

Multiplication et bulbaison *in vitro* du glaïeul (*Gladiolus grandiflorus* Hort.)

T. Bettaieb¹, M. Denden^{1*}, Inès Hajlaoui¹, M. Mhamdi² & M. Methlouthi¹

Keywords: *Gladiolus*- *In vitro*- Micropropagation- Tunisia

Résumé

Pour la mise au point d'une technique de micropropagation et de bulbaison de glaïeul (*Gladiolus grandiflorus* Hort.), des essais *in vitro* sont entrepris sur les deux cultivars 'Peter pears' et 'White friendship'. Les explants utilisés sont constitués par des bourgeons apicaux de 2 à 3 mm de côté prélevés à partir des cormes. L'initiation et la multiplication *in vitro* sont réalisées, pour les deux cultivars, sur un milieu de base MS additionné de 2 mg.l⁻¹ BA et 0,5 mg.l⁻¹ AIB. L'enracinement et la bulbaison *in vitro* sont obtenus après un séjour dans un premier milieu gélosé contenant, en plus du milieu de base MS; 0,5 mg.l⁻¹ d'AIB sur lequel a été ajouté, 30 jours plus tard, un même milieu mais sans agar et riche en saccharose (6%).

Summary

In vitro Multiplication and Bulb Formation of (*Gladiolus grandiflorus* Hort.)

In order to set up a new bulb formation and micropropagation of gladiolus *in vitro*, trials were undertaken using two ornamental gladiolus cultivars 'Peter pears' and 'White friend ship'. The explants used are apical buds with 2 to 3 mm length taken from the cormes. *In vitro* initiation and multiplication were done for the two cultivars on Murashige and Skoog medium to which 2 mg. l⁻¹ of BA and 0.5 mg.l⁻¹ of AIB were added. *In vitro* root development and bulb formation have been occurred in MS Agar Agar medium with 0.5 mg.l⁻¹ of AIB 30 days later than the same MS medium containing 6% of saccharose and without Agar.

Introduction

Parmi les espèces florales les plus cultivées pour la fleur coupée, le glaïeul jouit d'une grande considération. Sa commercialisation bénéficie d'une demande importante de la part des consommateurs. Le marché européen, importateur de fleurs coupées, peut constituer pour les producteurs du glaïeul en Tunisie un marché potentiel et intéressant. Cependant, cette production est handicapée par la non disponibilité de bulbes qui sont jusqu'aujourd'hui totalement importés. En effet, la bulbiculture pourrait être à la portée des horticulteurs locaux à condition de mettre au point un itinéraire technique de production de bulbes accessible. Cet itinéraire passe nécessairement par la maîtrise de la multiplication *in vitro* de cette espèce.

Depuis 1970, la multiplication *in vitro* du glaïeul (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) a suscité l'intérêt de plusieurs chercheurs (1, 6, 10, 11). Les explants, généralement utilisés, sont constitués par des bourgeons apicaux prélevés sur les cormes. La culture d'apex méristématique associée à la micropropagation est aussi utilisée chez cette espèce pour l'obtention de plantes indemnes de virus (1, 7).

L'objectif de ce travail est la mise au point d'une technique de multiplication et de bulbaison *in vitro* de glaïeul qui peut constituer, dans nos conditions, une approche servant dans l'élaboration des schémas de bulbiculture.

Matériel et méthodes

Les explants utilisés proviennent de deux cultivars de glaïeul à savoir: 'Peter pears' et 'White friendship' reconnus pour leurs aptitudes à la floraison hivernale. Les explants sont constitués par des bourgeons apicaux de 2 à 3 mm de côté prélevés sur des cormes.

Le milieu de base utilisé est constitué de sels minéraux et de vitamines de Murashige et Skoog (8) et de saccharose à 30 g.l⁻¹. Le pH est ajusté à 5,8. Le milieu de culture est solidifié à l'agar (6 g.l⁻¹).

