



Siège social
3600, boul Casavant Ouest
Saint-Hyacinthe, Qc, J2S 8E3
Tel : (450) 773-1105
Fax : (450) 773-8461

Bureau de Québec
1140, rue Taillon
Québec, Qc, G1N 3T9
Tel : (418) 643-8903
Fax : (418) 643-8350

Projet de recherche: Rapport final

**Recherche d'un protocole expérimental concernant la
micropropagation d'Acer saccharum L. Marsh.. Premières
observations des stades I et II.**

Par: Elisabeth STRAHLHEIM-RENAUD



Résumé

La période de l'année la plus favorable à la mise en culture in vitro des apex d'*Acer saccharum* est avril-mai, période durant laquelle la croissance est très active et où le taux de contamination est contrôlable. L'obtention au stade 1 de vitroplants d'Érable à sucre mature (100 ans) est possible Par l'emploi de l'acide allantoïque et du glucose. Le rapport C/N est un des facteurs déterminant de la culture in vitro de l'Érable à sucre. Au stade II, l'utilisation du 2ip-adénosine et du thidiazuron utilisé dans certaines conditions, favorise le développement des vitroplants. Parmi les auxines, l'acide phényl-acétique favorise l'allongement des bourgeons axillaires et de l'axe principal.



Table des matières

Introduction	1
Matériel et méthodes	1
Résultats et discussion.....	3
Période de prélèvement des bourgeons:	3
Initiation des apex en culture in vitro:.....	4
Acide allantoïque, seule source d'azote:.....	5
Acide allantoïque, complément organique azoté:	6
Avec le saccharose:	6
Avec le glucose:	6
Avec le raffinose:	8
Utilisation de régulateurs de croissance	8
Développement et multiplication des vitroplants:.....	9
Multiplication des vitroplants:.....	9
Première expérience	11
Deuxième expérience:	12
Autres essais:.....	12
Les sels minéraux:	14
Allongement de la tige principale	16
Cytokinine + auxine:	16
Autres essais:.....	17
L'acide aibbérélic:.....	17
L'auxine seule:.....	17
La lumière:	17
Conclusion.....	19
Remerciements	22
Annexe 1	22
Annexe 2	23
Annexe 3	23

Recherche d'un protocole expérimental concernant la micropropagation d'Acer saccharum L. Marsh.. Premières observations des stades I et II.



Introduction

Parmi les études faites sur les arbres forestiers, peu d'entre elles ont conduit à l'établissement d'un système de clonage bien déterminé comparativement aux espèces herbacées ornementales (BROWN et SOMMER 1982). Cependant, la liste d'espèces ligneuses ayant produit des clones par la culture in vitro, ne cesse de s'accroître (BOULAY 1987). La plupart des succès obtenus proviennent de matériel juvénile, la culture d'arbres matures n'étant limitée qu'à quelques études (BONGA 1981, BOULAY 1978, ECONOMOU et SPANOUDAKI 1988, GUPTA et al. 1980 et 1981, VIEITEZ et al. 1983). - - Ainsi, parmi les érables, plusieurs espèces ont été étudiées, donnant des succès complets ou partiels avec du matériel juvénile (WELSH et SINK 1982, HANUS et ROHR 1984 et 1985, KERNS et MEYER 1986 et BRASSARD et al. 1988).

Aucun travail cependant ne porte sur la micropropagation de l'érable à sucre mature. De tels travaux seraient des plus utiles si des plants génétiquement semblables devaient être propagés pour une caractéristique particulière du plant-mère. La culture tissulaire d'Acer saccharum mature, centenaire, fait donc l'objet d'une étude nouvelle.

Dans ce travail, nous nous proposons de dégager les grandes lignes pouvant amener à la micropropagation de l'érable à sucre mature. Notre première démarche sera de déterminer la période de l'année la plus favorable au prélèvement des branches d'érable à sucre dans le but de mettre des apex en culture. Nous porterons ensuite une attention toute particulière sur la composition des milieux de culture et sur les conditions culturales. Nous tenterons enfin de résoudre les problèmes causés par le manque d'allongement de la tige principale et le développement des bourgeons adventifs formés.



Matériel et méthodes

Des branches d'un érable Acer saccharum Marsh. de 100 ans environ et reconnu comme donnant un excellent rendement en eau d'érable ont été récoltées à différentes périodes de l'année, à l'aide d'une carabine (calibre 12, balles SSG) ou d'une perche rétractable. Les prélèvements ont été effectués à l'érablière expérimentale du M.A.P.A.Q. à Norbertville. Nous n'avons pas tenu compte de la position des branches par rapport à la couronne de l'arbre.

Les explantats prélevés de ces branches et mis en culture comprenaient, soit:

- l'apex de 1 à 5 mm (figure 1);
- l'apex de 5 mm ou plus;
- une bouture, c'est-à-dire la nouvelle pousse de l'année comprenant 1 ou 2 noeuds.

Une stérilisation des bourgeons a été effectuée avant la dissection, Par trempage sur agitateur magnétique dans une solution d'eau de javel à 30% avec une goutte de tween 20 pendant 30 minutes, suivi de 3

rinçages à l'eau distillée stérile. Après la dissection des bourgeons sous une loupe binoculaire en condition aseptique, les apex sont stérilisés une deuxième fois dans une solution de javel à 10% pendant 5 minutes puis déposés sur le milieu de culture sans rinçage.

Dans le cas des microboutures, la stérilisation est la même (javel à 30% avec une goutte de tween 20), mais plus longue: 45 minutes. De plus, avant la stérilisation, les boutures sont mises dans une solution d'acide citrique (250 mg/l) et d'acide ascorbique (150 mg/l) dans une proportion de 1:1 durant 1 minute (HEGEDUS, Comm. pers.).

Différents essais ont été réalisés au stade de l'initiation et au stade de propagation des plants. Dans tous les cas, le pH est ajusté à 5.5 avant autoclavage (15 minutes à 120° c).

Le milieu de base au stade 1 comporte les sels minéraux WPM (LLOYD et McCOWN, 1980) (cf. annexe 1) et 6 g/l de gélose, (Gibco-Phytagar) enrichie de kinétine (1 mg/l) et d'AIA (0,3 mg/l) 9 ajoutés avant l'autoclavage. Ce milieu comporte aussi de la thiamine (0,4 mg/l) et de l'inositol (100 mg/l). Les sucres y sont étudiés à différentes concentrations: saccharose 1%, 2% ou 3%, glucose 2%, 3% ou 4%, raffinose 2%.

Une première série d'expérience portait sur l'acide allantoïque comme seule source d'azote. Les concentrations utilisées étaient: 0, 30, 100, 300, 500 et 1000 mg/l. Dans une deuxième série d'expérience, l'acide allantoïque, constituait une source d'azote organique supplémentaire. Les concentrations utilisées étaient 0, 30, 300 et 1000 mg/l.

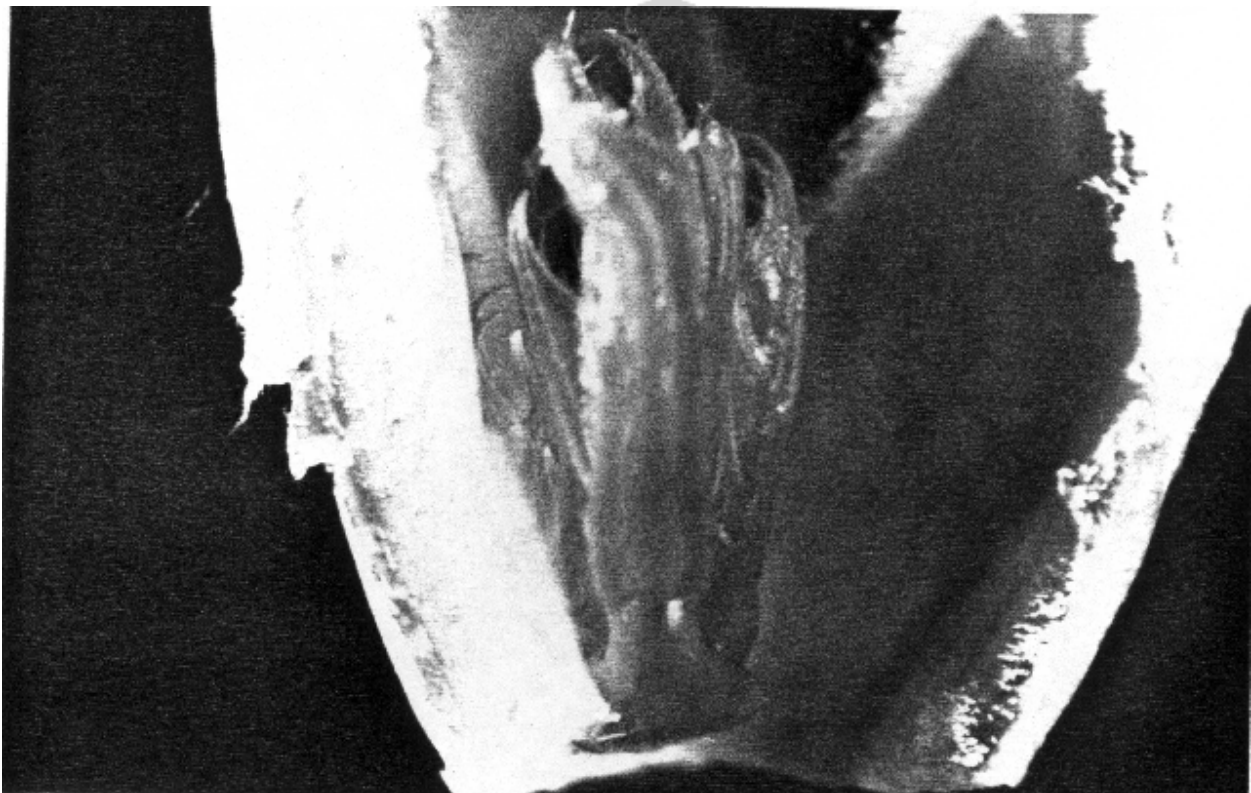


Figure 1 : Apex (4.5 mm) d'érable à sucre mature

Le 2ip-adénosine a aussi été utilisée à l'initiation des explantats, à la concentration de 10 mg/l. Les échantillons, mis dans des pétris sont placés sur des étagères éclairées par des tubes fluorescents VitaLux et Gro-Lux (dont l'intensité lumineuse est de 6000 Lux) et où la température de la pièce est de 20 °C. La photopériode est de 16 hres/jour.

