

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

III - Influence de différents hydrates de carbone

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

La régénération in vitro de plantes entières à partir des bourgeons axillaires du Chêne-liège a été obtenue.

L'influence de la source de carbone (saccharose, glucose, fructose, mannitol et sorbitol) a été étudiée sur l'induction et la multiplication des bourgeons.

Le saccharose à 20 g/l favorise le mieux la caulogénèse sur le milieu WPM, additionné des microéléments et du mélange vitaminique MS et contenant 4,5 µM de BA. Le saccharose donne encore les meilleurs résultats, à 30 g/l, lors de la phase de multiplication sur le même milieu contenant 2,2 µM de BA et 1,44 µM d'AG₃. Le mannitol ne stimule pas le débourement. Le fructose et le sorbitol ne permettent pas une amélioration du taux de caulogénèse ni de multiplication. Le saccharose à 30 g/l conduit à un enracinement satisfaisant des pousses.

(*) *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, 146, rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex. jbtalenc@club-internet.fr*

INTRODUCTION

L'apport continu d'hydrates de carbone en culture *in vitro* est nécessaire pour compenser l'activité photosynthétique des tissus réduite à cause du faible développement des feuilles, de l'échange limité de gaz et de l'humidité relative élevée [11]. L'initiation et la croissance des racines, qui demandent un potentiel énergétique élevé, dépendent principalement des hydrates de carbone [24]. Les hydrates de carbone sont également des agents osmotiques [24].

En dépit de l'utilisation marquée du saccharose et des succès obtenus, d'autres sucres ont été également décrits comme source de carbone dans la micropropagation des espèces ligneuses. Le sorbitol s'est avéré efficace pour diverses Rosacées [6,13,20]. Des sucres réducteurs tels que le glucose et le fructose, normalement non transportés dans les tubes criblés, peuvent cependant être aisément assimilés et métabolisés chez plusieurs espèces ligneuses et constituer une meilleure source de carbone. Le rôle du fructose dans les cultures aseptiques est controversé : il a donné de bons résultats pour la culture de *Morus alba* [17], *Castanea sativa* [4] et *Malus pumila* M.9 [27], mais est inapproprié pour *Malus Jork 9* [15] et moins efficace pour *Syringa chinensis* [27] et *Prunus cerasus* [3]. Le glucose est une source de carbone efficace pour la culture de tissus pour le genre *Alnus* [25,27], pour *Potentilla fruticosa* et *Ficus lyrata* [26] et *Quercus robur* [9].

La croissance des explants de Chêne-liège a été généralement obtenue avec le saccharose [2,12,18,21-22].

Puisque d'autres sucres se sont trouvés être plus efficaces que le saccharose chez certaines plantes ligneuses, diverses sources de carbone ont été testées sur l'induction et la prolifération des bourgeons *in vitro* de *Quercus suber*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les glands proviennent d'un pied de Chêne-liège élite et ont été fournis par le Centre de Conservation des Semences d'Ain Rami. Ils ont été récoltés en octobre 1999 et stockés dans des sachets de toile noire à l'obscurité et à 4 °C.

Après imbibition 48 heures à l'obscurité, ils sont mis à germer dans des sachets de toile ouverts renfermant de la tourbe stérile. Les sachets sont

placés dans une salle climatisée 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 [8] additionnée du Fe-EDTA du milieu MS de Murashige et Skoog [16] et traitées par une solution de Benlate à 2 %. Après 3 mois, les plantules mesurent environ 40 centimètres de longueur. Des nœuds de 1 cm ont été prélevés de la partie médiane des plantules à 10 cm de l'apex et 10 cm de la base. Les pétioles sont sectionnés à quelques millimètres de la tige afin que les bourgeons axillaires ne soient pas abîmés au cours de la désinfection [7].

