

Effets du type et de la position de l'explant sur l'induction de cals chez le gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus)

F. Haouala^{1*}, Nadia Farhat² & L. Chabchoub³

Keywords: Gerbera- Callus- Leaf- Floral peduncle- Tunisia

Résumé

La callogénèse chez le gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus 'Fredigor') est induite à partir de fragments de feuilles ou de segments de pédoncules floraux sur un milieu contenant du 2,4-D 1 mg.l⁻¹ et de la BA 1 mg.l⁻¹. Le taux de callogénèse est supérieur pour les explants foliaires. L'endroit de prélèvement de l'explant sur l'organe influe ce taux qui est plus élevé pour les explants apicaux. Pour les deux types d'explant, les cals présentent une bonne croissance, sont compacts, noduleux et crémeux uniquement sur les milieux de culture contenant une auxine (2,4-D) et une cytokinine (BA ou kinétine). La masse de matière fraîche des cals dépend du milieu de callogénèse, du type et de la position de l'explant.

Summary

Effects of Explant Kind and Position on Calli Induction in Gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus)

Callogenesis in gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus 'Fredigor') was successfully induced from leaves and floral peduncles on a medium containing 1 mg.l⁻¹ 2,4-D and 1 mg.l⁻¹ BA. Explant source and position had clear effects on callogenesis rate. This was higher for leaf explants and apical positions. Calli growth was good for the two kinds of explants. Calli were compact, nodulous and creamy only on media containing auxin (2,4-D) and cytokinin (BA or kinetin). Fresh weight of calli depends of callogenesis medium, explants source and position.

Introduction

Le gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus) est une espèce florale, originaire d'Afrique du Sud et d'Asie, très appréciée pour la qualité de ses capitules et utilisée pour la fleur coupée et les potées fleuries. Elle présente actuellement un important intérêt commercial et est cultivée partout dans le monde. La multiplication du gerbera par les méthodes conventionnelles est confrontée à de nombreux problèmes, notamment phytosanitaires. En effet, cette espèce peut être attaquée par plusieurs maladies particulièrement *Phytophthora cryptogea*. De plus, la multiplication végétative traditionnelle par bouturage ou par division de touffes est lente et se fait à un taux assez faible (12). La multiplication sexuée reste limitée en raison d'une faculté germinative courte des graines (1 à 2 mois) (14), d'une forte hétérozygotie et du temps assez long que la plante met pour fleurir. D'autre part, la variabilité génétique chez le genre *Gerbera* étant relativement limitée, le potentiel d'obtention de nouvelles couleurs ou de résistance aux stress biotiques ou abiotiques est également faible (9). Ainsi, la régénération de bourgeons adventifs à partir de cals peut être exploitée à la fois pour la multiplication végétative de type conforme de cette espèce et pour l'obtention d'une variabilité génétique pouvant aboutir à un matériel végétal nouveau. Les techniques de mise en culture, de multiplication et d'enracinement

ont été décrites par plusieurs auteurs (4, 5, 6, 8, 12) et l'activité callogène peut avoir lieu à partir de divers types d'explants: feuilles (1, 3, 10), pétales (2) ou fragments de capitule (11, 13).

L'objectif du présent travail est d'étudier la callogénèse chez le gerbera à partir d'explants foliaires et pédonculaires prélevés à différentes positions sur ces organes.

Matériel et méthodes

L'étude porte sur le clone de gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus) 'Fredigor'. Les explants sont prélevés à partir de feuilles et de pédoncules floraux vigoureux présentant un état sanitaire sain, sans nécroses, et prélevés sur des plantes-mères cultivées sous abri-serre plastique. La désinfection des explants est faite d'abord par trempage dans une solution d'alcool 90° pendant 5 minutes puis transférés dans une solution de chlorure de mercure pendant 5 minutes. Les explants sont ensuite trempés dans l'eau de javel pendant 15 minutes puis rincés 3 fois à l'eau distillée stérilisée. Le milieu de culture est celui de Murashige et Skoog (MS) (7) additionné de différentes hormones de croissance de façon à avoir les milieux de callogénèse suivants:

M1= milieu MS

M2= milieu MS + 2,4-D 1 mg.l⁻¹

¹Département des Sciences Horticoles et du Paysage, Institut Supérieur Agronomique 4042 Chott Mariem, Sousse, Tunisie.

²Ministère de l'Agriculture et des Ressources Hydrauliques, 1002 Tunis Belvédère, Tunisie.

³Station d'Appui de Manouba, 2010 Manouba, Tunisie.