Pour l'évolution des explants, l'AIB [acide (-indole butyrique)] et la BA (benzyladénine) ont été utilisés. Cinq milieux de cultures à des concentrations variées d'hormones ont été

testés: Milieu 1 (sans hormone), Milieu 2 (1 mg.l⁻¹ AIB), Milieu 3 (1 mg.l⁻¹ BA), Milieu 4 (2 mg.l⁻¹ BA et 0,5 mg.l⁻¹ AIB), Milieu 5 (2 mg.l⁻¹ AIB et 0,5 mg.l⁻¹ BA). Les observations faites, après quatre semaines de culture, ont porté sur l'évolution de l'explant vers l'émission de racines, la formation de cals ou vers le bourgeonnement axillaire.

A la lumière de l'essai précédent et dans les subcultures de multiplication, deux milieux de cultures ont été testés pour évaluer le taux du bourgeonnement axillaire et la qualité des pousses obtenues: Milieu 3 (1 mg.l⁻¹ BA), Milieu 4 (2 mg.l⁻¹ BA et 0,5 mg.l⁻¹ AIB). Les observations faites après quatre semaines de culture ont porté sur le taux de multiplication et la présence ou l'absence de feuilles. Pour l'élongation des pousses obtenues par cette voie, les propagules ont été cultivées, pendant trois semaines, sur un milieu sans hormones.

Des essais d'enracinement ont été conduits sur différents milieux de culture contenant le milieu de base MS additionné d'AIB à 5 concentrations (0; 0,1; 0,5; 1 et 5 mg.l⁻¹). Les sels minéraux ont été dilués de moitié et tous les milieux de culture ont été additionnés de 2 g.l⁻¹ de charbon actif et solidifiés par l'agar (6 g.l⁻¹). Les observations ont porté sur la fréquence d'apparition, le nombre et la longueur des racines.

La formation des cormes a été évaluée après 60 jours de culture sur des milieux de culture à deux phases. Une phase solide constituée par le milieu d'enracinement et une phase liquide, aux mêmes concentrations, additionnée, 30 jours plus tard, au même milieu.

Les effets de la concentration en saccharose sur la formation de cormes de glaïeul ont été étudiés. Le saccharose a été utilisé à 5 concentrations (0; 1,5; 3; 6 et 8%) et ajouté à un milieu de culture contenant le milieu de base MS dont les sels minéraux ont été dilués de moitié et additionnés de 0,5 mg.l⁻¹ d'AIB. Ce milieu a donné dans les essais précédents de bulbaison *in vitro* et chez les deux cultivars des bulbes plus importants de poids et de calibre par rapport aux autres milieux de culture testés (Tableau 4).

¹Ecole Supérieure d'Horticulture et d'Élevage Chott-Mariem, 4042, Tunisie.

²Ecole Supérieure d'Agriculture du Kef, Boulifa Kef, 7119, Tunisie.

*Dr Denden M.: Maître de conférences à l'Ecole Supérieure d'Horticulture et d'Élevage Chott-Mariem, 4042, Tunisie. Tél: 00 216 23 206 614. Email: dendenmounir@yahoo.fr

Reçu le 20.02.06 et accepté pour publication le 12.06.06.

Tableau 1
Effets de la BA associée à l'AIB sur le développement des bourgeons apicaux prélevés à partir de cornes de glaïeul (*Gladiolus grandiflorus* Hort.), Cultivars: 'Peter pears' et 'White friendship', après 4 semaines de culture *in vitro* (n= 24)

Numéro du milieu de culture	Nature et concentration des hormones (mg.l ⁻¹)	Cultivars	Racines (%)	Cals (%)	Bourgeons (%)
1	Sans hormone	PP	100	16	10
		WF	100	15	5
2	AIB 1	PP	100	25	8
		WF	100	30	6
3	BA 1	PP	0	0	100
		WF	0	2	100
4	AIB 0,5; BA 2	PP	0	0	100
		WF	0	0	100
5	AIB 2; BA 0,5	PP	45	14	11
		WF	36	16	4

Racines %= pourcentage d'explants ayant formé des racines. Cals %= pourcentage d'explants ayant formé des calcs. Bourgeons %= pourcentage d'explants ayant formé des bourgeons. PP: cv. 'Peter pears' WF: cv. 'White friendship'.