Au stade II, stade de propagation des vitroplants, nous avons effectué différentes séries d'expériences. Le milieu de base comprenait les sels minéraux MS dilués aux 3/4 de leur force (MURASHIGE et SKOOG, 1962), avec: 0.4 mg/l de thiamine, 100 mg/l d'inositol, 2% saccharose et 0,6% Gibco Phytagar. Les hormones et les concentrations hormonales étaient les suivantes:

2ipA	(2, 5 et 10 mg/l)
BA	(0,25 mg/l)
Th	(0,025 et 0,05 mg/l)
K + AIA	(1 + 0,5 mg/l)
2ipA + AIA	(10 + 0,3 mg/l)
2ipA + AIB	(2 + 0,1 mg/l)
	(2 + 0,3 mg/l)
	(5 + 0,1 mg/l)
2ipA + APA	(3 + 0,1 mg/l)
	(3 + 0,3 mg/l)
	(5 + 0,1 mg/l)
2ip + 2ipA + APA	(1,5 + 12 + 0 mg/l)
	(0,37 + 3 + 0 mg/l)
	(0,37 + 3 + 0,3 mg/l)
APA + AIA	(5 + 1 mg/l)

Le thidiazuron, dissout dans l'acétone, provient de NOR-AM Chemical Compagny.

Au stade de multiplication, les plantules sont transférées dans des pots MAGENTAS GA7 (Carolina Cie) qui sont placés sur une étagère recevant une intensité lumineuse de 2000 Lux. La température et la photopériode sont les mêmes qu'au stade I, sauf lorsque le texte le précise.



Résultats et discussion

Période de prélèvement des bourgeons:

Dès septembre 1987, des branches d'érable à sucre sont prélevées à intervalle régulier (tableau 1) et sont conservées à 40 °C.

En automne 1987, (de septembre à novembre) malgré la stérilisation utilisée, le taux de contamination des boutures mises en culture était très élevé (de 90 à 95%) et une diffusion de phénols dans le milieu de culture était observée. Cette diffusion était cependant complètement évitée par trempage dans la solution d'acide citrique/acide ascorbique, telle qu'indiquée dans le matériel et méthodes. Mais l'emploi de boutures, présentait un autre inconvénient: la présence d'inhibiteurs de croissance dans les écailles des bourgeons qui empêche le développement de ces derniers (ABBOTT 1980). En disséquant des apex de 1 à 5 mm (figure 1), nous avons réduit la contamination fongique ou bactérienne et supprimé les inhibiteurs présents dans les écailles. Les apex en culture n'ont montré aucune diffusion de phénols.

En hiver 1987 (jusqu'en mars 1988), les apex n'ont pas eu de développement spectaculaire. Après 2 mois de culture in vitro, ces apex ayant doublés de volume sont devenus jaune-brun et la croissance s'est arrêtée. Nous avons fait un essai avec de l'acide gibbérélique (1 mg/l), sans succès. Nous n'avons pas essayé le thidiazuron à cette période de l'année pour vérifier si la dormante pouvait être levée (WANG et al. 1986).

D'après TAYLOR et DUMBROFF (1975), les besoins d'exposition au froid des érables à sucre ne sont pas complètement satisfaits avant mi-mars, c'est-à-dire avant qu'un certain nombre d'heures de basses températures ne soit révolu. Cette période est également nécessaire pour que l'équilibre hormonal de l'arbre soit établi. Si la reprise de l'activité métabolique des cytokinines s'observe à partir de février, celle-ci est graduelle. Les bourgeons ne débourent que lorsqu'un dosage subtil d'un mélange de régulateurs de croissance s'établit. Cet équilibre se produit vers avril-mai (WASEEM, 1988). Cette période du débourrement des bourgeons nous a semblé la période la plus favorable à la croissance des vitroplants de l'érable à sucre mature: les bourgeons sont alors en pleine activité de croissance.

Les apex mis en culture aseptique ont commencé à se développer à partir de mi-avril. La croissance était plus importante fin-avril. Les contaminations fongique et bactérienne étaient faibles.

Tableau 1. Période de prélèvement des bourgeons d'Acer saccharum mature en réponse à leur croissance et leur taux de contamination in vitro.

Période 1987-1988	Type d'explant utilisés	n	Contamination in vitro	Croissance in vitro
Septembre	bouture	89	++++	-
Novembre	Bouture	77	++++	-
	apex (< 5 mm)	253	+	-
Janvier	apex (< 5 mm)	40	-	-
Fin février	apex	47	-	-
Fin-mars	apex (< 5 mm)	35	-	+
Fin mars	apex (< 5 mm)	161	+	++
Début avril	apex (< 5 mm)	33	+	++
Mi-avril	apex (< 5 mm)	38	+	+++
Fin avril	apex (< 5 mm)	272	++	++++
Mi-mai	apex (< 5 mm)	204	++	++++

Nous avons cependant constaté que 2 stérilisations (l'une de 30 minutes avant la dissection et l'autre de 5 minutes après la dissection) étaient nécessaires: avec une seule stérilisation, des bactéries réapparaissaient dès le premier repiquage. Il est également important de noter que des bactéries endogènes peuvent réapparaître après plusieurs mois de culture in vitro.

Initiation des apex en culture in vitro:

Les sources carbonées et azotées constituent les éléments les plus importants pour l'établissement des cultures in vitro.

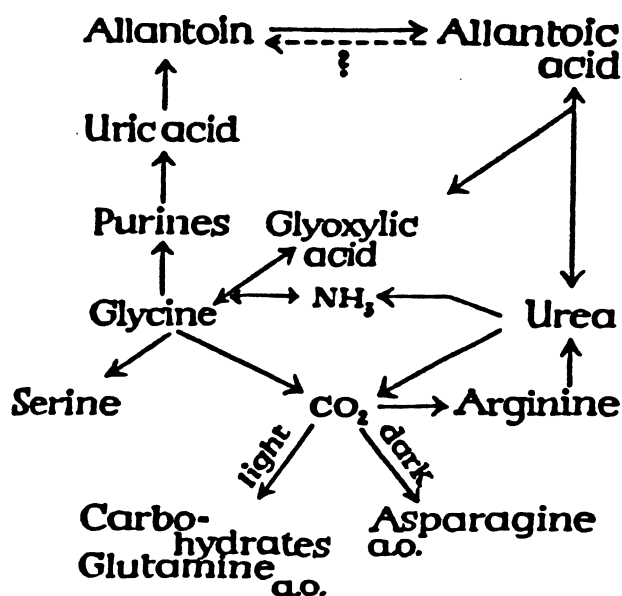
Dans un premier temps, il nous a semblé essentiel de déterminer la meilleure source carbonée pour l'initiation des apex. Nous avons utilisé le glucose, le saccharose et le raffinose. Parallèlement, nous avons effectué des expériences avec l'acide allantoïque, utilisé d'une part comme seule source azotée et d'autre part comme complément organique azoté.

L'acide allantoïque est un dérivé de l'allantoïne (figure 2). Il s'agit d'un composé organique azoté qui avec l'allantoïne peuvent à eux deux, représenter jusqu'à la moitié de l'azote total de certaines espèces de plantes appartenant entre autre à la famille des Aceraceae (MOTHES, 1961). Présents dans les racines, ces uréides montent principalement par la sève du xylème par le courant de transpiration jusqu'aux nouvelles pousses, où ils sont transformés en acides aminés et en protéines. En automne, le processus est inversé: les substances azotées des feuilles sont mobilisées pour remplir les organes de réserves (MOTHES, 1961). PLOLIVIER (1948) retrouve de l'allantoïne dans les racines et l'écorce d'Acer saccharum.

Acide allantoïque, seule source d'azote:

Les sels minéraux utilisés pour cette série d'expérience sont les sels WPM (cf. annexe 1). Nous avons supprimé les sels $\text{NH}_4 \text{NO}_3$ et $\text{Ca}(\text{NO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ sauf pour le témoin qui comprenait tous les sels minéraux. Les hormones utilisées étaient K + AIA (1 + 0,3 mg/l).

Les résultats obtenus concernant l'acide allantoïque comme seule source d'azote nous indiquent que seuls



les apex se développant sur les milieux où la concentration de cet uréide est élevé (1000 mg/l) permettait le développement des explantats in vitro, et ceci avec 1 ou 2% de saccharose ou 4% de glucose -(tableau 2). Cette croissance est cependant limitée. Il est évident que dans ce cas l'azote constitue le facteur limitant.