*Auteur correspondant : Téléphone: (+216) 98 33 87 45 E-mail: faouzi.haouala@laposte.net

Reçu le 29.10.09 et accepté pour publication le 02.02.10.

Abbréviations: BA: Benzyl-adénine; 2,4-D: 2-4 acide Dichloro-phénoxyacétique; Kin: kinétine.

M3= milieu MS + 2,4-D 0,5 mg.l⁻¹ + Kin 0,5 mg.l⁻¹
 M4= milieu MS + 2,4-D 1 mg.l⁻¹ + BA 1 mg.l⁻¹
 M5= milieu MS + 2,4-D 1 mg.l⁻¹ + BA 0,5 mg.l⁻¹ + Kin 0,5 mg.l⁻¹

Les milieux de culture sont solidifiés en ajoutant l'agar-agar à raison de 6,6 g.l⁻¹ et leur pH est ajusté à 5,8. Les explants foliaires sont coupés en morceaux de 5 mm de côté et prélevés des positions apicale, médiane ou basale sur la feuille. Les explants de pédoncules floraux sont coupés en segments de 5 mm de longueur et prélevés également selon une position apicale, médiane ou basale sur le pédoncule floral. Les explants sont placés individuellement en tubes à essai en verre pyrex de 20 mm de diamètre et 20 cm de longueur. Les cultures sont placées en phytotron à une température de 27-28 °C et à l'obscurité pendant 5 semaines pour favoriser la formation et la croissance des cals (3). Chaque traitement comporte 48 explants.

Résultats

1. Callogenèse à partir de feuilles

L'initiation de cals sur les explants foliaires est stimulée par la présence d'hormones de croissance dans le milieu. La formation de cal commence dès la 3^{ème} semaine de culture (Tableau 1). L'incubation des explants sur le milieu M1 dépourvu d'hormones se solde par une absence totale d'activité cellulaire durant toute la période de culture et par la présence de nécroses sur la totalité des explants. Le milieu M1 n'est donc pas susceptible d'induire des cals à partir des feuilles. L'addition du 2,4-D 0,5 à 1 mg.l⁻¹ au milieu de culture, seul ou en association avec BA et/ou Kin, a permis l'induction de cals, à des taux différents, sur la majorité des explants. La présence de 2,4-D dans le milieu de culture (milieu M2) permet de donner,

après 4 semaines, un taux très faible de cal (18%). De plus, les cals sont friables, de couleur brunâtre et leur croissance est moyenne. Ils sont compacts, noduleux, crémeux et présentent une très bonne croissance sur les milieux contenant une association d'auxine et de cytokinine (milieux M3 et M4).

Pour ces milieux, les feuilles deviennent le siège d'une activité callogène très intense et généralisée. Quelque soit le milieu, l'activité callogène ne se déclenche qu'à partir de la troisième semaine de culture. La nature de la cytokinine a un effet sur la formation de cals. Ainsi, en présence de BA (milieu M4), le taux de callogenèse est plus élevé (82%) qu'en présence de kinétine (milieu M3) (66%). D'autre part, la combinaison du 2,4-D 1 mg.l⁻¹ + BA 0,5 mg.l⁻¹ + Kin 0,5 mg.l⁻¹ (milieu M5) se révèle plus favorable à la callogenèse (83,8%), cependant, la croissance du cal est moyenne, a une structure friable et se trouve dispersé sur toute la surface de l'explant. A la 5^{ème} semaine de culture, nous avons pu déterminer le comportement callogène des explants selon leurs positions sur la feuille ainsi que la masse de matière fraîche des cals. Quelque soit le milieu utilisé, le taux de callogenèse augmente en allant de la position basale à la médiane et à l'apicale (Tableau 2). Pour cette dernière, ce sont les milieux M4 et M5 qui paraissent les plus favorables à l'induction de cals.

La masse de matière fraîche des cals dépend du milieu de callogenèse et de la position de l'explant (Figure 1). En effet, cette masse est la plus élevée sur le milieu M4 (92 mg) et la plus faible sur le milieu M2 (50 mg). Sur les milieux M3 et M5, la masse moyenne des cals est comparable et est de 68 mg. Sur tous les milieux de culture, ce paramètre augmente en allant de la position apicale à la basale et à la médiane. Ainsi, sur le milieu M4, les masses respectives des cals sont de 79, 91 et 100 mg.