Pour la phase d'initiation, les nœuds lavés et stérilisés 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 milieu de base est constitué des macroéléments WPM de McCown et Lloyd [14], des microéléments et vitamines MS, de 100 mg/l de méso-inositol et 0,7 % d'agar, additionné de 4,5 μ M de BA (6-benzyladénine). Le saccharose, le glucose, le fructose, le mannitol et le sorbitol ont été testés à différentes concentrations (10, 20, 30 ou 40 g/l). Le saccharose a été testé seul ou associé au mannitol ou au sorbitol.

Pour la phase de multiplication, les bourgeons induits sont transférés dans des fioles de 125 ml fermées hermétiquement par un couvercle contenant environ 30 ml de milieu de base additionné de 2,2 μ M de BA et d'1,44 μ M d'acide gibbérellique (AG₃). Le saccharose, le glucose, le fructose et le sorbitol ont été testés à 20, 30 et 40 g/l.

Dans une phase d'allongement, les bourgeons sont transférés dans des fioles de 125 ml sur le milieu de base dénué de phytohormones additionné de 30 g de saccharose.

Pour la rhizogenèse, la partie basale des pousses allongées est trempée pendant 2 minutes dans 3,44 mM d'acide indole 3-butyrique (AIB). Les pousses feuillées sont par la suite cultivées dans des tubes à essais sur le milieu de base dont les macroéléments sont dilués de moitié, dénué de phytohormone et additionné de saccharose à différentes concentrations (15, 20, 30 et 40 g/l).

Le pH des milieux est ajusté à 5,5-5,8 avant stérilisation vingt minutes à 120 °C. Après trente 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 2 fois par semaine avec une solution non stérilisée renfermant les macroéléments WPM et les microéléments MS.

Les cultures sont placées dans une chambre climatisée à 26 °C pourvue de tubes "Phillips - 40 W" assurant un éclairage de 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 l'analyse de variance (test ANOVA).

RÉSULTATS

L'effet des différents sucres (saccharose, glucose, fructose, mannitol et sorbitol), seuls ou en association, sur l'induction des bourgeons axillaires et le degré de chlorose des explants est reporté dans le Tableau I.

Le saccharose à 20 g/l donne les meilleurs résultats. Le pourcentage de caulogénèse est élevé (95,2%) et les bourgeons sont allongés (0,51 cm). À plus forte concentration, le nombre de bourgeons qui se développent et la longueur moyenne des bourgeons néoformés diminuent. Une faible teneur en saccharose (10 g/l) ralentit leur croissance et accentue le jaunissement des feuilles.

Le glucose stimule l'induction du bourgeonnement surtout à 10 et 20 g/l (76,2 et 77,3 % respectivement). Au-delà, le pourcentage de caulogénèse diminue. La longueur moyenne des bourgeons n'est pas influencée par la variation de la concentration en glucose et est faible comparée à celle obtenue avec le saccharose. Les bourgeons développés présentent des feuilles de couleur rose et qui tendent à se nécroser après la troisième semaine de culture.

Le fructose donne des pourcentages d'explants caulogènes faibles comparés à ceux obtenus avec le saccharose. Le maximum de débourrement (45,4 %) est enregistré à 20 g/l. La longueur moyenne des bourgeons induits est faible (0,16 cm au maximum) et les feuilles, généralement de couleur vert foncé, sont étroites.

Le mannitol s'est avéré inefficace pour le débourrement des bourgeons axillaires du Chêne-liège. Toutefois, s'il est combiné avec le saccharose, le pourcentage de bourgeonnement devient important, surtout à 20 g/l du mélange (1 :1) où on obtient 80,9 % d'explants débouffés avec une longueur moyenne de 0,46 cm. Le jaunissement des feuilles est plus accentué avec 10 g/l du mélange.

Le sorbitol s'est montré défavorable à l'induction des bourgeons. Le maximum de débourrement (47,7 %) est observé à 20 g/l avec une longueur moyenne de 0,2 cm. Les feuilles sont en général petites et de couleur verte.