Figure 2 : Métabolisme de l'acide allantoïque à partir de la glycine. Tirée de : MOTHES (1961) : Can, Bot., 39 : 1805

Il est aussi intéressant de constater que l'acide allantoïque présent comme seule source azotée, favorise la nécrose des explantats en présence de 3% de glucose.

Tableau 2. Initiation des apex d'Acer saccharum mature avec 2 sources carbonées à différentes concentrations et ou l'acide allantoïque est la seule source d'azote.

Acide allantoïque (mg/l)		Saccharose		Glucose	
		1%	2%	3%	4%
		(n)	(n)	(n)	(n)
0	Croissance	(5)	(6)	(10)	(8)
	Nécrose	++	+++	+++	++
30	Croissance	(5)	(6)	(8)	(8)
	Nécrose	+++	+++	+	-
100	Croissance	(5)	(8)	(8)	(8)
	Nécrose	+++	+	+	++
300	Croissance	(9)	(8)	(8)	(8)
	Nécrose	+++	-	++++	++++
500	Croissance	(6)	(9)	(4)	(4)
	Nécrose	+	++	++	+++
1000	Croissance	(6)	(10)	(8)	(9)
	Nécrose	+++	++++	++++	-

(n) = nombre d'observations

Acide allantoïque, complément organique azoté:

Lorsque l'acide allantoïque est utilisé comme complément azoté, les résultats obtenus sont beaucoup plus variés, suivant le sucre utilisé (tableaux 3a, et 3b).

Avec le saccharose:

Lorsque les explantats sont mis sur un milieu contenant 1% de saccharose, ceux-ci se développent en touffette. Les feuilles n'ont pas de pétiole. Il n'y a pas non plus de cal à la base de la tige. L'ensemble reste vert. La présence d'acide allantoïque favorise le développement d'un petit cal vert et un léger allongement des pétioles. La formation d'un cal à la base de la tige est un indice de croissance favorable. Si le cal est trop gros, il indique que le facteur de la croissance est soit trop élevé, soit pas assez élevé. S'il est absent, ceci indique qu'il n'y a pas d'induction de croissance. Idéalement, le cal doit avoir le double du diamètre de la tige (HEGEDUS, Comm. pers.). Si la concentration d'acide allantoïque est de 1000 mg/l, les explantats nécrosent irrémédiablement (tableau 3a). Avec 2% de saccharose, nous avons constaté le même phénomène: plus la concentration d'acide allantoïque augmente, plus les explantats deviennent rouges et les pétioles s'allongent. Le cal aussi augmente de volume.

Avec le glucose:

La présence de glucose dans le milieu de culture donne des résultats totalement différents (tableau 3a). Avec 2% de glucose, sans acide allantoïque, il se produit une nécrose du cal et des pétioles. La présence

d'acide allantoïque (30 mg/l) dans le milieu de culture favorise un épaississement du pétiole et la formation d'un cal friable. Le limbe se développe de façon démesurée. Tout comme le développement du cal, un limbe démesurément grand n'est pas signe de bonne croissance. Si la concentration d'acide allantoïque augmente à 300 mg/l, le pétiole s'affine, le limbe est plus réduit. A cette concentration, le limbe est plus vert que rouge. A 1000 mg/l d'acide allantoïque, le pétiole est normal, mais un énorme cal est présent à la base de la tige. Avec 3% de glucose, sans complément azoté, les explantats sont très rouges, presque pourpres.

Tableau 3a: Effet de différentes concentrations d'acide allantoïque en présence de glucose et de saccharose sur la croissance des vitroplants d'*Acer saccharum* au stade d'initiation, après 3 semaines de culture.

Conc. des sucres	Description	Concentration d'acide allantoïque (mg/l)			
		0	30	300	1000
Saccharose 1%	N	9	7	7	8
	Cal	-	+	+	
	Pétiole	-	-	Petit	
	Limbe	++	++	++	
	Tige	-	-	-	
	Couleur	vert	Vert	Rougeur	
	Aspect	touffette	touffette	touffette	Nécrose
Saccharose 2%	N	11	8	8	8
	Cal	-	+	-	
	Pétiole	-	-	Petit	
	Limbe	++	++	++	
	Tige	-	-	-	
	Couleur	Vert	Vert-rouge	Rougeur	
	Aspect	touffette	touffette	Touffette	Nécrose
Glucose 2%	N	8	8	8	8
	Cal	-	Friable	++	+++
	Pétiole		Cal. All.	Épais, all.	Fin, petit
	Limbe		++++	+++	++
	Tige		-	-	-
	Couleur		Rouge	Vert-rouge	Vert-rouge
	Aspect	Nécrose	Nécrose	califié	Disproportionné
Glucose 3%	N	5	8	8	9
	Cal	+++	++	++	
	Pétiole	Cal t. all.	Épais t.all.	Affiné	
	Limbe	++++	++++	++++	
	Tige	-	-	-	
	Couleur	Pourpre	Pourpre	Rouge-vert	Vert-rouge
	Aspect	Califié	Califié	Disproportionné	Normal

Le pétiole est allongé mais califié. Un cal est aussi présent à la base de la tige. Plus la concentration d'acide allantoïque augmente, passant de 0 à 30, 300 et 1000 mg/l, plus le pétiole s'affine et plus la formation d'anthocyane diminue, car les plants passent de pourpres à vert-rouges. L'ensemble de la feuille est bien proportionné. C'est ce dernier milieu qui donne des plantules d'aspect normal et que nous nommerons milieu optimal. Il ressort de cette expérience que l'azote inorganique des sels WPM est capable de fournir une part seulement des besoins requis en azote. L'acide allantoïque en présence d'azote inorganique sont complémentaires car ils améliorent l'effet sur la croissance quand ils sont en

combinaison. SHANTZ et STEWARD (1959) obtiennent des résultats similaires avec l'allantoïne sur des cellules de pomme de terre et de carotte.

Avec le raffinose:

Ce sucre avait été utilisé avec succès dans les cultures de cal d'érable (MATHES, MORSELLI et MARVIN, 1973) et c'est pourquoi nous avons voulu l'utiliser. Avec 2% de raffinose (tableau 3b), la croissance des apex est possible. Les plants sont vert-rouges, le pétiole allongé. Un cal est présent à la base de la tige. La présence d'acide allantoïque n'améliore pas la croissance des plantules. Avec 1000 mg/l d'acide allantoïque les apex deviennent complètement nécrosés.

En résumé, dans nos conditions de culture, le milieu le plus favorable à l'établissement et à la croissance normale des apex était celui renfermant 3% de glucose et 1000 mg/l d'acide allantoïque déterminé comme étant le milieu optimal. Il est possible toutefois que des concentrations supérieures à 1000 mg/l d'acide allantoïque soient meilleures ou qu'une autre source d'azote organique soit aussi favorable à la croissance des apex. Sur les cellules d'*Acer pseudoplatanus*, SIMPKINS, COLLIN et STREET (1970) ont utilisé avec succès de l'hydrolysate de caséine et de l'urée. PHILLIPS et HENSHAW (1977) ont aussi étudié l'urée sur des cellules d'*Acer pseudoplatanus*. L'emploi de l'urée et de l'hydrolysate de caséine devra être essayé pour la culture des vitroplants d'*Acer saccharum*.

Le raffinose aussi était favorable à l'initiation des apex in vitro. Cependant, à cause de certaines contraintes, nous n'avons pas poursuivi nos expériences avec ce sucre.

Tableau 3b: Effet de différentes concentrations d'acide allantoïque, en présence de raffinose, sur la croissance des vitroplants d'*Acer saccharum*, au stade d'initiation, après 3 semaines de culture.

Conc. du raffinose	Description	Concentration d'acide allantoïque (mg/l)			
		0	30	300	1000
Saccharose 2%	N	8	8		7
	Cal	+	+		
	Pétiole	Allongé	++		
	Limbe	++	++	-	
	Tige	-	-		
	Couleur	Vert-rouge	Vert		
	Aspect	Normal	Petit		Nécrose

Utilisation de régulateurs de croissance

Pour toutes les expériences faites à l'initiation des apex d'érable à sucre, concernant les nutriments carbonés et azotés, nous avons utilisé la kinétine à 1 mg/l avec 0,3 mg/l d'AIA. Le seul autre régulateur de croissance que nous avons testé au stade I est le 2ipA à 10 mg/l. Dans ce milieu de culture les apex ont montré une croissance possible mais avec début de nécrose (non létale). Cette concentration était trop élevée pour l'initiation des apex. Nous avons repris cette même concentration au stade II et les résultats variaient avec les sources de carbone utilisées. Des essais avec différentes cytokinines ont aussi été effectués au stade II.

Développement et multiplication des vitroplants:

L'emploi de cytokinines adéquates constitue le point essentiel au bon développement des vitroplants. L'emploi continu de 1mg/l de kinétine n'a favorisé aucune multiplication des explantats: leur croissance restait stationnaire.