Tableau 1

Pourcentage de callogenèse chez des fragments de feuilles de gerbera (*Gerbera jamesonii* 'Fredigor') cultivés sur les milieux M2 (MS + 2,4-D), M3 (MS + 2,4-D + Kin), M4 (MS + 2,4-D + BA) et M5 (MS + 2,4-D + BA + Kin)

Durée de la culture	M2	M3	M4	M5
Semaine 3	9 ± 0,8 a	50 ± 3,7 b	50 ± 3,5 b	41,6 ± 2,7 c
Semaine 4	18,2 ± 1,6 d	58,3 ± 4,2 e	72,7 ± 6,1 fg	75 ± 6,4 fg
Semaine 5	18,2 ± 1,6 d	66,6 ± 5,4ef	81,8 ± 6,8 g	83,8 ± 6,9 g

Nombre d'explants par traitement : 48.

Les valeurs, avec intervalles de sécurité, suivies de lettres distinctes sont significativement différentes au seuil 5%.

Tableau 2

Effet de la position de l'explant sur le pourcentage de callogenèse chez des fragments de feuilles de gerbera (*Gerbera jamesonii* 'Fredigor') cultivés pendant 5 semaines sur les milieux M2 (MS + 2,4-D), M3 (MS + 2,4-D + Kin), M4 (MS + 2,4-D + BA) et M5 (MS + 2,4-D + BA + Kin)

Position de l'explant	M2	M3	M4	M5
Apicale	0	25,0 ± 2,0 ad	34,3 ± 2,6 b	35,4 ± 2,7 b
Médiane	18,2 ± 1,6 c	21,4 ± 1,8 ace	31,2 ± 2,4 bd	27,3 ± 2,3 d
Basale	0	20,2 ± 1,6 e	16,3 ± 1,8 f	21,1 ± 1,9 ae

Nombre d'explants par traitement: 16.

Les valeurs, avec intervalles de sécurité, suivies de lettres distinctes sont significativement différentes au seuil 5%.

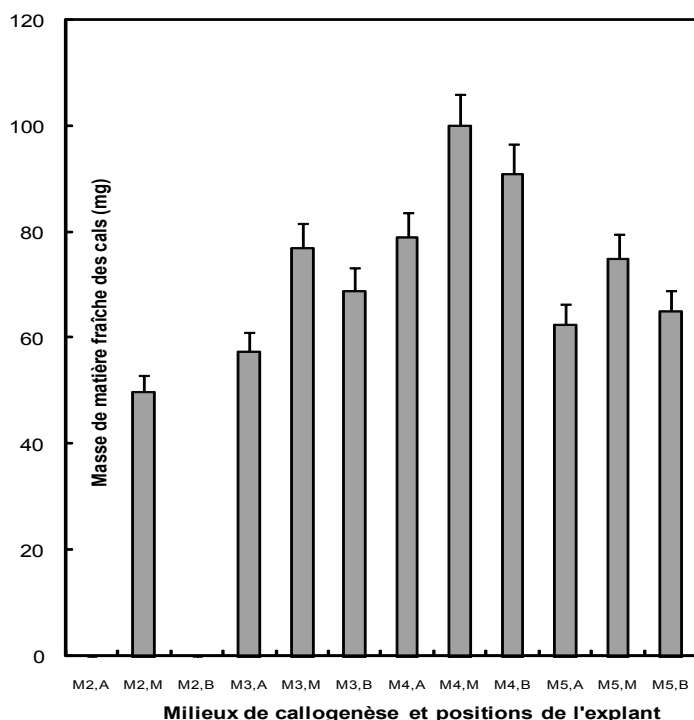


Figure 1: Masse de matière fraîche des cals issus de fragments de feuilles de gerbera (*Gerbera jamesonii* 'Fredigor') prélevés des positions apicale (A), médiane (M) ou basale (B) sur l'organe et cultivés pendant 5 semaines sur les milieux M2 (MS + 2,4-D), M3 (MS + 2,4-D + Kin), M4 (MS + 2,4-D + BA) et M5 (MS + 2,4-D + BA + Kin).

2. Callogenèse à partir de pédoncules floraux

Sur les milieux M1 (témoin), M2 (2,4-D) et M5 (2,4-D+BA+Kin), aucune activité cellulaire n'a été enregistrée après 5 semaines de culture (Tableau 3). D'autre part, la réponse de ce type d'explant est très limitée et le taux de callogenèse est très faible (8 à 10%). Ce sont seulement les milieux M3 (2,4-D+Kin) et M4 (2,4-D+BA) qui permettent d'obtenir des cals qui sont noduleux, de couleur crèmeuse et présentant une bonne croissance. La formation de cal débute à la 3^{ème} semaine de culture mais son taux n'évolue pas tout au long de la culture. Les explants pédonculaires qui ont donné des cals sont tous issus de la partie apicale du pédoncule floral. Pour les explants prélevés à la base et sur la partie médiane, la callogenèse fait totalement défaut.