Tableau 2
Effets de la BA et de l'AIB sur la multiplication et la longueur des pousses axillaires produites *in vitro* à partir de bourgeons apicaux de cornes de glaïeul (*Gladiolus grandiflorus* Hort.), Cultivars: 'Peter pears' et 'White friendship' (n= 24)

Nature et concentration des phytohormones (mg.l ⁻¹)		Cultivars	Taux de multiplication	Longueur des pousses (%)	
				> à 0,5 cm	< à 0,5 cm
Milieu 4	BA 2; AIB 0,5	Peter pears	4,6 ± 0,16 a	60	40
		White friendship	4,4 ± 0,22 a	55	45
Milieu 3	BA 1	Peter pears	4,9 ± 0,27 a	0	100
		White friendship	4,8 ± 0,19 a	0	100

Les moyennes, avec écarts-type, de la même colonne suivies de la même lettre ne diffèrent pas entre elles selon le test de PPDS au seuil de 1%.

Les cultures sont réalisées dans des tubes à essai (diamètre 16 mm, longueur 100 mm) pour la phase de multiplication. L'enracinement et la bulbaison ont été conduits dans des bocaux de 750 ml de volume. Tous les essais ont été conduits à une photopériode de 16 heures, une intensité lumineuse de 36 $\mu\text{mol.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ et à une température de 23 ± 1 °C.

Les essais ont été conduits selon des dispositifs expérimentaux en Split Plot avec trois répétitions. Le premier facteur correspond aux cultivars. Le second correspond aux différentes concentrations des différents additifs (hormones, saccharose). Chaque unité expérimentale relative à un traitement dans un bloc a comporté 24 explants. Le test à la PPDS au seuil 1% a servi pour la comparaison des moyennes.

Résultats et discussion

Initiation de la culture

Les résultats des effets de la BA et de l'AIB sur le développement des bourgeons apicaux des cornes des deux cultivars 'Peter pears' et 'White friendship' sont rapportés dans le tableau 1. Il montre une différence de réponse des explants aux milieux de cultures testés. L'enracinement a été général (100%) sur le milieu sans hormones et sur celui additionné de 1 mg.l⁻¹ d'AIB. Ces résultats se rapprochent de ceux qu'Hamann (5) a obtenu sur le glaïeul après repiquage de pousses individualisées sur un milieu dépourvu de régulateurs de croissance. En outre, sur les mêmes milieux et chez les deux cultivars, les explants développent peu de bourgeons. La formation de calcs a été observée sur le milieu sans hormones et sur les milieux où le rapport auxine/cytokinine est supérieur à 1. Cette évolution ne concerne pas tous les explants (14 à 30%). En effet, d'après Ziv et Lilien-Kipnis (12) le milieu le plus favorable à la callogenèse est un milieu MS avec des fortes concentrations en ANA ou en 2,4-D. Dans notre cas, la formation modérée de calcs semble provenir des auxines endogènes et de l'AIB additionné au milieu de culture. Cette

auxine n'a pas été décrite à action callogène. Sur les milieux 3 et 4 où la BA est dominante, la caulogénèse est importante, tous les explants ont donné des bourgeons. Les deux milieux 3 et 4 ont été retenus pour les essais de multiplication. Les deux cultivars (Peter pears et White friendship) présentent des réactions relativement homogènes. Ils expriment une réponse organogène, pratiquement, équivalente. Il est important de signaler que les hormones ont eu les effets prévisibles sur les pousses mises en culture. Les cytokinines entraînent essentiellement la formation de bourgeons, les auxines favorisent la formation de calcs et de racines.

Multiplication

Au cours de la première subculture qui a duré quatre semaines, le taux de multiplication n'a pas varié significativement pour les deux cultivars testés (Tableau 2). A partir d'une pousse unique, il se forme environ 5 pousses axillaires grâce à la présence de la cytokinine dans les deux milieux de culture 3 et 4 (Figure 1A). Ce taux de prolifération n'a pas présenté de variation lors des subcultures suivantes.

Les pousses, de longueur supérieure à 0,5 cm, n'ont été observées que dans le milieu 4 contenant 2 mg.l⁻¹ BA et 0,5 mg.l⁻¹ AIB, la présence d'une auxine dans ce milieu semble nécessaire à l'allongement des pousses (Tableau 2). Les pousses de longueur inférieure à 0,5 cm produites *in vitro* ont été reprises sur un milieu de base MS sans hormone qui favorise leur élévation et facilite leur individualisation.