Tableau I :

Effet de divers sucres seuls ou en association sur le développement de bourgeons axillaires issus de nœuds de jeunes plantules de Chêne-liège après un mois de culture sur le milieu d'induction.

Ce dernier renferme les macroéléments WPM, les microéléments MS et 4,5 μ M de BA (n = 30, 3 répétitions). Les valeurs suivies d'une même lettre ne présentent pas de variation significative à 5 %.

Sucre	(g/l)	Pourcentage d'explants caulogènes	Nombre moyen de bourgeons par explant	Longueur moyenne des bourgeons (cm)
Saccharose	10	78,3 ^f	1,31 ± 0,19 ^b	0,35 ± 0,02 ^b
	20	95,2 ^g	1,56 ± 0,24 ^d	0,51 ± 0,04 ^d
	30	87,5 ^{fg}	1,40 ± 0,22 ^c	0,44 ± 0,02 ^c
	40	54,2 ^d	1,26 ± 0,13 ^{ab}	0,31 ± 0,01 ^b
Glucose	10	76,2 ^f	1,30 ± 0,21 ^b	0,22 ± 0,02 ^a
	20	77,3 ^f	1,24 ± 0,18 ^{ab}	0,23 ± 0,01 ^a
	30	54,2 ^d	1,22 ± 0,15 ^{ab}	0,20 ± 0,02 ^a
	40	39,1 ^c	1,12 ± 0,10 ^a	0,22 ± 0,01 ^a
Fructose	10	40,0 ^c	1,16 ± 0,10 ^a	0,15 ± 0,02 ^a
	20	45,4 ^{cd}	1,15 ± 0,11 ^a	0,16 ± 0,01 ^a
	30	40,1 ^c	1,13 ± 0,10 ^a	0,12 ± 0,01 ^a
	40	9,1 ^b	1,10 ± 0,04 ^a	0,10 ± 0,01 ^a
Mannitol	10	0,0 ^a	—	—
	20	0,0 ^a	—	—
	30	0,0 ^a	—	—
	40	0,0 ^a	—	—
Sorbitol	10	30,4 ^c	1,12 ± 0,07 ^a	0,16 ± 0,01 ^a
	20	47,7 ^{cd}	1,14 ± 0,11 ^a	0,20 ± 0,02 ^a
	30	13,1 ^b	1,10 ± 0,06 ^a	0,14 ± 0,01 ^a
	40	12,2 ^b	1,10 ± 0,06 ^a	0,11 ± 0,01 ^a
Saccharose + Mannitol (1:1)	10	77,3 ^f	1,12 ± 0,08 ^a	0,39 ± 0,01 ^{bc}
	20	80,9 ^f	1,26 ± 0,15 ^{ab}	0,46 ± 0,03 ^c
	30	68,2 ^e	1,18 ± 0,11 ^a	0,30 ± 0,02 ^b
Saccharose + Sorbitol (1:1)	10	52,4 ^d	1,15 ± 0,10 ^a	0,36 ± 0,03 ^b
	20	90,5 ^{fg}	1,30 ± 0,16 ^b	0,41 ± 0,02 ^c
	30	66,7 ^e	1,16 ± 0,10 ^a	0,39 ± 0,02 ^{bc}

La combinaison du sorbitol avec le saccharose améliore nettement la caulogénèse, maximale (90,5 %) à 20 g/l du mélange (1:1) avec une longueur moyenne des bourgeons de 0,41 cm. Mais aucune des concentrations en mélange ne permet la réduction du degré de chlorose.

Les résultats se rapportant à l'influence des différents sucres sur la multiplication des bourgeons axillaires sont résumés dans le Tableau II.

En présence de 30 g/l de saccharose, le taux de multiplication des bourgeons est maximal (82,6 %), de même que le nombre moyen de bourgeons par culture (5,78) et leur longueur moyenne (1,82 cm). Les bourgeons présentent des feuilles chlorophylliennes de couleur vert foncé. À 20 g/l, les feuilles développées sont vertes et celles du sommet plus ou moins roses. L'augmentation de la concentration (40 g/l) s'accompagne d'un jaunissement marqué des feuilles.