La masse de matière fraîche des cals dépend du milieu de culture et elle est plus élevée sur le milieu M4 (96 mg) que sur le milieu M3 (71 mg).

Tableau 3

Pourcentage de callogenèse chez des segments de pédoncules floraux de gerbera (*Gerbera jamesonii* 'Fredigor') cultivés sur les milieux M3 (MS + 2,4-D + Kin) et M4 (MS + 2,4-D + BA)

Durée de la culture	M3	M4
Semaine 3	8,3 ± 0,6 a	9,7 ± 0,8 a
Semaine 4	8,3 ± 0,6 a	9,7 ± 0,8 a
Semaine 5	8,3 ± 0,6 a	9,7 ± 0,8 a

Nombre d'explants par traitement: 48.

Les valeurs, avec intervalles de sécurité, suivies de lettres distinctes sont significativement différentes au seuil 5%.

Discussion

Dans notre expérimentation et en absence d'hormones de croissance dans le milieu, la formation de cal à partir de feuilles et de pédoncules floraux était totalement inhibée. Ce même résultat a été obtenu par Kumar et Kanwar (2, 3). L'addition du 2,4-D 1 mg.l⁻¹ au milieu de culture permet d'avoir une callogenèse seulement chez les explants foliaires, toutefois, son taux reste très faible (18%) contrairement à Kumar et Kanwar (3) qui obtiennent, un taux plus élevé (93%), dans ces mêmes conditions.

La présence d'une cytokinine (kinétine ou BA) avec le 2,4-D a amélioré nettement la formation de cals sur les explants foliaires, cependant, son taux dépend de la nature de la cytokinine; il est plus élevé avec la BA qu'avec la kinétine. Dans ces conditions, les cals sont compacts et noduleux et présentent une très bonne croissance. Des résultats similaires sont aussi obtenus par Kumar et Kanwar (3). L'utilisation de la BA a induit une importante formation de cal (91%) alors qu'avec la kinétine, le pourcentage de callogenèse est faible (27%). Dans le cas des explants pédonculaires, la présence de l'auxine (2,4-D) et d'une cytokinine (kinétine ou BA) est nécessaire à la formation de cals mais son taux reste très faible et ne s'améliore pas tout au long de la culture. Ce blocage de l'activité cellulaire pourrait être probablement dû à un épuisement du milieu ou à une dégradation du régulateur de croissance par autoclavage.

L'association de deux cytokinines (BA et kinétine) avec le 2,4-D améliore l'activité callogène chez les explants foliaires mais la croissance et la qualité des cals se trouvent diminuées. L'effet d'antagonisme entre les deux cytokinines pourrait être à l'origine de cette diminution. Ce type de milieu inhibe, par contre, la formation de cals chez les pédoncules floraux.

D'autres équilibres hormonaux peuvent être également favorables à la formation de cals chez le gerbera comme l'ANA et la BAP (1) ou l'AIA et la kinétine ou l'AIA et la BAP (13).

Le taux de callogenèse dépend de la position de l'explant utilisé. En effet, il augmente en allant de la position basale, à la médiane et à l'apicale sur la feuille. Par contre, la formation de cals sur les explants pédonculaires n'est possible que lorsqu'ils sont prélevés sur la partie apicale du pédoncule floral. L'effet de la position de l'explant a été signalé chez le gerbera chez d'autres types d'explant et Tan Nhut *et al.* (12) ont montré que les couches externes du réceptacle floral sont plus favorables à l'induction de cals que les couches médianes, mais le taux de callogenèse est très faible dans ce cas et n'est, respectivement, que de 10 et 0%. Par contre, ce sont les couches médianes qui se sont avérées les plus intéressantes pour la régénération des pousses.

La masse de matière fraîche des cals dépend du milieu de callogenèse, du type et de la position de l'explant. En effet, c'est le milieu contenant 2,4-D 1 mg.l⁻¹ + BA

1 mg.l⁻¹ qui a permis d'obtenir les cals les plus gros. Ce paramètre est plus élevé avec les cals issus des pédoncules floraux qu'avec ceux issus des feuilles. La masse des cals foliaires augmente en allant de la position apicale à la basale et à la médiane. Ainsi et selon le milieu de culture, la masse des cals issus des explants apicaux et basaux représente respectivement 75 à 83% et 87 à 91% de celle des cals issus des explants médians.