Une étude bibliographique portant sur les régulateurs de croissance de la sève printanière des tiges et des bourgeons d'*Acer saccharum* (WASEEM, 1988) a mis en évidence la présence de plusieurs cytokinines dont les concentrations varient au cours de la saison. Ce qui a retenu notre attention est le changement de rapport 2ip/2ipA opéré entre mi-mars et mi-mai. Au début du printemps le 2ip est beaucoup plus élevé que le 2ipA, alors qu'au moment où les bourgeons débourrent ce rapport 2ip/2ipA s'inverse et devient de l'ordre de 1/8. Cette étude sur la sève d'*Acer saccharum* révèle aussi la présence de l'APA et d'un autre composé indolique. L'APA est une substance ayant une activité auxinique dont le précurseur est la phényl-alanine (figure 3). Les configurations chimiques des cytokinines et des auxines sont reportées aux figures 4 et 5 respectivement, à titre de rappel. Le métabolisme du 2ipA à partir de l'acide mévalonique est illustré à la figure 7.

Multiplication des vitroplants:

Dans le but de déterminer le milieu de propagation optimal nous avons étudié différentes cytokinines sur la croissance de l'érable à sucre.

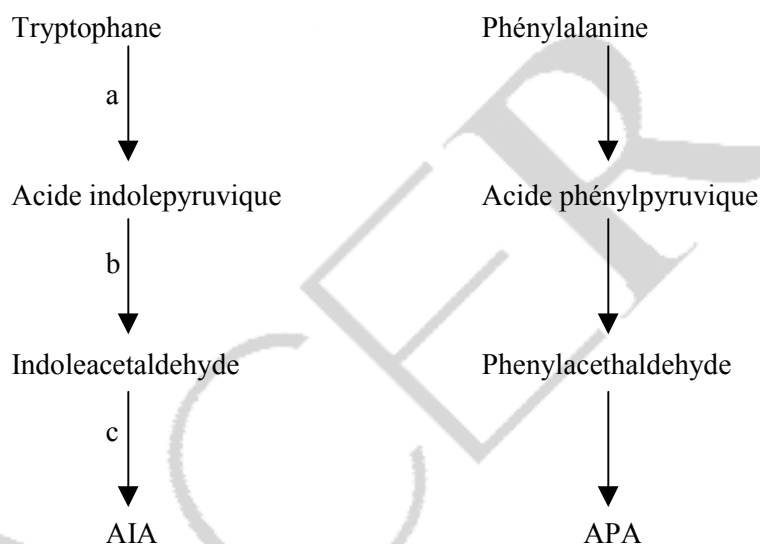


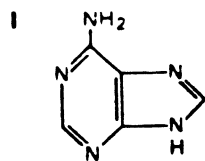
Figure 3: Une voie de synthèse de l'AIA et de l'APA à partir du tryptophane et de la phénylalanine respectivement.

a = tryptophane aminotransférase

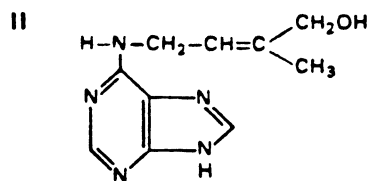
b = acide indolepyruvique décarboxylase

c = indoleacetaldehyde déhydrogénase ou oxydase

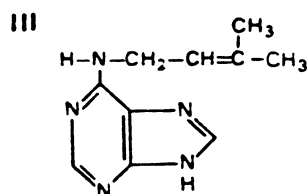
Tiré de: SCHNEIDER et WIGHTMAN (1974).



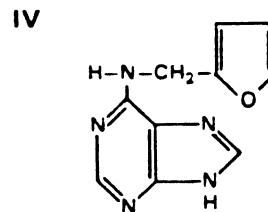
I – Adénine ou 6-aminopurine



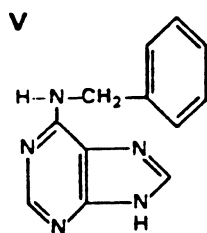
II – Zéatine



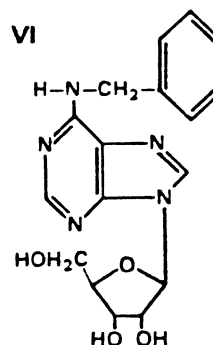
III – Isopentényladénine (IPA)



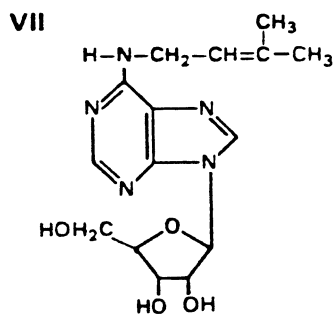
IV – Kinétine (6-furfuryl-aminopurine)



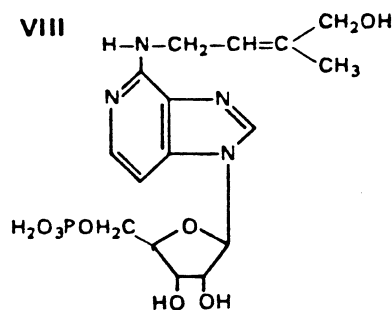
V – Benzyladénine (BA)



VI – Pyranobenzyladénine (PBA) = benzyl-adénosine



VII – Isopentényl-adénosine



VIII – Zéatine ribotide = nucléoside mono-phosphate de zéatine (il existe aussi les formes di et tri-phosphate)

Figure 4 : Adénines et cytokinines naturelles (I, II, III), cytokinines de synthèse (IV,V,VI), cytokinines licés (VII, VIII). Tiré de : CHAUSSAT et BIGOT (1980)

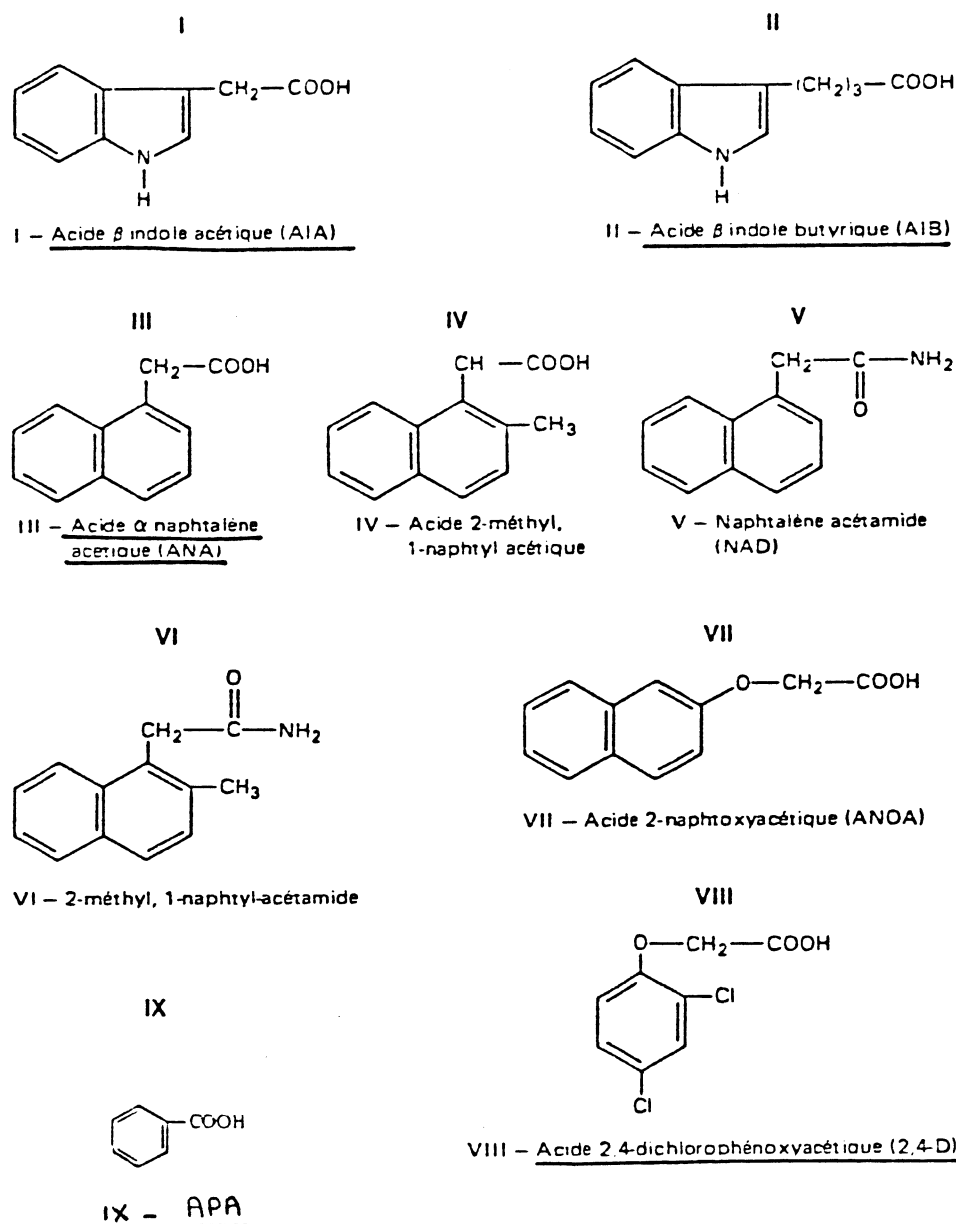


Figure 5 Auxine naturelle (I), auxines de synthèse (II à VIII) et autre substance à activité auxinique, l'acide phényl-acétique (IX). Tiré de CHAUSSAT et BIGOT (1980)

Première expérience

Cette première expérience est une continuation des essais faits au stade 1. Nous avons différents sucres et comme constante 10 mg/l de 2ipA. Les résultats obtenus (tableau 4) ont montré que suivant la source de carbone employée nous avons un ou plusieurs bourgeons formés sur un même cal. Ainsi, au 2ième repiquage, 42% des plants avaient plus qu'un bourgeon adventif formé sur le cal avec 3% de glucose. Les bourgeons sur ces cals ont été induits, formés mais sans toutefois montrer d'allongement spectaculaire.

