 ± 0,02 ^{bc}
2,85	57,8 ^c	3,14 ± 0,22 ^{bc}	1,13 ± 0,01 ^b
4,00	43,6 ^b	2,82 ± 0,30 ^b	0,92 ± 0,01 ^{ab}
5,71	37,6 ^a	2,61 ± 0,18 ^b	0,70 ± 0,02 ^{ab}
AIB			
0,49	70,6 ^d	3,52 ± 0,44 ^c	1,44 ± 0,03 ^c
1,48	67,6 ^d	3,21 ± 0,28 ^{bc}	1,12 ± 0,02 ^b
2,46	55,4 ^c	2,95 ± 0,15 ^b	0,92 ± 0,03 ^{ab}
3,44	52,7 ^c	2,64 ± 0,36 ^b	0,91 ± 0,02 ^{ab}
4,92	47,3 ^{bc}	2,31 ± 0,41 ^{ab}	0,78 ± 0,01 ^{ab}
ANA			
0,54	69,3 ^d	3,21 ± 0,42 ^{bc}	0,86 ± 0,02 ^{ab}
1,61	63,1 ^{cd}	2,82 ± 0,24 ^b	0,80 ± 0,01 ^{ab}
2,68	52,6 ^c	2,43 ± 0,51 ^{ab}	0,52 ± 0,03 ^a
4,00	43,1 ^b	2,16 ± 0,18 ^a	0,50 ± 0,01 ^a
5,71	34,2 ^a	1,94 ± 0,35 ^a	0,47 ± 0,02 ^a

AIA : acide indole 3-acétique
ANA : acide naphthalène acétique
AG₃ : acide gibbérellique 3

AIB : acide indole 3-butyrique
BA : benzyladénine

En absence de toute substance auxinique, la multiplication est la plus importante (85,4 %) et la plus intense (5,5 bourgeons). Les bourgeons sont chlorophylliens et bien développés (1,8 cm).

Le taux de multiplication, le nombre moyen de bourgeons et leur longueur moyenne diminuent avec l'augmentation de la concentration des 3 auxines. L'addition de doses croissantes d'AIA s'accompagne d'un jaunissement des feuilles, très accentué à partir de 4 μM . Avec l'AIB, un cal brun, dur et moyennement développé à la base des bourgeons a été observé. Le degré de chlorose s'accroît avec la concentration d'ANA et les cals formés à la base des bourgeons sont durs, bruns, compacts et bien développés.

Les bourgeons transférés sur le milieu de base dépourvu de toute substance de croissance manifestent une croissance rapide. Les pousses feuillées de couleur vert foncé atteignent 1,5 cm et 3,6 cm au bout de 2 et 5 semaines.

Il est bien connu que la capacité d'enracinement des bourgeons dépend du type et de la concentration de l'auxine présente dans le milieu de culture. Un passage d'une semaine sur le milieu de base dont les macroéléments WPM ont été dilués de moitié renfermant de l'AIB (2,46 ; 3,44 et 4,92 μM), de l'ANA (2,68 ; 3,76 et 5,4 μM) ou du 2,4-D (2,26 ; 3,16 et 4,52 μM) suivi d'un enracinement sur le même milieu dénué de phytohormones a été testé (Tableau V).

L'AIB à 3,44 et 4,92 μM stimule la rhizogénèse (75,6 et 60 % respectivement), et donne un nombre moyen et une longueur moyenne de racine importants. Les plantules restent vert foncé. À 2,46 μM , le pourcentage d'enracinement (34,5 %) et le nombre moyen de racines (1,4) diminuent.

L'ANA s'est avéré peu propice à l'enracinement des pousses. À 3,76 μM , l'enracinement est maximal (40,2 %) avec des racines courtes (5,3 cm). Quelle que soit sa concentration, l'ANA favorise la formation d'un cal dur, brun et moyennement développé à la base des pousses feuillées.

Le 2,4-D à 3,16 μM stimule la rhizogénèse (59,1 %). Le nombre moyen de racines ainsi que leur longueur sont importants, mais les racines restent grêles, ce qui empêche les pousses de survivre plus de trois semaines. Aux autres concentrations, le taux d'enracinement reste faible.