Le glucose s'est avéré satisfaisant à la multiplication des bourgeons axillaires surtout à 30 g/l. Les bourgeons développés sont très compacts de sorte qu'il est difficile de les séparer pour les subcultures ultérieures. Les feuilles sont vert foncé, parfois roses, surtout pour les apicales. À 20 g/l, le nombre moyen de bourgeons par culture (2,31) diminue et leur longueur moyenne (1,1 cm) reste pratiquement inchangée. Les feuilles sont généralement vertes. À 40 g/l, le nombre moyen de bourgeons par culture est faible (2,74) et les bourgeons développés sont compacts avec des feuilles généralement roses.

Le fructose s'est montré défavorable à la multiplication des bourgeons axillaires. À 30 g/l on enregistre les valeurs les plus élevées pour le taux de multiplication (29,4 %), le nombre moyen de bourgeons par culture (1,76) et la longueur moyenne (0,98 cm). Pour toutes les concentrations en fructose utilisées, le degré de chlorose est très accentué et les feuilles se nécrosent après la troisième semaine de culture.

Le sorbitol est également peu propice à la multiplication des bourgeons axillaires. Comme pour les autres sucres, il présente une activité maximale à 30 g/l. Quelle que soit la concentration utilisée, les feuilles jaunissent dès la deuxième semaine de culture.

Cherchant, après la phase d'allongement, à enraciner les pousses feuillées et à maintenir leur vigueur sur un milieu sans régulateur de croissance, différentes concentrations de saccharose (15 ; 20 ; 30 et 40 g/l) ont été testées. Les explants ont été préalablement trempés pendant deux minutes dans une solution aqueuse d'AIB à 3,44 mM. Les résultats sont rapportés dans le Tableau III.

Tableau II :

Effet de divers sucres sur la multiplication des bourgeons axillaires de Chêne-liège après un mois de culture sur un milieu renfermant les macroéléments WPM, les microéléments MS, 2,2 μ M de BA et 1,44 μ M d'AG₃ (n = 30, 3 répétitions).

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

Sucre (g/l)		Pourcentage de multiplication	Nombre moyen de bourgeons	Longueur moyenne des bourgeons (cm)
Saccharose	20	63,2 ^d	4,25 ± 0,25 ^e	1,41 ± 0,03 ^c
	30	82,6 ^e	5,78 ± 0,20 ^f	1,82 ± 0,04 ^d
	40	54,8 ^{cd}	3,80 ± 0,23 ^d	1,22 ± 0,02 ^b
Glucose	20	48,3 ^c	2,31 ± 0,15 ^{bc}	1,10 ± 0,01 ^{ab}
	30	77,5 ^e	3,66 ± 0,25 ^d	1,33 ± 0,02 ^{bc}
	40	56,2 ^{cd}	2,74 ± 0,17 ^c	1,21 ± 0,02 ^b
Fructose	20	23,1 ^b	1,65 ± 0,10 ^b	0,95 ± 0,01 ^{ab}
	30	29,4 ^b	1,76 ± 0,12 ^b	0,98 ± 0,01 ^{ab}
	40	13,8 ^a	1,12 ± 0,15 ^a	0,61 ± 0,01 ^a
Sorbitol	20	14,3 ^a	1,20 ± 0,10 ^a	0,82 ± 0,02 ^{ab}
	30	16,2 ^a	1,41 ± 0,13 ^{ab}	0,90 ± 0,02 ^{ab}
	40	11,6 ^a	1,16 ± 0,11 ^a	0,46 ± 0,01 ^a

La concentration initiale (30 g/l) donne le meilleur taux de rhizogenèse (81,8 %). Les pousses feuillées présentent alors un bon état foliaire, les racines sont nombreuses (4,78), bien développées et atteignent 7,24 cm. La diminution de la concentration à 15 et 20 g/l entraîne une diminution du taux de rhizogenèse, du nombre moyen de racines ainsi que de leur longueur. Les pousses feuillées jaunissent après 20 jours de culture. À 40 g/l, le pourcentage d'enracinement est faible (43,2 %), mais les racines sont longues (7,41 cm). À cette dose, une chute des feuilles intervient et la survie des petites plantes lors de leur transfert en pots est compromise.

