

N° d'ordre: 288

50376
1982
115

50376
1982
115

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

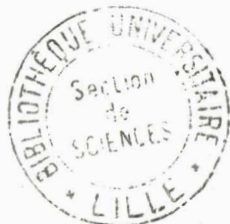
pour obtenir le titre de

DOCTEUR - INGENIEUR

en Biologie et Physiologie Végétale

par

Hervé BROLY



**CONTRIBUTION A LA MULTIPLICATION
CLONALE DES ORCHIDEES :
PHALAENOPSIS, PAPHIOPEDILUM
ET CYMBIDIUM.**



Soutenue le 14 Janvier 1982
~~Décembre 1981~~ devant la Commission d'Examen

R. BOURIQUET	Président
J. PARISOT	Rapporteur
J. DUBOIS	
C. BICOT	

R E M E R C I E M E N T S

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Physiologie Végétale de l'Université des Sciences et Techniques de Lille 1, sous la direction de M. le Professeur BOURIQUET. Je tiens à lui apporter toute ma reconnaissance pour l'aide qu'il m'a prodiguée au long de cette étude ainsi que lors de la réalisation de ce manuscrit.

J'adresse mes remerciements les plus chaleureux à M. Jean PARISOT, ingénieur agronome, responsable du Laboratoire de Multiplication Végétative aux Ets Vacherot et Lecoufle à Boissy St Léger, pour sa participation au Jury de cette thèse et qui a accepté de se charger du rapport. J'ai beaucoup apprécié la gentillesse constante de son accueil et de son aide.

Mes remerciements vont aussi à M. Jean DUBOIS, Maître-Assistant à l'Université des Sciences et Techniques de Lille, membre du Jury, pour les nombreuses heures qu'il m'a consacré à m'aider et à m'écouter.

Je remercie également M. Claude BIGOT, Maître de Conférence à l'Ecole Nationale Supérieure d'Horticulture de Versailles pour sa participation au Jury de cette thèse.

En dehors des membres du Jury, je voudrai exprimer ma reconnaissance à M. Michel VACHEROT des Ets Vacherot et Lecoufle à Boissy St Léger, pour son accueil très chaleureux ainsi que pour la fourniture du matériel végétal indispensable à la réalisation de ce travail.

J'ai également grandement apprécié les discussions que j'ai eu avec M. Bernard LEGRAND et je le remercie d'avoir su m'écouter avec beaucoup d'attention et m'aider dans cette étude. Que

l'amitié qui s'est installée entre nous soit toujours aussi fructueuse.

Mes remerciements vont aussi aux membres du Laboratoire de Physiologie Végétale, Melle C. BRASSART et MM. MORVAN, VASSEUR, RAMBOUR et COUILLEROT ainsi qu'au personnel technique pour l'aide amicale qu'ils m'ont toujours accordée.

-----oCo-----

S O M M A I R E

HISTORIQUE

I)	LA MULTIPLICATION VEGETATIVE IN VIVO DES ORCHIDERS.	p	1
A)	LES PLANTES A DEVELOPPEMENT SYMPODIAL.		1
B)	LES PLANTES A DEVELOPPEMENT MONOPODIAL.		1
C)	LES PLANTES PRESENTANT DES PHENOMENES DE VIVIPARITE SPONTANEE.		2
D)	LES FACTEURS D'INDUCTION DES PLANTULES ADVENTIVES CHEZ LE PHALAEENOPSIS.		2
	1) Développement des méristèmes axillaires à l'aisselle des feuilles.		3
	2) Développement des méristèmes axillaires situés sur la hampe florale.		4
	a) Influence de la température et de la durée d'éclairement.		4
	b) Influence des régulateurs de croissance.		5
II)	DE LA MULTIPLICATION VEGETATIVE IN VIVO A LA MULTIPLICATION CLONALE IN VITRO.		7
III)	LA MULTIPLICATION VEGETATIVE IN VITRO.		9
A)	LA PROPAGATION CLONALE DU CYMBIDIUM.		9
	1) Les différentes techniques de culture des méristèmes.		12
	a) Méristème apical et méristème axillaire.		12
	b) Choix du milieu de culture.		13
	2) La multiplication des protocormes.		13
	a) Influence de l'état physique du milieu.		13
x	b) La formulation des solutions minérales.		14
	c) Les sucres.		15
	d) Les additifs organiques complexes.		15
	e) Les régulateurs de croissance.		16
	e.1 Influence des facteurs de croissance sur la multiplication des protocormes.		16
	e.2 Influence des régulateurs de croissance sur la différenciation des plantules.		17
	f) Le pH du milieu de culture.		18
	g) La lumière et la température.		18
	3) La croissance des plantules in vitro.		18
	4) Les autres méthodes de multiplication végétative du Cymbidium.		19
			21