L'AIB apparaît être l'auxine la mieux adaptée à la rhizogénèse et a été retenue pour la suite des expériences.

Tableau V :

Effet d'un passage d'une semaine sur le milieu de base avec les macroéléments WPM 1/2 en présence de diverses auxines sur l'enracinement des pousses feuillées de Chêne-liège après 4 semaines de culture sur le même milieu dénué de phytohormones.
Les valeurs suivies d'une même lettre ne présentent pas de variation significative à 5 %.

Concentration (μM)	% d'enracinement	Nombre moyen de feuilles	Longueur moyenne de la partie aérienne (cm)	Nombre moyen de racines	Longueur moyenne des racines (cm)	
AIB	2,46	34,5 ^a	3,22 \pm 0,20 ^a	1,51 \pm 0,18 ^a	1,42 \pm 0,16 ^a	4,41 \pm 0,22 ^b
	3,44	75,6 ^d	10,70 \pm 0,64 ^g	2,46 \pm 0,28 ^c	4,53 \pm 0,50 ^e	5,34 \pm 0,31 ^d
	4,92	60,0 ^c	8,32 \pm 0,16 ^f	1,80 \pm 0,17 ^{ab}	3,60 \pm 0,28 ^d	4,22 \pm 0,41 ^b
ANA	2,68	25,6 ^a	4,64 \pm 0,14 ^c	2,11 \pm 0,24 ^b	2,11 \pm 0,22 ^b	3,41 \pm 0,28 ^a
	3,76	40,2 ^b	6,25 \pm 0,28 ^e	2,31 \pm 0,16 ^{bc}	3,45 \pm 0,34 ^{cd}	5,30 \pm 0,29 ^d
	5,40	32,5 ^a	5,54 \pm 0,40 ^{de}	1,90 \pm 0,15 ^{ab}	2,46 \pm 0,20 ^b	4,81 \pm 0,31 ^c
2,4-D	2,26	30,7 ^a	4,25 \pm 0,33 ^b	1,74 \pm 0,21 ^{ab}	2,31 \pm 0,13 ^b	4,61 \pm 0,21 ^{bc}
	3,16	59,1 ^c	5,21 \pm 0,24 ^d	2,11 \pm 0,21 ^b	3,40 \pm 0,34 ^{cd}	4,90 \pm 0,32 ^{cd}
	4,52	38,5 ^b	4,44 \pm 0,26 ^{bc}	2,13 \pm 0,20 ^b	3,23 \pm 0,18 ^c	4,44 \pm 0,41 ^b

AIB : acide indole 3-butyrique

ANA : acide naphthalène acétique

2,4-D : acide 2,4-dichlorophénoxyacétique

L'effet d'un passage d'une semaine sur le milieu de base renfermant une gamme de concentrations d'AIB (1,48 ; 2,46 ; 3,44 et 4,92 μM) suivi d'une culture sur un milieu dénué de phytohormones sur l'enracinement des pousses de Chêne-liège est résumée dans le Tableau VI.

Les meilleurs résultats sont obtenus avec 3,44 μM d'AIB. Le pourcentage de rhizogenèse atteint 75,6 % et les racines sont longues (5,3 cm) et nombreuses (4,6).

À 4,92 μM , le pourcentage d'enracinement (60 %) reste important, mais le nombre moyen de racines par culture ainsi que leur longueur diminuent.

Tableau VI :

Effet d'un passage d'une semaine sur le milieu de base avec les macroéléments WPM 1/2 avec diverses concentrations d'AIB sur l'enracinement des pousses feuillées de Chêne-liège après 4 semaines de culture sur le même milieu dénué de phytohormones.

Les valeurs suivies d'une même lettre ne présentent pas de variation significative à 5 %.