92 % des pousses feuillées enracinées survivent et continuent leur croissance après transfert dans des pots contenant de la perlite et arrosés avec une solution contenant les macroéléments WPM et les microéléments MS.

Tableau III :

**Effet du saccharose sur l'enracinement des pousses feuillées de
Chêne-liège après 4 semaines de culture sur un milieu dénué de
phytohormone renfermant les macroéléments WPM dilués de moitié et
les microéléments MS.**

Les pousses ont préalablement subi un trempage de deux minutes dans une solution d'AIB à 3,44 mM (n = 30, 3 répétitions). Les valeurs suivies d'une même lettre ne présentent pas de variation significative à 5 %.

Saccharose (g/l)	% d'enra- cinement	Nombre moyen de feuilles	Longueur moyenne de la partie aérienne (cm)	Nombre moyen de racines	Longueur moyenne des racines (cm)
15	46,1 ^a	7,1 ± 0,30 ^b	2,1 ± 0,19 ^a	3,90 ± 0,31 ^{ab}	4,90 ± 0,26 ^a
20	60,3 ^b	9,7 ± 0,36 ^c	2,1 ± 0,23 ^a	4,32 ± 0,28 ^b	5,14 ± 0,32 ^a
30	81,8 ^c	11,2 ± 0,64 ^d	2,3 ± 0,17 ^a	4,78 ± 0,58 ^c	7,24 ± 0,36 ^b
40	43,2 ^a	4,3 ± 0,51 ^a	2,2 ± 0,22 ^a	3,43 ± 0,33 ^a	7,41 ± 0,34 ^b

DISCUSSION ET CONCLUSION

Le Chêne-liège montre des exigences très précises en sucres et constitue un bon matériel pour illustrer les actions inhibitrices des teneurs trop importantes sur le développement des bourgeons ou leur vitalité [5].

L'effet du fructose, du mannitol et du sorbitol sur l'induction de bourgeons axillaires à partir de nœuds de jeunes plantules de *Quercus suber* est étudié pour la première fois. Ces sucres s'avèrent défavorables pour la caulogénèse. Le glucose a donné de bons résultats surtout à 1 et 2 % (76,2 et 77,3 % respectivement), mais une nécrose commence à apparaître après la troisième semaine de culture.

D'après les études antérieures sur le Chêne-liège, le saccharose s'est avéré la source de carbone la plus favorable pour un débourrement optimum des bourgeons [1,12,18]. Dans nos essais, l'amélioration de la vigueur des bourgeons de Chêne-liège, corrélative à la diminution à 20 g/l de la teneur en sucre, est plus nette lorsque le saccharose est la source carbonée plutôt

que le glucose. Le saccharose à 20 g/l apparaît donc comme une source bénéfique au bourgeonnement axillaire (95,2 %). D'ailleurs, cette concentration a été employée par d'autres auteurs dans l'initiation de la caulogénèse chez le Chêne-liège [21-23].

De même, il s'est avéré que le saccharose est le sucre le plus adéquat pour une multiplication intense des bourgeons de Chêne-liège, surtout à la concentration de 30 g/l où la vigueur des bourgeons est meilleure et où aucun signe de chlorose n'est enregistré. Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus par Romano *et al.* [23] qui ont obtenu un taux de multiplication, un nombre moyen et une longueur moyenne de bourgeons de Chêne-liège élevés.