Deuxième expérience:

Les différentes concentrations de 2ipA que nous avons étudié ont été: 2, 5 et 10 mg/l (tableau 5). La concentration de 5 mg/l s'est avérée être la plus bénéfique pour les vitroplants d'Acer saccharum puisqu'elle favorisait multiplication et un certain allongement.

Autres essais:

Afin de vérifier si le rapport hormonal 2ip/2ipA = 1/8 pouvait favoriser le débourrement des bourgeons, nous avons utilisé 2 lots de concentration, respectant ou non ce rapport:

lot 1: 2ip 1,5mg/l + 2ipA 12 mg/l

lot 2: 2ip 1,5mg/l + 2ipA 10 mg/l

Après 15 jours de culture in vitro, les résultats obtenus ont montré que le lot 1 favorisait la multiplication des bourgeons par un facteur de 3, mais toujours avec une tige dominante. Après ce laps de temps, les explantats étaient stationnaires. L'allongement et le développement des nouveaux bourgeons ne se faisaient pas. Le lot 2, par contre, a favorisé une induction des bourgeons plus faible: si les explantats restaient plus de 15 jours dans ce milieu, les bourgeons formés ne s'ouvraient pas; la tige principale dominante s'allongeait (pouvant atteindre 1 cm) puis se lignifiait très rapidement de façon irrémédiable. Les plantules du lot 2 ont produit un aoûtement. Les feuilles ont bruni et les vitroplants sont rentrés en dormante.

Il ressort de ces expériences que le rapport hormonal doit être particulièrement précis chez l'érable à sucre car une balance hormonale non équilibrée peut entraîner la mort de l'explantat.

Deux autres hormones ont été essayées: le BA à une seule concentration (0,25 mg/l) et le thidiazuron (0,025 et 0,05 mg/l)(tableau 5).

Tableau 4. Effet de la source carbonée sur l'induction de nouveaux bourgeons au stade 2 de la propagation in vitro d'apex d'Acer saccharum mature, après le 2^{ème} repiquage au 21^{ème} jour de culture.

Milieu*	Nombre d'explantats	Nombre d'explantats bourgeonnés	Explantats avec un seul bourgeon	Explantats avec plus qu'un bourgeon		
		%		%		
3% glucose	19	17	89.5	9	8	42.1
1% glucose +1,5% manitol	15	13	86.7	14	1	6.7
2% raffinose	12	12	100	8	4	33.4
1% saccharose	11	10	90.9	8	2	18.2
1% saccharose + 1,5% manitol	5	5	100	5	-	

* Tous les milieux contiennent du 2ipA (10 mg/l)

Les résultats que nous avons obtenus avec 0,25 mg/l de BA (tableau 5) ont montré un développement lent des bourgeons montrant un allongement de la tige. Le limbe était réduit. Nous avons observé la formation d'anthocyanes (les plants étaient rouges) comparativement aux explantats du milieu contenant 5 mg/l de 2ipA qui restaient verts.

Le thidiazuron (figure 6), connu comme herbicide, a été utilisé pour la première fois comme défoliant du coton. MOK et al. (1982) ont montré qu'à faible concentration ce produit avait une activité comparable aux cytokinines: c'est la plus active des cytokinines de type adénine.

Le thidiazuron a été utilisé avec succès sur certaines cultures de plantes ligneuses: *Malus* sp. (VAN NIEUWKERK et al., 1986) et *Acer X freemanianum* (MEYER, 1986). Plus récemment, le thidiazuron a été utilisé in vitro sur *Azalea* (BRIGGS et al., 1988), *Acer rubrum* et *Acer saccharum* juvéniles (BRASSARD et al., 1988). Ce produit n'a jamais encore été utilisé sur du matériel centenaire. D'après WINTON (1978) le pourcentage élevé de succès obtenu sur du matériel juvénile, ne garantit pas de succès avec du matériel plus âgé. A titre d'exemple, une méthode développée pour la multiplication clonale de l'*Eucalyptus citriodora* à partir de germination a été trouvée inefficace pour des bourgeons provenant d'arbres de 20 ans. La propagation in vitro d'arbres matures requiert de profondes modifications des milieux et des conditions de culture (GUPTA et al., 1981 et 1980).

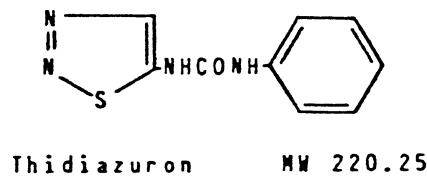
Le thidiazuron a été étudié à 2 concentrations: 0,025 et 0,05 mg/l. Ces 2 concentrations ont donné le même résultat: une prolifération du cal au détriment des bourgeons. Les bourgeons étaient rouges, réduits, frisés, difformes. La prolifération du cal était plus importante avec 0,05 mg/l de thidiazuron. Nous n'avons pas essayé le thidiazuron en présence d'autres cytokinines pour vérifier le synergisme des hormones, comme le suggère BRIGGS et al. (1988).

Cependant, le thidiazuron utilisé aux mêmes concentrations a donné des résultats spectaculaires lorsque les vitroplants étaient mis dans ces milieux et laissés à l'obscurité durant 15-21 jours (tableau 5):

- 0,025 mg/l semblait favorable au débourrement des bourgeons adventifs formés. Une tige dominante était présente. Nous avons observé une prolifération du cal sur lequel 4 nouveaux bourgeons se sont formés.
- 0,05 mg/l de thidiazuron favorisait une prolifération du cal et l'allongement des pétioles des nouveaux bourgeons. Les pétioles pouvaient atteindre 1,5 cm. Cette concentration favorisait une très nette dominante apicale.

Tableau 5: Effet de différentes concentrations de cytokinines (2ipA, BA et thidiazuron) sur la croissance des vitroplants d'érable à sucre, après 21 jours de culture.

Cytokinines	Concentration en mg/l	Nb expl.	Couleur	Multiplication	Allongement	Stationnaires	Nécrose	Cal
2ipA	2	8	vert	-	+	+	-	+
	5	12	Vert	+++	++	-	-	++
	10	10	Vert	++	+	-	+	+++
BA	0.25	7	Rouge	-	+	+	-	-
Th *	0.025	5	Vert	+++	+	-	-	++
	0.05	5	Rouge	+	+	-	-	+++
* Les plantules mises avec le thidiazuron (Th) ont été placées à l'obscurité durant 15-21 jours, puis transférées sur un milieu contenant 5 mg/l de 2ipA, 16 h lumière.								



(N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea),

Figure 6 : Thidiazuron : phényl-urée stable

Les sels minéraux:

La présence d'anthocyanes dans les vitroplants d'érable à sucre après 3-4 mois de culture in vitro indiquait la présence d'un stress. Ce phénomène pouvait être expliqué de différentes façons:

- 1 La couleur rouge des vitroplants peut être causée par la concentration trop élevée d'un régulateur de croissance. Dans ce cas, la couleur rouge est accompagnée d'un grossissement considérable du cal (KERNES et MEYER 1986).
- 2 La couleur rouge des vitroplants peut être causée par une carence en azote.

En comparant les rapports pondéraux des éléments minéraux de différents sels tels MS, WPM et B5 avec ceux que l'on retrouve dans les feuilles d'érable à sucre (annexe 2), nous avons constaté que la composition des sels WPM se rapproche le plus de la composition minérale de ces feuilles. Cette comparaison souligne également une déficience en N.

Nous avons constaté que l'emploi des sels MS (annexe 1) dilués aux 3/4 de leur force permettait d'une certaine façon de compenser cette carence en azote: si les sels minéraux MS dilués aux 3/4 sont plus faibles que ceux de WPM, leur concentration en azote leur est supérieure et supporte une croissance adéquate des vitroplants.

Des essais effectués avec le milieu B5 ont montré que ce dernier permet dans un premier temps un reverdissement des vitroplants et un développement normal, mais entraîne une nécrose des explants lorsque ce milieu est utilisé à répétition.

Ce sont donc les sels minéraux MS dilués aux 3/4 de leur force qui ont été utilisés pour la suite des expériences de propagation. Une étude très particulière devrait cependant être effectuée dans ce domaine, sachant que la forme sous laquelle un sel est donné pour un élément, constitue un facteur important pour le développement de l'explant (DEBERGH, 1988).

En résumé, les vitroplants d'érable à sucre mature ont une croissance particulière. Leurs réactions au milieu de culture utilisé sont lentes. Parmi les essais effectués, nous avons retenu ceux contenant 5 mg/l de 2ipA et 0,025 mg/l de Th dont les plantules sont placées à l'obscurité pendant 15 à 21 jours puis transférées dans 2ipA (5 mg/l).