Enracinement et bulbaison

Les essais d'enracinement *in vitro* ont abouti à une rhizogénèse générale des pousses mises en culture. Par contre, le nombre et la longueur des pousses ont varié significativement entre les différents traitements à l'AIB (Tableau 3). Le nombre le plus élevé de racines a été obtenu sur les milieux additionnés de 0,5 et 1 mg.l⁻¹ d'AIB. Les racines les plus longues ont été obtenues sur le milieu

Tableau 3

Effets de l'AIB sur l'enracinement des pousses axillaires produites *in vitro* à partir de bourgeons apicaux de cornes de glaïeul (*Gladiolus grandiflorus* Hort.), Cultivars: 'Peter pears' et 'White friendship' (n= 24)

AIB (mg.l ⁻¹)	Cultivars	Pousses enracinées (%)	Nombre de racines par vitroplant	Longueur moyenne des racines (cm)
0	PP	100	3,1 ± 0,12 d	1,5 ± 0,09 ab
	WF	100	2,9 ± 0,17 d	0,9 ± 0,11 c
0,1	PP	100	3,5 ± 0,24 c	0,9 ± 0,07 c
	WF	100	3,3 ± 0,18 cd	1,1 ± 0,15 bc
0,5	PP	100	5,4 ± 0,20 a	1,2 ± 0,13 bc
	WF	100	5,7 ± 0,32 a	1,4 ± 0,09 b
1	PP	100	5,6 ± 0,27 a	1,7 ± 0,12 a
	WF	100	5,4 ± 0,19 a	1,5 ± 0,08 ab
5	PP	100	3,6 ± 0,26 c	1,3 ± 0,11 b
	WF	100	4,9 ± 0,31 b	1,3 ± 0,09 b

Les moyennes, avec écarts-type, de la même colonne suivies, de la même lettre ne diffèrent pas entre elles selon le test de PPDS au seuil de 1%. PP: cv. 'Peter pears' et WF: cv. 'White friendship'.

Tableau 4

Effets de l'AIB sur la bulbaison *in vitro* des pousses produites *in vitro* à partir de bourgeons apicaux de cornes de glaïeul (*Gladiolus grandiflorus* Hort.), Cultivars: 'Peter pears' et 'White friendship' après 60 jours de culture sur un milieu double phase (n= 24)

AIB (mg.l ⁻¹)	Cultivars	Bulbaison %	Poids frais de la corne (g)	Circonférence de la corne (cm)
0	PP	100	0,24 ± 0,08 c	2,1 ± 0,13 bc
	WF	100	0,26 ± 0,07 bc	2,3 ± 0,10 b
0,1	PP	100	0,30 ± 0,10 ab	2,7 ± 0,15 ab
	WF	100	0,29 ± 0,08 ab	2,2 ± 0,16 bc
0,5	PP	100	0,36 ± 0,08 a	2,9 ± 0,12 a
	WF	100	0,34 ± 0,09 a	2,8 ± 0,14 a
1	PP	100	0,34 ± 0,06 a	3,1 ± 0,13 a
	WF	100	0,33 ± 0,05 a	2,9 ± 0,18 a
5	PP	100	0,31 ± 0,07 ab	2,9 ± 0,10 a
	WF	100	0,35 ± 0,06 a	2,7 ± 0,16 ab

Les moyennes, avec écarts-type, de la même colonne suivies, de la même lettre ne diffèrent pas entre elles selon le test de PPDS au seuil de 1%. PP: cv. 'Peter pears' et WF: cv. 'White friendship'.

additionné de 1 mg.l⁻¹d'AIB. L'enracinement du témoin s'explique probablement par une haute teneur en auxines endogènes. L'apport exogène d'AIB semble améliorer globalement la rhizogénèse. Il y a lieu de remarquer aussi que le nombre de racines par pousse diminue lorsque la concentration d'AIB atteint 5 mg.l⁻¹. Cette concentration devient alors nocive à la rhizogénèse.