L'utilisation du glucose comme source carbonée a donné un taux de multiplication satisfaisant surtout à la concentration de 30 g/l, mais les bourgeons ainsi formés sont compacts et très difficiles à séparer pour des subcultures ultérieures, ce qui est en accord avec les observations faites par Romano *et al.* [23]. Cependant, Belaizi et Boxus [1] ont montré que 30 g/l de glucose favorisent un pourcentage de multiplication important avec un nombre moyen de bourgeons de Chêne-liège ainsi qu'une vigueur meilleurs comparés à ceux obtenus en présence de saccharose. Le glucose s'est montré également meilleur que le saccharose lors de la multiplication des bourgeons de *Quercus robur* [9].

Bien que le sorbitol soit prouvé être une meilleure source d'énergie pour différents génotypes de Pommiers [6,19-20], il s'est montré inhibiteur pour la multiplication des bourgeons axillaires du Chêne-liège.

De même, l'utilisation du fructose s'est avérée défavorable pour la multiplication de *Quercus suber*, en accord avec les résultats obtenus par divers auteurs [1,23].

Haissing [10] et Thorpe [24] ont montré chez quelques espèces ligneuses que l'initiation de la rhizogénèse est un processus qui nécessite beaucoup d'énergie et utilisent le saccharose comme source de carbone. Pour le Chêne-liège, la présence d'une source de carbone paraît indispensable [12].

Nous avons testé plusieurs concentrations de saccharose et c'est la première fois qu'on obtient un maximum de rhizogénèse en présence de 30 g/l. Nous avons constaté que l'enracinement diminue pour des concentrations inférieures et supérieures. Cependant, Pardos [18] a montré que la diminution de la concentration en saccharose ne modifie pas significativement l'enracinement des bourgeons de Chêne-liège. De même, Romano *et al.* [23] ont observé que le pourcentage d'enracinement n'est pas affecté par l'augmentation de la concentration en sucres et que le maximum

de rhizogénèse est obtenu après 15 jours de traitement en présence de 30, 40 ou 60 g/l de glucose ou 60 g/l de saccharose. Manzanera et Pardos [12] ont montré que le pourcentage de bourgeons enracinés ainsi que le nombre moyen de racines augmentent avec la concentration en saccharose, mais que le maximum dépend des clones.

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 - Bellarosa (R.) - *In vitro* culture of *Quercus suber* L. embryos. - In Colloque international sur la culture *in vitro* des essences forestières, Fontainebleau, 31 août-4 septembre, 1981, AFOCEL, p 119-125.
- 3 - Borkowska (B.), Szczerba (J.) - Influence of different carbon sources on invertase activity and growth of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) shoot cultures. - *J. Exp. Bot.*, 1991, **42**(240), 911-915.
- 4 - Chauvin (J.E.), Salesses (G.) - Effet du fructose sur la micropropagation du châtaignier *Castanea* sp. - *C. R. Acad. Sci., Ser. 3*, 1988, **306**(5), 207-212.
- 5 - Cheng (T.Y.), Voqui (T.H.) - Regeneration of Douglas fir plantlets through tissue cultures. - *Science*, 1977, **198**(4314), 306-307.
- 6 - Coffin (R.), Taper (C.D.), Chong (C.) - Sorbitol and sucrose as carbon source for callus culture of some species of the Rosaceae. - *Can. J. Bot.*, 1976, **54**(7), 547-551.
- 7 - 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'organogénèse et la callogénèse de nœuds de plantules. - *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 2002, **141**(1-4), 73-88.
- 8 - Gautheret (R.J.) - *La culture des tissus végétaux*. Techniques et réalisations. Paris : Masson et Cie, 1959, 863 p.
- 9 - Gruselle (R.) - Influence of different carbon sources on *in vitro* multiplication of *Quercus robur* L. - In *COST 87*. Woody Plant Group, 1994.
- 10 - Haissing (B.E.) - Origins of adventitious roots. - *N. Z. J. For. Sci.*, 1974, **4**, 299-310.