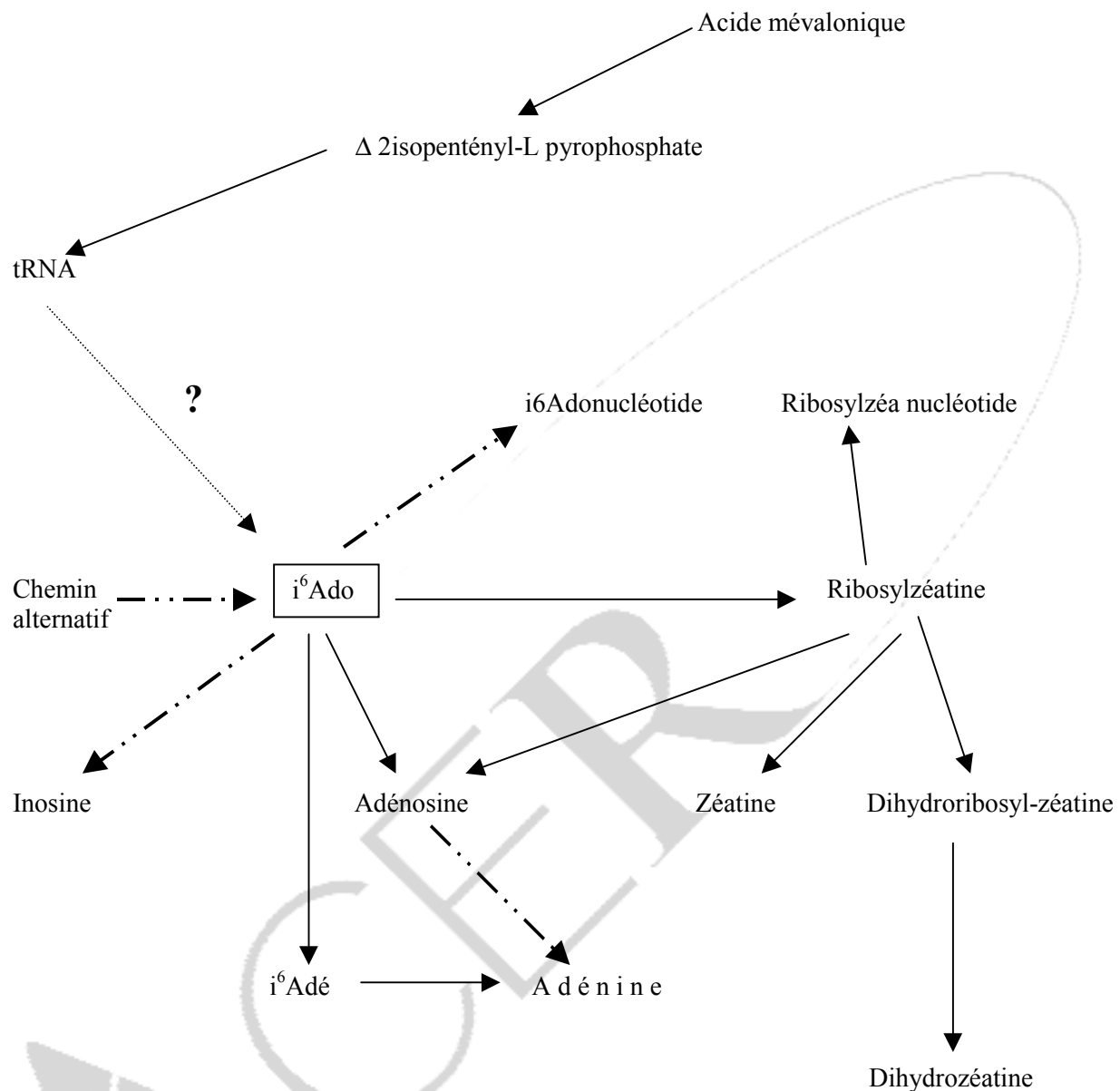


Figure7: Métabolisme du 2ipA à partir de l'acide mévalonique. Tiré de:HALL (1973).

- .-.-.- tissu animal seulement.
- tissu végétal seulement.
- évidence indirecte.

Allongement de la tige principale

Il ressort de nos expériences effectuées lors de la multiplication des explantats d'érable à sucre que l'allongement de la tige principale et des tiges adventives constitue depuis le début du stade II un problème majeur. Dès le 2^{ème} mois de culture in vitro, nous avons d'une façon générale la formation d'un -cal tenant lieu de tige et l'allongement des pétioles organisés autour de l'apex. Les nouveaux bourgeons adventifs prenaient naissance de façon bien définie, sur le cal, opposés les uns aux autres, suivant le même patron qu'un bourgeon in vivo. Ceci nous a donc amené à penser que la croissance de la tige se faisait en largeur plutôt qu'en hauteur.

Par la suite, dépendant des milieux utilisés nous avons la formation d'une -tige principale et le développement de bourgeons adventifs pouvant atteindre 1 cm mais qui pouvaient ainsi rester stationnaires, sans éclore, durant plusieurs mois.

Il est donc aisé d'initier puis d'induire des bourgeons adventifs mais leur allongement est très lent et difficile à obtenir. BOULAY (1987) indique aussi que l'initiation de méristémoïdes ou de bourgeons provenant de plantes ligneuses est possible mais que l'élongation de tels bourgeons est difficile. Ce problème d'allongement est donc général pour les plantes ligneuses et plus encore pour les arbres matures. Le fait d'étêter la tige principale dominante ne favorise en aucun cas l'éclosion des bourgeons adventifs. De plus, la coupe et les blessures faites lors des repiquages successifs provoquent un stress sur l'explantat tel qu'il peut entraîner une inhibition totale des bourgeons adventifs. Même les cals se développant à la base des tiges et sur lesquels se développent des bourgeons adventifs peuvent avoir une croissance arrêtée. L'intérieur des cals est vert, l'extérieur souvent marron avec des points nécrosés. Il n'y a pas de diffusion de phénols dans le milieu de culture.

Un dernier point à noter est que les explantats provenant d'arbres matures ne commencent pas à se développer avant 6-10 mois de culture in vitro (GEORGE et SHERRINGTON, 1984).

Dans le but de faire allonger la tige principale et de faire éclore les bourgeons adventifs, nous avons effectué différentes expériences, parmi lesquelles nous retrouvons l'emploi de mélanges cytokinine-auxine, de mélange de cytokinines, l'emploi de l'acide gibbérique etc... L'emploi d'un milieu sans hormone provoque un ralentissement de la croissance.

Cytokinine + auxine:

Les résultats obtenus sont relevés dans le tableau 6.

Lorsque l'AIA est utilisé avec la kinétine, il se produit un léger allongement des vitroplants sans toutefois favoriser de multiplication. En présence du 2ipA, l'AIA entraîne une nécrose de l'apex et une dégénérescence du cal. Avec de plus faible concentration de 2ipA, l'AIB entraîne aussi de façon générale des nécroses irréversibles. D'après MORSELLI (Comm. Pers*), l'IAIA inhibe légèrement le développement de l'apex, tandis que la kinétine, le NAA et l'acide ascorbique inhibent la croissance des primordia foliaires. Nous n'avons pas essayé le NAA. La présence d'auxine ne semble pas à prime abord être nécessaire à la propagation d'Acer saccharum. Cependant, nous avons voulu faire un essai avec l'APA, auxine que l'on retrouve dans la sève printanière de l'érable à sucre (WASEEM 1988). Avec une concentration de 0,3 mg/1 d'APA, et en présence de 3 mg/1 de 2ipA, l'allongement de la tige principale se produit. Le développement des bourgeons adventifs est favorisé quant à lui par la combinaison 0,375 mg/1 2ip + 3 mg/1 2ipA + 0,3 mg/1 APA (tableau 6). Donc, si l'on se réfère à nos expériences faites suivant le rapport $2ip/2ipA = 1/8$, un des éléments qui semblait bloquer l'allongement des bourgeons formés pourrait être l'absence d'APA.

Les résultats obtenus ont montré qu'au cours des repiquages successifs, le taux de croissance et de multiplication est plus lent. Il semble que les besoins hormonaux des vitroplants dépendent de leur stade physiologique de développement. Il est donc essentiel de déterminer les séquences de développement des vitroplants d'érable à sucre, en fonction de leur besoin.

Autres essais:

Toujours dans le but de faire allonger la tige principale, nous avons fait différentes expériences. Citons-en trois d'entre elles: l'emploi de l'acide gibbérélique, de l'auxine seule et de la lumière.

L'acide gibbérélique:

Toutes les expériences effectuées avec l'acide gibbérélique ont été sans succès concernant l'allongement de la tige principale.

Tableau 6: Effets de différentes cytokinines à différentes concentrations en présence d'auxine sur la croissance des vitroplants de l'érable à sucre après 21 jours de culture.

Hormones utilisées (conc. en mg/l)	Multiplication	Allongement	Stationnaire	Nécrose	Cal	N
K + AIA						
1 + 0,3	-	+	+	-	+	10
2ipA + AIA						
10 + 0,3	-	++	-	+++	++	10
2ipA + AIB						
2 + 0,1	-	-	-	++	++	8
2 + 0,3	+	+	+	+	+	5
5 + 0,1	-	-	+	++	-	5
2ipA + APA						
3 + 0,1	-	+	+	-	+	6
3 + 0,3	+	++	+	-	+	9
5 + 0,1	+	+	+	+	-	5
2ip + 2ipA + APA						
0,375 + 3 + 0	-	-	-	+	-	6
0,375 + 3 + 0,3	+	++	-	-	+	5

L'auxine seule:

En l'absence de cytokinine, l'APA (5 mg/l) avec 1 mg/l d'AIA, favorise l'allongement de la tige principale, l'allongement des bourgeons axillaires et l'allongement des limbes et des pétioles (figure 8). Cependant, après plus de 14 jours, ce milieu de culture n'est plus favorable. Les feuilles finissent par tomber: l'explantat nécrose et dégénère au bout de 28-36 jours. Nous n'avons pas observé la formation de racines mais seulement de petits points calleux blancs.