AIB (μM)	% d'enraci- nement	Nombre moyen de feuilles	Longueur moyenne de la partie aérienne (cm)	Nombre moyen de racines	Longueur moyenne des racines (cm)
1,48	30,6 ^a	3,22 \pm 0,18 ^a	1,41 \pm 0,18 ^a	1,36 \pm 0,26 ^a	4,32 \pm 0,24 ^a
2,46	34,5 ^a	3,52 \pm 0,26 ^a	1,51 \pm 0,20 ^a	1,41 \pm 0,15 ^a	4,44 \pm 0,34 ^a
3,44	75,6 ^c	10,70 \pm 0,61 ^c	2,46 \pm 0,17 ^b	4,58 \pm 0,54 ^c	5,34 \pm 0,42 ^b
4,92	60,0 ^b	8,35 \pm 0,45 ^b	1,81 \pm 0,21 ^b	3,63 \pm 0,21 ^b	4,25 \pm 0,26 ^a

Aux faibles concentrations (1,48 et 2,46 μ M), le taux d'enracinement est moindre ainsi que le nombre moyen de racines et les racines peuvent atteindre 4,4 cm.

La base des bourgeons a été trempée 2 minutes dans une solution d'AIB à différentes concentrations (0 ; 2,46 ; 3,44 et 4,92 mM) (Tableau VII).

En absence d'auxine, le taux d'enracinement est nul. Avec 2,46 mM d'AIB, l'enracinement est faible (43,2 %), mais la longueur moyenne des racines est importante (7,1 cm). Le maximum de rhizogenèse est enregistré pour 3,44 mM (83,6 %), avec un nombre moyen de racines satisfaisant (4,7) et des racines longues (7,2 cm). À 4,92 mM, le taux d'enracinement diminue légèrement (62,3 %) et les racines formées restent longues (6,9 cm).

Bien que la longueur moyenne des racines ne semble pas être influencée par la concentration d'auxine, on peut conclure que la solution d'AIB est plus favorable à 3,44 mM.

Au cours des expériences, il a été constaté que les pousses les plus vigoureuses au départ sont les plus susceptibles d'être enracinées.

Tableau VII :

Effet d'un trempage de 2 minutes dans diverses concentrations d'acide indole 3-butyrique sur l'enracinement des pousses feuillées de Chêne-liège après 4 semaines de culture sur un milieu dénué de phytohormone (macroéléments WPM 1/2, microéléments et vitamines MS, 100 mg/l de méso-inositol, 30 g/l de saccharose, 0,7 % agar). Les valeurs suivies d'une même lettre ne présentent pas de variation significative à 5 %.

AIB (μ M)	% d'enracinement	Nombre moyen de feuilles	Longueur moyenne de la partie aérienne (cm)	Nombre moyen de racines	Longueur moyenne des racines (cm)
0,00	0,0 ^a	3,12 \pm 0,19 ^a	1,70 \pm 0,13 ^a	—	—
2,46	43,2 ^b	5,23 \pm 0,23 ^b	1,90 \pm 0,19 ^{ab}	2,51 \pm 0,15 ^a	7,15 \pm 0,40 ^a
3,44	83,6 ^d	11,20 \pm 0,44 ^d	2,36 \pm 0,21 ^b	4,73 \pm 0,32 ^c	7,22 \pm 0,33 ^a
4,92	62,3 ^c	9,51 \pm 0,31 ^c	2,14 \pm 0,16 ^b	4,16 \pm 0,35 ^b	6,90 \pm 0,24 ^a

Après leur transfert dans des pots contenant de la perlite et arrosés avec les macroéléments WPM et les microéléments MS, 92 % des pousses feuillées enracinées survivent et continuent leur croissance. Leur morphologie externe est tout à fait comparable à celle des plantes obtenues par semis.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Parmi les régulateurs de croissance testés (kinétine, 2ip, zéatine, thidiazuron et BA), la BA s'est avérée la mieux adaptée à la multiplication des bourgeons axillaires de Chêne-liège. Cette cytokinine a été utilisée avec succès par plusieurs auteurs pour la multiplication de cette espèce [1,23]. De même, divers auteurs [2-6,11,25] ont montré qu'elle est indispensable pour une multiplication satisfaisante chez d'autres espèces de Chêne.

L'absence de BA dans le milieu GD [14] de multiplication provoque la nécrose des bourgeons de *Quercus petraea* et *Q. robur* [13].