En ce qui concerne la bulbaison *in vitro*, le tableau 4 résume les principales informations à ce propos. En effet, toutes les pousses ont donné des bulbes (Figure 1B) mais la différence d'expression se trouve aux niveaux du poids et du calibre des cornes. Le poids et le calibre les plus élevés ont été obtenus sur les milieux enrichis de 0,5; 1 ou 5 mg.l⁻¹ d'AIB. Le milieu témoin favorise la formation de bulbes mais ne semble pas stimuler leur grossissement.

Les résultats présentés dans le tableau 5 concernant les effets de la concentration en saccharose sur la bulbaison *in vitro* du glaïeul ont montré une différence significative au niveau du calibre et du poids frais des cornes entre les différents traitements. Cependant, la fréquence d'apparition des cornes n'a pas varié avec la variation du milieu de culture. Les poids frais et les calibres les plus élevés ont été obtenus avec les fortes concentrations en saccharose (6 et 8%). Une faible dose de sucre (1,5%) ou son absence n'empêche pas la bulbaison, mais elle constitue un facteur limitant du grossissement des cornes.

Chez plusieurs espèces à organes de réserves tubérisés, les concentrations relativement plus élevées que la

concentration habituellement utilisée en culture *in vitro* (2 à 3%) favorisent la formation et le grossissement des bulbes. Chez la tulipe, la bulbaison *in vitro* est favorisée en présence de 4 à 6% de saccharose (9). Pour Takayama et Misawa cité par Dantu et Bhojwani (3) chez le lys, le nombre de bulbes formés est le plus élevé lorsqu'on utilise le saccharose à une concentration de 9%. Pour Espinosa (4) et Bettaieb *et al.* (2) chez la pomme de terre, la tubérisation *in vitro* est favorisée par des teneurs de 6% en saccharose

Conclusion

La micropropagation du glaïeul est possible à partir de bourgeons apicaux prélevés à partir de cornes. L'initiation et la multiplication *in vitro* de cette plante sont réalisées sur un milieu de base MS additionné de 2 mg.l⁻¹ BA et 0,5 mg.l⁻¹ AIB. Un milieu de culture additionné de 1 mg.l⁻¹ de BA favorise le même taux de multiplication, mais les pousses obtenues sont en grande partie (40 à 45%) de faibles longueurs (inférieures à 0,5 cm).

L'enracinement et la bulbaison *in vitro* sont obtenus après un séjour dans un premier milieu gélosé contenant, en plus du milieu de base MS, 0,5 mg.l⁻¹ d'AIB sur lequel a été ajouté, 30 jours plus tard, un même milieu mais sans agar et riche en saccharose (6%).

Cette voie de micropropagation du glaïeul, permettant une obtention massive de vitrobulbes, pourrait être exploitée dans les programmes de bulbiculture de cette espèce.

Tableau 5

Effets de la concentration en saccharose sur la bulbaison de pousses produites *in vitro* à partir de bourgeons apicaux de cornes de glaïeul (*Gladiolus grandiflorus* Hort.), Cultivars: 'Peter pears' et 'White friendship', après 60 jours de culture sur un milieu double phase (n= 24)

Concentration en saccharose (%)	Cultivars	Bulbaison (%)	Poids frais du corme (g)	Circonférence du corme (cm)
0	PP	100	0,14 ± 0,07 d	0,9 ± 0,10 d
	WF	100	0,16 ± 0,09 d	1,0 ± 0,09 d
1,5	PP	100	0,28 ± 0,06 c	2,1 ± 0,13 c
	WF	100	0,30 ± 0,07 c	2,0 ± 0,14 c
3	PP	100	0,36 ± 0,05 b	2,9 ± 0,12 b
	WF	100	0,34 ± 0,07 b	2,8 ± 0,16 b
6	PP	100	0,41 ± 0,06 a	3,2 ± 0,17 a
	WF	100	0,39 ± 0,09 ab	3,3 ± 0,15 a
8	PP	100	0,42 ± 0,08 a	3,1 ± 0,16 ab
	WF	100	0,40 ± 0,07 a	3,2 ± 0,14 a

Les moyennes, avec écarts-type, de la même colonne suivies, de la même lettre ne diffèrent pas entre elles selon le test de PPDS au seuil de 1%. PP: cv. 'Peter pears' et WF: cv. 'White friendship'.