La lumière:

La lumière constitue un élément important qui doit être pris en considération dans l'étude des plantes ligneuses, surtout matures. Pour donner quelques exemples:

GUPTA et al. (1980) utilisent une intensité de 1000 Lux avec une photopériode de 18 heures pour les vitroplants de teck provenant d'arbres centenaires.

COLEMAN et THORPE (1977) utilisent une lumière continue (cool white) ayant une intensité lumineuse de 2000 Lux pour la culture du Thuja plicata.

McCOWN et AMOS (-utilisent aussi une lumière continue de 3000 Lux pour la micropropagation de Betula platyphylla.

ANDERSON (1975) utilise une intensité lumineuse de 1000 Lux (cool white) avec une photopériode de 16 heures lumière pour les vitroplants de Rhododendron.

Ainsi, nous pourrions citer beaucoup d'exemples concernant l'emploi d'une intensité lumineuse faible, d'une photopériode particulière ou encore l'emploi de longueurs d'onde particulière pour favoriser la croissance des vitroplants. MORSELLI (Comm. pers.) insiste sur l'importance d'une lumière continue de faible intensité (1500 Lux) pour le développement des vitroplants d'Acer saccharum. Nous n'avons pas vérifié son affirmation, mais nous avons effectué 2 essais en lumière continue, l'un d'entre eux ayant donné des résultats spectaculaires. Les plantules ayant été traitées au thidiazuron durant 2 semaines à l'obscurité, ont été transférées sur un milieu contenant 5 mg/l 2ipA. Après un mois, les vitroplants ont été

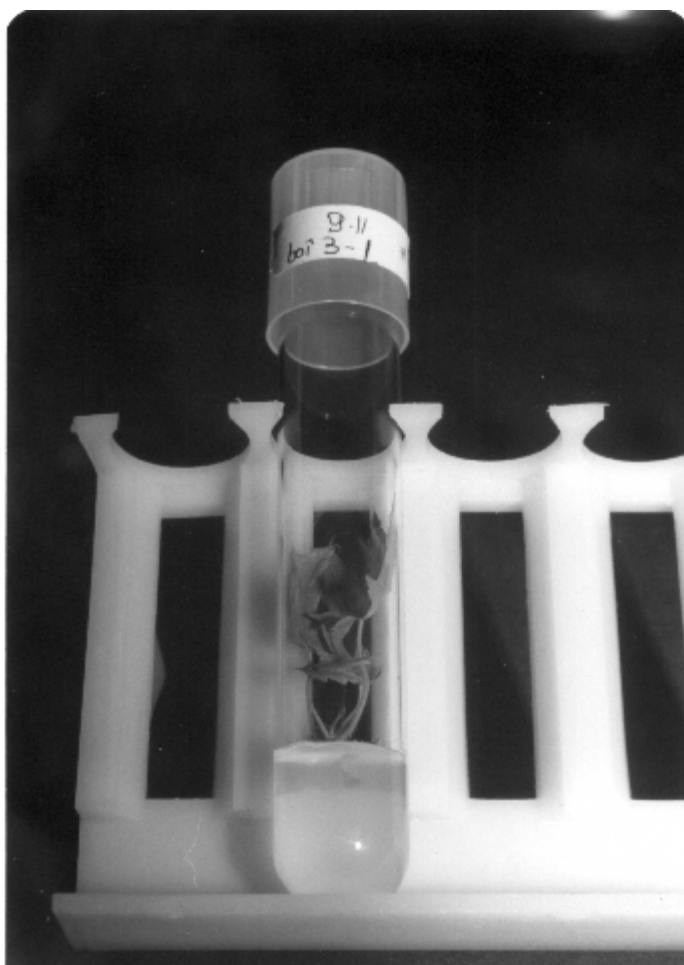


Figure 8 : Vitroplant d'*Acer saccharum* mature dont l'allongement est favorisé par 5 mg/l d'APA et 1 mg/l d'AIA, 10 jours après le repiquage. Le plant a 7 mois de culture in vitro.

transférés sur un milieu contenant 3 mg/l de 2ipA + 0,3 mg/l d'APA et mis sous une lumière continue. Les bourgeons adventifs issus des cals se sont développés également sans dominante apicale. Ces résultats très prometteurs doivent être vérifiés car, nous n'avons pas pu répéter cette expérience en raison d'un manque de matériel et de temps.

Il se peut donc que la lumière telle que l'indique Morselli, joue un rôle important sur le développement des vitroplants d'érable à sucre.

En résumé, il est important de souligner qu'au stade II, nous pouvons utiliser la séquence suivante:

Th (0,025 mg/l)--- à l'obscurité pendant 15-21

jours transfert sans coupe dans:

2ipA (5 mg/l)--- pendant 28 jours

transfert sans coupe dans:

2ipA (3 mg/l + APA (0,3 mg/l) --- pendant 28 jours lumière continue.



Conclusion

Les résultats que nous avons obtenus constituent une première étape importante dans la micropropagation de l'érable à sucre mature puisqu'aucune publication n'a encore été faite sur ce sujet. La culture in vitro d'Acer saccharum se heurte à l'horloge biologique de l'arbre, non rompue lorsque celui-ci est en micropropagation, et donc à sa dormance profonde.

Par le biais de certaines hormones notamment le thidiazuron utilisé dans des conditions particulières, l'APA et le 2ipA, nous avons obtenu un certain succès favorisant la multiplication in vitro et l'allongement des tiges. Il ressort aussi de nos expériences que les vitroplants d'Acer saccharum mature requièrent un temps minimum pour atteindre un équilibre physiologique endogène permettant l'établissement des cultures.

Il va sans dire que bon nombre d'expériences restent encore à être réalisées pour l'obtention d'un succès total dans la culture in vitro de l'érable à sucre centenaire. Les expériences effectuées sur les plantes ligneuses matures font l'objet d'une étude difficile qui mériterait plus d'attention.



Bibliographie

- ABBOTT, D.L. (1970). The role of bud scales in the morphogenesis and dormancy of the apple fruit bud. In: Physiology of Tree Crops. Proceedings. Luckwill and Cuttings (Eds.). Academic press. London, N.Y. pp. 65-82.
- ANDERSON, W.C. (1975) : Propagation of Rhododendrons by tissue culture: part 1. Development of a culture medium for multiplication of shoots. The Int. Plant Prop. Soc., 25: 1290 135.

- BERNIER, B. M. BRAZEAU et C. CAMIRE (1984): Recherches sur le dépérissement et le statut nutritif de l'érablière, des Appalaches au Québec. Rapport du projet Ecl. 83-3.
- BONGA, J.M. (1981): Organogenesis of tissues from mature conifers. *In Vitro*, 17 (6):511-518.
- BOULAY, M. (1978): Multiplication rapide du *Seouoia sempervirens* en culture *in vitro*. *Ann AFOCEL* 1977.
- BOULAY, M. (1987). *In vitro* Propagation of tree species. In: *Plant tissue and cell culture*. Alan R. Liss Inc. (Ed.)-& 367-382.
- BRASSARD, N.; J.J. LETTRE, P. NEWMANN et J.F. LALIBERTE (1988): *In vitro* shoot proliferation of *Acer saccharum* and *A. rubrum*. *Inter. Ass. of Plant Tissue Culture*. Ottawa, may – june 21
- BRIGGS, B.A., S.M. McCULLOCH, L.A. EDICK (1988): Micropropagation of Azaleas using thidiazuron. *Acta Horticulturae – Vegetative propagation of Woody Species*, 227: 330-333.
- BROWN, C.L. et H.E. SOMMER (1982). Vegetative propagation of dicotyledonous trees. In: *Tissue Culture in Forestry*. et Durzan (Eds.). Martius Nijhoff. Bonga Dr. Junk publisher. pp. 109-149.
- CHAUSSAT, R. et C. BIGOT (1980). La multiplication végétative des plantes supérieures. Gauthier - Villars. 277~.
- COLEMAN, W.C. et T.A. THORPE (1977): *In vitro* culture of western red cedar (*Thuja plicata*). 1. Plazlet formation. *Bot. Gaz.*, 138: 298-304.
- DEBERGH, P.C. (1988): Micropropagation of Woody species - state of the art on *in vitro* aspects. *Acta Horticulturae – Vegetative Propagation of Woody Species* - 227: 287-295.
- ECONOMOU, A.S. et M.J.SPANOUDAKI (1988): Regeneration *in vitro* of Oleaster (*Elagnus angustifolia* L.) from shoot tip of mature tree, *Acta Horticulturae*, 227:363-368.
- FREEDMAN, B., P.N. DUINKER, H. BARCLAY, R. MORASH et U. PRAGER (1982): Forest biomass and nutrient studies in central Nova Scotia. *Service Canadien des forêts*, ISSN 0704-769X.
- GAMBORG, O.L., T. MURASHIGE, T.A. THORPE et I.K. VASIL (1976): Plant tissue culture media. *In vitro*, 12(7): 473.
- GEORGE, E.F. et P.D. SHERRINGTON (1984): Plant propagation by tissue culture. *Handbook and directory of commercial laboratories*. Exegetics (Ed.). 709pp.
- GUPTA, P.K.; A.F. MASCARENHAS et V. JAGANNATHAN (1981). Tissue culture of forest trees: clonal propagation of mature trees of *Eucalyptus citriodora* Hook., by tissue culture. *Plant Science Letters*, 20: 195-201.
- GUPTA, P.K.; A.L. NADGIR; A.F. MASCARENHAS et V. JAGANNATHAN (1980). Tissue culture of forest trees: clonal multiplication of *Tectona grandis* L. (Teak) by tissue culture. *Plant Science Letters*, 17: 259-268.
- HALL, R.H. (1973): Cytokinins as a probe of developmental processes. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 24: 415-444.
- HANUS, D. et R. ROHR (1984). Micropropagation de l'érable: recherche d'un protocole expérimental et premières observations. *Actes du 109e congrès national des sociétés savantes*. Ed IMin. Edu. historiques et scientifiques. Nat., comité des travaux Sciences, Fasc. 11.
- HANUS, D. et R. ROHR (1985). Micropropagation de l'érable par bouturage *in vitro* de fragments espèces. *CGŕi . de germination de trois J. Bot.*, 63: 277-280.
- HEGEDUS, P. Communication personnelle.
- HENDERSHOT: Communication personnelle.
- KERNS, H.R. et M.M. MEYER JR. (1986). Tissue culture propagation of *Acer x freemanii* using thidiazuron to stimulate shoot tip proliferation. *HortScience*, 21 (5): 1209-1210.
- LINKENS, G.E. et F.H. BORMANN (1970): Chemical analyses of plant tissues from the Hubbard Brook ecosystem in New-Hampshire. *Yale Univ. School of Forestry, Bull.*, 79.
- LLOYD, G. et B. MC COWN. (1980). Commercially feasible micro-propagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. *Inter. Plant Prop. Soc.*, 30: 421-427.
- MADER, D.L. et B.W. THOMPSON (1969): Foliar and soil nutrients in relation to maple decline. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 33: 794-803.