Conclusion

La callogenèse chez le gerbera est possible à partir d'explants de feuilles ou de pédoncules floraux, toutefois, elle est nettement meilleure chez les explants foliaires. En effet, le taux de callogenèse atteint, après

5 semaines de culture, 10 et 82%, respectivement pour les segments de pédoncules floraux et les explants foliaires. La présence d'une auxine (2,4-D) et d'une cytokinine (BA) est très favorable à l'induction de cals. Un gradient acropète a été observé chez les explants foliaires alors que seuls les explants de pédoncules floraux d'origine apicale ont formé des cals.

En tenant compte du taux de callogenèse et de la qualité des cals (aspect, structure, croissance, masse de matière fraîche), c'est le milieu contenant 2,4-D 1 mg.l⁻¹ + BA 1 mg.l⁻¹ qui s'est avéré le plus favorable. Il serait intéressant d'étudier par la suite la néoformation de bourgeons et la régénération de pousses à partir de ces cals pour pouvoir exploiter la variabilité somaclonale dans l'amélioration de cette espèce.

Références bibliographiques

1. Aswath C.R. & Choudhary M.L., 2002, Rapid plant regeneration from *Gerbera jamesonii* Bolus callus cultures. Acta Bot. Croat. **61**, 2, 125-134.
2. Kumar S. & Kanwar J.K., 2006, Regeneration ability of petiole, leaf and petal explants in gerbera cut flower cultures *in vitro*. Folia Horticulturae, **18**, 57-64.
3. Kumar S. & Kanwar J.K., 2007, Plant regeneration from cell suspensions in *Gerbera jamesonii* Bolus. Journal of fruit and ornamental plant research, **15**, 157-166.
4. Kumar S., Kanwar J.K. & Sharma D.R., 2004, *In vitro* regeneration of *Gerbera jamesonii* Bolus from leaf and petiole explants. Plant Biochemistry & Biotechnology, **13**, 73-74.
5. Laliberté S., Chrétien L. & Vieth J., 1985, *In vitro* plantlet production from young capitulum explants of *Gerbera jamesonii* Bolus. Hortscience, **20**, 1, 137-139.
6. Maïa E., 1977, Propagation de clones de *Gerbera jamesonii* par culture *in vitro*. Travaux sur le *Gerbera*, journée d'étude du 16 novembre 1977, Fréjus, publication I.T.I.H.
7. Murashige T. & Skoog F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. **15**, 475-497.
8. Olivera-Ortega V., Gutiérrez-Espinosa M.Z., Gutiérrez-Espinosa J.A. & Andrade-Rodríguez M., 2000, Cultivo *in vitro* de *Gerbera (Gerbera jamesonii)* Bolus y su aclimatación en invernadero. Bioagro, **12**, 3, 75-80.
9. Orlikowska T., Nowak E., Marasek A. & Kucharska D., 1999, Effects of growth regulators and incubation period on *in vitro* regeneration of adventitious shoots from gerbera petioles. Plant cell, tissue and organ culture, **59**, 2, 95-102.
10. Parthasarathy V.A., Parthasarathy U., Nagarju V. & Mishra M., 1997, Callus induction and subsequent plant regeneration from leaf explants of *Gerbera jamesonii*. Folia Horticulturae, **9**, 83-86.
11. Pierik R.L.M., Steegmans H.H.M. & Marelis J.J., 1973, *Gerbera* plantlets from *in vitro* cultivated capitulum explants. Scientia Horticulturae, **1**, 117-119.
12. Tan Nhut D., Thi Thuy An T., Thi Dieu Huong N., Trinh Don N., Thanh Hai N., Quoc Thien N. & Hong Vu N., 2007, Effect of genotype, explant size, position, and culture medium on shoot generation of *Gerbera jamesonii* by receptacle transverse thin cell layer culture. Scientia Horticulturae, **111**, 146-151.
13. Tyagi P. & Kothari S.L., 2004, Rapid *in vitro* regeneration of *Gerbera jamesonii* (H. Bolus ex Hook. F.) from different explants. Indian Journal of Biotechnology, **3**, 584-588.
14. Vidalie H., 1987, Les productions florales. J.B. Baillière, Lavoisier (Eds), Paris, 225 p.

F. Haouala, Tunisien, Docteur en Biologie, Maître de Conférences, Institut Supérieur Agronomique de Chott Mariem, Tunisie.

Nadia Farhat, Tunisienne, Mastère spécialisé, Ministère de l'Agriculture et des Ressources Hydrauliques, Tunis, Tunisie.

L. Chabchoub, Tunisien, DEA de Physiologie Végétale, Chef de laboratoire, Station d'Appui de Manouba, 2010 Manouba, Tunisie.