- 11 - Kozai (T.) - Micropropagation under photoautotrophic conditions. - In Debergh (P.C.), Zimmerman (R.H.) *Micropropagation Technology and Application*. Dordrecht : Kluwer Academic Publishers, 1991, p 447-469.
- 12 - Manzanera (J.A.), Pardos (J.A.) - Micropropagation of juvenile and adult *Quercus suber* L. - *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 1990, **21**(1), 1-8.
- 13 - Marino (G.), Bertazza (G.), Magnanini (E.), Altan (A.D.) - Comparative effects of sorbitol and sucrose as main carbon energy sources in micropropagation of apricot. - *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 1993, **34**(3), 235-244.
- 14 - McCown (B.H.), Lloyd (G.) - Woody plant medium (wpm) - A mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species. - *HortScience*, 1981, **16**(3), 453.
- 15 - Moncousin (C.), Ribaux (M.), O'Rourke (J.), Gavillet (S.) - Effects of type of carbohydrate during proliferation and rooting of microcuttings of *Malus Jork 9*. - *Agronomie*, 1992, **12**(10), 775-781.
- 16 - Murashige (T.), Skoog (F.) - A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue culture. - *Physiol. Plant.*, 1962, **15**(3), 473-497.
- 17 - Oka (S.), Ohyama (K.) - Mulberry (*Morus alba* L.). - *Biotechnol. Agric. For., Trees I*, 1986, 384-392.
- 18 - Pardos (J.A.) - *In vitro* plants formation from stem pieces of *Quercus suber* L. - *Colloq. Int. Cult. in Vitro Essences For., Fontainebleau, 31 août - 4 septembre 1981*, AFOCEL, 1981, 186-190.
- 19 - Pua (E.C.), Chong (C.) - Requirement for sorbitol (D-glucitol) as carbon source for *in vitro* propagation of *Malus robusta* No. 5. - *Can. J. Bot.*, 1984, **62**(7), 1545-1549.
- 20 - Pua (E.C.), Chong (C.) - Regulation of *in vitro* shoot and root regeneration in 'Macspur' apple by sorbitol (D-glucitol) and related carbon sources. - *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 1985, **110**(5), 705-709.
- 21 - Romano (A.), Martins-Loução (M.A.) - Micropropagation of mature cork-oak (*Quercus suber* L.): Establishment problems. - *Scientia Gerund.*, 1992, **18**, 17-27.
- 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 - Thorpe (T.A.) - Carbohydrate utilization and metabolism. - In Bonga (J.M.), Durzan (D.J.) *Tissue Culture in Forestry*. London : Martinus Nijhoff Publishers, 1982, p 325-368.
- 25 - Tremblay (F.M.), Lalonde (M.) - Requirements for *in vitro* propagation of seven nitrogen-fixing *Alnus* species. - *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 1984, **3**(3), 189-199.
- 26 - Wainwright (H.), Scrace (J.) - Influence of *in vitro* preconditioning with carbohydrates during the rooting of microcuttings on *in vivo* establishment. - *Scientia Hortic. (Amsterdam)*, 1989, **38**(3-4), 261-267.
- 27 - Welander (M.), Welander (N.T.), Brackman (A.S.) - Regulation of *in vitro* shoot multiplication in *Syringa*, *Alnus* and *Malus* by different carbon sources. - *J. Hortic. Sci.*, 1989, **64**(3), 361-366.

ABSTRACT

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

III - Influence of different carbohydrates

The *in vitro* plant regeneration from cork oak axillary buds was tackled.

The influence of carbon sources (sucrose, glucose, fructose, mannitol and sorbitol) was studied on induction and shoot multiplication.

In WPM culture medium supplemented with MS micronutrients and vitamins and containing 4,5 μ M BA, 20 g/l sucrose improved caulogenesis. 30 g/l sucrose was the most effective during proliferation and rooting phases. Mannitol did not stimulate bud induction. Fructose and sorbitol doses did not allow an improvement of the rate of shoot induction and multiplication.

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