L'utilisation, pour la première fois chez le Chêne-liège, d'une substance à activité cytokininique, le thidiazuron, a entraîné la diminution du taux de multiplication et la formation d'un cal à la base de l'explant, surtout aux fortes concentrations, ce qui est en accord avec les observations faites sur *Quercus robur* [8]. Vyapari et Khatamian [26] ont montré que l'addition de thidiazuron au milieu WPM de multiplication de *Quercus muehlenbergii* inhibe la formation des bourgeons axillaires. Cependant, cette substance a stimulé la multiplication de bourgeons chez de nombreuses espèces forestières [7].

Une multiplication satisfaisante des bourgeons est assurée par un apport exogène de 2,2 μM de BA. Cette même concentration a été utilisée par Romano *et al.* [22-23]. D'autres auteurs n'ont utilisé que 0,54 μM [1,15]. Nous montrons pour la première fois qu'à plus faible concentration, la BA exerce un effet néfaste sur la vigueur de la tigelle et qu'à concentrations élevées, la vitalité des bourgeons s'affaiblit. Favre et Juncker [11] ont rapporté l'effet négatif d'une concentration élevée de BA chez *Quercus robur*. Ostrolucka et Bezo [19] ont montré qu'à 8,8 μM , la BA favorise la formation de bourgeons anormaux ou le développement d'un cal, ce qui empêche le développement des bourgeons de *Quercus robur* et *Q. virgiliana*.

Pour la première fois, nous montrons que les bourgeons de Chêne-liège s'allongent en présence d'acide gibbérellique, surtout à 1,44 μM . En combinant l'AG₃ et la BA, le nombre de bourgeons par culture ainsi que la longueur des bourgeons augmentent, surtout pour 2,2 μM de cytokininique associée à 1,44 μM d'acide gibbérellique. Cependant, Pevalek-Kozlina [20-21] a prouvé que les bourgeons de *Quercus robur* induits sur le milieu WPM, additionné de 2,2 μM de BA, 2,5 μM d'AIB et 0,3 μM d'AG₃, sont plus courts et avec des petites feuilles comparés à ceux obtenus sur le milieu GD additionné de 0,9 μM de BA seulement.

La BA combinée à des auxines (AIA, AIB ou ANA) s'est avérée défavorable à la multiplication des bourgeons de Chêne-liège comparée à la cytokininique seule, ce qui est contradictoire avec les résultats enregistrés par Manzanera et Pardos [15] qui ont prouvé que la BA (0,54 μM) combinée à une faible concentration d'ANA favorise une meilleure multiplication des bourgeons de *Quercus suber*. De même, Chalupa [6] a observé que l'addition de faibles concentrations d'auxine (AIB ou ANA) n'affecte pas significativement la croissance et la prolifération des bourgeons de *Quercus robur*. Par ailleurs, San-José *et al.* [24], lors de la multiplication des bourgeons de *Quercus robur* et *Q. rubra*, ont trouvé que l'AIA ou l'AIB combinés à la BA donnaient un meilleur développement spécialement pour 5,71 μM d'AIA.

L'élongation des bourgeons de *Quercus suber* est favorisée, pour la première fois, par subculture sur un milieu dépourvu de toute substance de croissance et additionné de 30 g/l de saccharose. La phase d'élongation permet l'obtention de pousses vigoureuses susceptibles d'être plus facilement enracinées.

Dans le cas de *Quercus suber* comme de bien d'autres espèces de Chêne, l'enracinement des pousses feuillées paraît difficile. En accord avec Manzanera et Pardos [15], une auxine s'avère indispensable à la rhizogenèse du Chêne-liège, alors que le taux d'enracinement des pousses feuillées de *Quercus robur* est seulement réduit en absence d'auxine [16].

Deux méthodes ont été employées : culture sur un milieu contenant de l'auxine ou trempage de la base des bourgeons allongés dans une solution auxinique, puis achèvement de la rhizogenèse par transfert sur un milieu sans régulateur de croissance [15].