- MATHES, M.; M.F. MORSELLI and J.W. MARVIN (1973). Use of various carbon sources by isolated maple callus cultures. *Plant and Cell Physiol.*, 14: 797-801.
- MOK, M.C., D.W.S. MOK, D.J. ARMSTONG, K. SHUDO, Y. ISOGAI et T. OKAMOTO (1982): Cytokinin activity of N-Phenyl-NI-1,2,3- thiadiazol=5-Ylurera(thidiazuron). *Phytochemistry*, 21 (7): 1509-1511.
- MORRISON, I.K. (1984): Effet of crown position on foliar concentrations of 11 elements in *Acer saccharum* and *Betula alleghniensis* trees on a till soil, *Can. J. For. Res.*, 15: 179-183.
- MORSELLI, M.F. Communication personnelle.
- MOTHES, S.K. (1961). The metabolism of urea and ureides. *Cane J. Bot.* 39: 1785-1807.
- MURASHIGE, T. et F. SKOOG (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15 : 473-49-Y.
- McCOWN, B.H. et R. AMOS (1979): Initial trials of commercial propagation with birch. *Proc. Inter. Plant Prop. Soc.*, 29: 387-393.
- McLAUGHLIN, D.L., S.N. LINZON, D.E. DIMMA et W.D. Mc ILVEEN (1985): Sugar maple decline in Ontario - Report No ARB-1440850Phyto -Ontario Ministry of the environnement.
- PHILLIPS, R. et G.G. HENSHAW (1977): The regulation of synthesis of phenolics in stationary phase cell cultures of *Acer pseudoplatanus* L. *J. Expl. Bot.*, 28: 785-794.
- PLETSHER, D.H. (1982): White-tailed deer and nutrient cycling in the Hubbard-Brook Experiment Forest, New Hampshire. Ph. D. theses, Yale University.
- PLOUVIER, V. (1948). Sur la recherche du québrachitol et de l'allantoïne chez les érables et le Platane. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 227: 225-227.
- RENAUD, J.P. (1986): rapport du CRA-MAPAQ. SCHNEIDER, E.A. et F. WIGHTMAN (1974): Metabolism of auxin in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 25: 487-513.
- SHANTZ, E.M. et F.C. STEWARD (1959): Investigations on growth and metabolism of plant cells. VII Sources of nitrogen for tissue cultures under optimal conditions for their growth. *Annals of Botany*, 23 (91): 371-391.
- SIMPKINS, I., H.A. COLLIN et H.E. STREET (1970): The growth of *Acer pseudoplatanus* cells in a synthetic liquid medium: response to the carbohydrate, nitrogenous and growth hormone constituents. *Physiol. Plant.*, 23: 385-396.
- TAYLOR, J.S. and E.B. DUMBROFF (1975). Bud, root and growth regulator activity in *Acer saccharum* during the dormant season. *Can. J. Bot.*, 53: 321-331.
- VAN NIEUWKERK, J.P., R.H. ZIMMERMAN et I. FORDHAM (1986) : Thidiazuron stimulation of apple shootproliferation in vitro. *HortScience*, 21: 516-518.
- VIEITEZ, A.M., A. BALLESTER, L. VIEITEZ et E. VIEITEZ (1983): In vitro plantlet regeneration of mature chestnut. *HortScience*, 58 (4): 457-463.
- WASEEM, M. (1988). Les régulateurs de croissance de la sève printanière des tiges et bourgeons d'*Acer saccharum* Marsh.. Relation possible avec la reprise de croissance. Thèse de doctorat. Université de Montréal. Sciences Biologiques. Montréal, Canada. 246~~.
- WANG, S.Y., G.L. STEFFENS et M. FAUST (1986): Breaking bud dormancy i n aPple with a plant bioregulator, thidiazuron. *Phytochemistry*, 25: 311-317.
- WELSH, K.J. et K.C. SINK (1982). In vitro propagation of red maple (résumé). *HortScience*, 17: 533.
- WINTON, L.L. (1978): Morphogenesis in clonal propagation of Woody plants. In: *Frontiers of Plant Tissue Culture* - Thorpe ed. -University of Calgary Press, Canada. pp 419-426.



Remerciements

Nous tenons à remercier: - Mme Lucie CARRIERE, professeur à VITA pour le partage de son laboratoire et avec qui nous avons eu des discussions et des échanges d'idées particulièrement intéressantes.

- M. Guy BOUDREAULT, pour la cueillette des branches d'arbre d'Acer saccharum.

- Mme Louise PETIT, pour avoir dactylographié ce manuscrit.

- M. Alain BEAUDOIN pour les photos des vitroplants.

- Le Dr apportés DO CHI Bao pour les nombreux conseils à notre recherche et pour la rédaction de ce rapport.



Annexe 1

Composition des sels minéraux MS (Murashige et Skoog, 1962), WPM (Woody Plant Medium Lloyd et McCown, 1982) et B5 (Gamborg et al, 1976) en mg/l. –

Sels minéraux	MS	WPM	B5
NH ₄ NO ₃	1650	400	--
KNO ₃	1900	--	2500
Ca (NO ₃) 2. 4H ₂ O	--	556	--
CaCl ₂ . 2H ₂	440	96	150
MgSO ₄ . 7H ₂ O	370	370	250
KH ₂ PO ₄	170	170	--
(NH ₄) ₂ SO ₄	--	--	134
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	--	--	150
KI	0.83	--	0.75
K ₂ SO ₄	--	990	--
H ₃ BO	6.2	6.2	3.0
MnSO ₄ . 4H ₂ O	22.3	22.3	--
MnSO ₄ . H ₂ O	--	--	10
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8.6	8.6	2
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0.25	0.25	0.25
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.025	0.25	0.025
CoCL ₂ . 6H ₂ O	0.025	--	0.025
FeSO ₄ . 7H ₂ O	27.8	27.8	27.8
Na ₂ . EDTA	37.3	37.3	37.3



Annexe 2

Comparaison pondérale entre les rapports des éléments minéraux des feuilles d'érable à sucre et des sels MS, WPM et B5.

Rapport des éléments minéraux	sels MS	sels WPM	sels B5	Feuilles *
N/K	3.59	1.50	1.62	2.40
P/K	0.15	0.27	0.10	0.17
N/P	23.7	5.49	15.46	14.14
Ca/Mg	3.28	3.29	1.68	4.38
N/Ca	23.53	5.43	38.87	2.76
N/Mg	77.22	17.89	65.26	12.12
K/Ca	6.55	3.62	23.96	1.15
Mg/P	0.31	0.30	0.24	1.17

* Ces résultats sont tirés des références suivantes:

MADER et THOMPSON (1969), LIKENS et BORMANN (1970),
PLETSCHER (1982), FREEDMAN et al. (1982), MORRISON (1985),
MC LAUGHLIN et al. (1985), BERNIER et al. (1984),
HENDERSHOT (com. pers.), RENAUD (1986).



Annexe 3

LISTE DES ABREVIATIONS

n = nombre d'explantats
BA = benzyl-adénine
2iP = 2ip-adénine (isopentényladénine)
2ipA = 2ip-adénosine (isopentényladénosine)
Th = thidiazuron
K = kinétine
AIA = acide indole-acétique
AIB = acide indole-butyrique
APA = acide phényl-acétique
NAA = acide naphtalène-acétique
AA = acide allantoïque
WPM = Woody Plant Medium (Lloyd et Mc Cown, 1982)
B5 = milieu B5 (Gamborg et al., 1976) --
MS = sels minéraux MS (Murashige et Skoog, 1962)