Figure 1: Multiplication et bulbaison *in vitro* du glaïeul cv. 'Peter pears'.

A: Multiplication (Milieu MS + 2 mg.l⁻¹ de BA et 0,5 mg.l⁻¹ d'AIB). B: Enracinement et bulbaison dans un milieu double phase (Milieu MS + 0,5 mg.l⁻¹ d'AIB et 6% de saccharose).

Références bibliographiques

- Bajaj Y.P.S., Sidhu M.M.S. & Gill A.P.S., 1992, Micropropagation of *Gladiolus*. Biotech-Agri-Berlin. Germ.: Springer-Verlag. 19, 35-143.
- Bettaieb T., Hannachi C., M'hamdi M. & Ben Kheder M., 2002, Amélioration de tubérisation *in vitro* de la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) Var. Spunta. Revue de l'Institut National Agronomique de Tunisie (INAT). Vol. 17, 1, 69-79.
- Dantu P.K. & Bhowani S.S., 1995, *In vitro* corm formation and field evaluation of corm-derived plants of *Gladiolus*. Scientia Hort. 61, 115-129.
- Espinosa N.O., Estrada R., Silva-Rodriguez D., Tovar P. & R. Lizarraga., 1986, The potato: a model crop plant tissue culture. Outlook Agric. 15, 21-26.
- Hamann H., 1995. Contribution à la mise au point d'une technique de transfert de genes via *Agrobacterium tumefaciens* chez le glaïeul (*Gladiolus grandiflorus* Hort.). Maîtrise de chimie et de biologie végétale. Université de Rennes 1. France 20 p.
- Hussey G., 1977, *In vitro* propagation of *Gladiolus* by precocious axillary shoot formation. Sci. Hort. 6287-296.
- Lilien-Kipnis H. & Kochba M., 1987, Mass propagation of new gladiolus hybrids. Acta Hort. 212, 631-638.
- Murashige T. & Skoog F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Physiol. plant. 15, 473-497.
- Nishiuchi Y., 1980, Studies on vegetative propagation of tulips. Regeneration of bulblets in bulb scale segments cultured *in vitro*. J. Jap. Soc. Hort. Sci. 49, 235-240.
- Steinitz B., Cohen A., Goldberg Z. & Kochba M., 1991, Precocious corm formation in liquid shake cultures. Plant Cell. Tissue Organ Cult. 26, 63-70.
- Ziv M., 1979, Transplanting gladiolus plants propagated *in vitro*. Sci. Hort. 11, 257-260.
- Ziv M. & Lilien-Kipnis H., 1990, *Gladiolus*. In: P.V. Ammirato, D.R. Evans, W.R. Sharp, Y.P.S. Bajaj (eds), Handbook of plant cell culture, volume 5 ornamental species: McGraw-Hill Publishing Company, New York.

T. Bettaieb, Tunisien, Ingénieur, Titulaire d'un doctorat en sciences agronomiques de l'Institut National Agronomique de Tunisie. Maître-assistant à l'Ecole Supérieure d'Horticulture et d'Elevage Chott-Mariem, Tunisie.

M. Denden, Tunisien, Ingénieur, Titulaire d'un doctorat en sciences agronomiques de la Faculté des Sciences Agronomiques et Biologiques appliquées de Gand, Belgique (1996), Maître de conférences à l'Ecole Supérieure d'Horticulture et d'Elevage Chott-Mariem, Tunisie.

Inès Hajlaoui, Tunisienne, Doctorante à l'Ecole Supérieure d'Horticulture et d'Elevage Chott-Mariem, 4042, Tunisie.

M. Mhamdi, Tunisien, Ingénieur, Titulaire d'un doctorat en sciences agronomiques de la Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, Belgique. Maître-assistant à l'Ecole Supérieure d'Agriculture du Kef, Boulfifa Kef, Tunisie.

M. Mathlouthi, Tunisien, Maître-assistant à Ecole Supérieure d'Horticulture et d'Elevage Chott-Mariem, Tunisie.