Pour la première méthode, nous avons testé l'effet de trois auxines (AIB, ANA et 2,4-D) et trouvé l'AIB la mieux adaptée pour une rhizogenèse en terme de pourcentage ainsi que de vigueur des racines. Nos résultats concordent avec ceux obtenus chez le Chêne-liège par Romano *et al.* [22]. Manzanera et Pardos [15] ont prouvé que l'AIB est plus efficace que l'ANA pour l'induction de la rhizogenèse de *Quercus suber* aussi bien chez un matériel jeune qu'adulte. De même, pour l'enracinement de *Quercus robur*, Pevalék-Kozlina [20-21] a montré que l'AIB est bien meilleur que l'AIA. La concentration d'AIB affecte significativement le pourcentage d'enracinement ainsi que le nombre moyen de racines. Ces mêmes observations ont été rapportées par Manzanera et Pardos [15].

Pour la méthode de trempage de la base des bourgeons, le maximum d'enracinement a été obtenu, pour la première fois, en présence de 3,44 mM d'AIB. À 4,92 mM, le taux d'enracinement reste important. Manzanera et Pardos [15] ont utilisé cette concentration pour induire la rhizogenèse chez la même espèce. À 2,46 mM d'AIB, nous avons observé que le taux d'enracinement diminue. Cependant, Romano *et al.* [22] ont réussi à enraciner un pourcentage élevé de bourgeons de Chêne-liège dans ces conditions.

L'acclimatation des plantules enracinées constitue le problème majeur à la réussite de la régénération de *Quercus suber* [9]. Le taux de survie des pousses enracinées après transfert au sol est faible [15]. Cependant, dans nos essais, nous avons pu maintenir la survie, sur un substrat horticole, des plantules enracinées et nous avons observé l'importance des facteurs environnementaux, en particulier l'humidité relative. Le maintien d'une humidité relative élevée au début de

l'acclimatation suivi d'une diminution progressive de son degré permet l'obtention de plantes vigoureuses capables de continuer une croissance normale.

RÉFÉRENCES

- 1 - Belaizi (M.), Boxus (P.) - *In vitro* shoot multiplication of cork oak (*Quercus suber* L.). Influence of different carbohydrates. - *Bull. Rech. Agron. Gembloux*, 1995, **30**(1-2), 39-46.
- 2 - Bennett (L.K.) Davies (F.T.Jr.) - *In vitro* propagation of *Quercus shumardii* seedlings. - *HortScience*, 1986, **21**(4), 1045-1047.
- 3 - Chalupa (V.) - *In vitro* propagation of some broad-leaved forest trees. - *Commun. Inst. For. Cech.*, 1979, **11**, 159-170.
- 4 - Chalupa (V.) - Clonal propagation of broad-leaved forest trees *in vitro*. - *Commun. Inst. For. Cech.*, 1981, **12**, 255-271.
- 5 - Chalupa (V.) - Micropropagation of conifer and broad-leaved forest trees. - *Commun. Inst. For. Cech.*, 1983, **13**, 7-39.
- 6 - Chalupa (V.) - *In vitro* propagation of oak (*Quercus robur* L.) and Linden (*Tilia cordata* Mill.). - *Biol. Plant.*, 1984, **26**(5), 374-377.
- 7 - Chalupa (V.) - European Hordwoods. - *In: Cell and Tissue Culture in Forestry*, vol 3, (Bonga (J.M.), Durzan (D.J.), eds.), Dordrecht : Martinus Nijhoff Publishers, 1987, p. 224-246.
- 8 - Chalupa (V.) - Large scale micropropagation of *Quercus robur* L. using adenine-type cytokinins and thidiazuron to stimulate shoot proliferation. - *Biol. Plant.*, 1988, **30**(6), 414-421.
- 9 - Deidda (P.), Azzena (M.), Coinu (G.) - *In vitro* plantlet regeneration from *Quercus suber* L. seedlings. - *Acta Hortic.*, 1988, (227), 393-395.
- 10 - El Kbiach (M.L.), Lamarti (A.), Abdali (A.), Badoc (A.) - Culture *in vitro* des bourgeons axillaires de chêne-liège (*Quercus suber* L.) I - Influence des cytokinines sur l'organogenèse et la callogenèse de nœuds de plantules. - *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 2002, **141**(1-4), 73-88.
- 11 - Favre (J.M.), Juncker (B.) - *In vitro* growth of buds taken from seedlings and adult plant material in *Quercus robur* L. - *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 1987, **8**, 49-60.

- 12 - Gautheret (R.J.) - *La culture des tissus végétaux*. Techniques et réalisations. Paris : Masson et Cie, 1959, 863 p.
- 13 - Gebhardt (K.), Fruhwacht-Wilms (U.), Weisgerber (H.) - Micropropagation and restricted-growth storage of adult oak genotypes. - *Ann. Sci. For.*, 1993, **50**(suppl 1), 323-329.
- 14 - Gresshoff (P.M.), Doy (C.H.) - Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (Tomato). - *Planta*, 1972, **107**, 161-170.
- 15 - Manzanera (J.A.), Pardos (J.A.) - Micropropagation of juvenile and adult *Quercus suber* L. - *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 1990, **21**(1), 1-8.
- 16 - Marks (T.R.) - The role of the shoot apex in controlling rhizogenesis *in vitro*. - *Plant Growth Regul.*, 1996, **20**(1), 57-60.
- 17 - McCown (B.H.), Lloyd (G.) - Woody plant medium (wpm) - A mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species. - *HortScience*, 1981, **16**(3), 453.
- 18 - Murashige (T.), Skoog (F.) - A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue culture. - *Physiol. Plant.*, 1962, **15**(3), 473-497.
- 19 - Ostrolucka (M.G.), Bezo (M.) - Utilization of meristem cultures in propagation of oak (*Quercus* sp.). - *Genet. Pol.*, 1994, **35**(3), 161-169.
- 20 - Pevalek-Kozlina (B.) - Microclonal propagation of common oak (*Quercus robur* L.). - *Acta Biol. (Zagreb)*, 1991a, **16**(1), 1-7.
- 21 - Pevalek-Kozlina (B.) - Clonal propagation of common oak (*Quercus robur* L.). - *Acta Hortic.*, 1991b, (289), 143-144.
- 22 - Romano (A.), Noronha (C.), Martins-Loução (M.A.) - Influence of growth regulators on shoot proliferation in *Quercus suber* L. - *Ann. Bot. (London)*, 1992, **70**(6), 531-536.
- 23 - Romano (A.), Noronha (C.), Martins-Loução (M.A.) - Role of carbohydrates in micropropagation of cork oak. - *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 1995, **40**(2), 159-167.
- 24 - San-José (M.C.), Vieitez (A.M.), Vieitez (E.) - Establecimiento y multiplicación *in vitro* de brotes del género *Quercus*. - *Phyton (Buenos Aires)*, 1985, **45**(1), 31-40.
- 25 - Vieitez (A.M.), San-José (M.C.), Vieitez (E.) - *In vitro* plantlet regeneration from juvenile and mature *Quercus robur* L. - *J. Hort. Sci.*, 1985, **60**(1), 99-106.
- 26 - Vyapari (S.), Khatamian (H.) - Axillary shoot regeneration in chinkapin oak. - *HortScience*, 1994, **29**(5), 515.

ABSTRACT

In vitro culture of axillary buds of cork oak (*Quercus suber* L.)

II - Influence of growth regulators on multiplication and rhizogenesis

The influence of cytokinins and thidiazuron, a cytokinin-like substance, alone or combined with GA₃ or auxins, was studied on cork oak axillary bud multiplication. The effect of different auxins was also studied on rooting phase.

In WPM culture medium supplemented with MS micronutrients and vitamins, 2,2 μ M BA combined with 1,44 μ M GA₃ improved multiplication. On the other hand, BA associated with other growth regulators did not allow an improvement of proliferation rate. The rooting phase was important in the presence of IBA.

The rooted plants were potted on horticultural substrate with a high relative humidity.

Key-words: axillary bud, cork oak, *in vitro* culture, micropropagation, regeneration.