B) LA PROPAGATION CLONALE DU PHALAENOPSIS.	21
1) Culture de méristèmes terminaux et axillaires.	21
2) La culture de noeuds de hampes florales.	21
a) Méthodes ne faisant pas intervenir le stade protocorme.	21
a.1 Influence de la position et du mode de prélèvement de l'explantat.	23
a.2 Influence du génotype.	24
a.3 Influence de la composition minérale du milieu.	24
a.4 Influence des régulateurs de croissance.	25
a.5 Influence de la température et de la lumière.	25
a.6 Influence des régulateurs de croissance.	26
b) Néof ormation de protocormes par culture de fragments de hampes florales.	27
3) Culture de fragments de feuilles.	28
4) Culture d'extrémités de racines.	29
5) Culture de pousses feuillées.	29
6) La culture des protocormes.	29
7) La culture de protoplastes.	30
C) LA PROPAGATION CLONALE DU PAPHIOPEDILUM.	31
D) LA PROPAGATION CLONALE DES AUTRES ORCHIDEES.	32
IV) LIMITES ET PROSPECTIVES DES TECHNIQUES DE MULTIPLICATION.	44

RESULTATS

I) LA MULTIPLICATION VEGETATIVE DU PHALAENOPSIS.	47
A) LA MULTIPLICATION VEGETATIVE IN VIVO.	47
B) LA MULTIPLICATION VEGETATIVE IN VITRO.	50
1) La culture de fragments de plantules de semis.	50
a) Matériel et méthodes.	50
a.1 Origine du matériel végétal.	50
a.2 Préparation des explantats.	50
a.2.1 Fragments de feuilles.	50
a.2.2 Fragments de tige.	50
a.2.3 Fragments de racines.	51
a.2.4 Méristèmes axillaires et terminaux.	52
a.3 Préparation des milieux de culture.	52

a.4 Conditions de culture.	54
b) Résultats.	54
b.1 Culture de fragments de tige.	54
b.1.1 Développements des explantats en absence de régulateurs de croissance.	56
b.1.2 Influence des régulateurs de croissance.	57
b.1.2.1 Les auxines.	57
b.1.2.1.1 L'acide naphtylacétique.	57
b.1.2.1.2 L'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique.	57
b.1.2.2 L'acide gibbérellique.	58
b.1.2.3 Les cytokinines.	58
b.1.2.3.1 La kinétine.	58
b.1.2.3.2 La benzylaminopurine. ^{BAP}	58
b.1.2.3.2.1 Observations morphologiques.	58
b.1.2.3.2.2 Observations anatomiques.	62
b.1.2.3.3 L'isopentényladénine.	62
b.1.2.3.4 La benzyl-tetrahydropyranyl-adénine.	68
b.1.2.4 Les associations de régulateurs de croissance.	69
b.1.2.4.1 L'association BAP - auxine.	69
b.1.2.4.2 Les associations BAP - PBA - IPA.	71
b.1.2.4.2.1 Les associations BAP - IPA et BAP - PBA.	71
b.1.2.4.2.2 Association PBA - IPA.	72
b.1.2.4.3 Association BAP - acide transcinnamique.	73
b.1.2.4.4 Association BAP - composés organiques à faible action cytokinique.	75
b.1.2.4.5 Association BAP - éthylène.	78
b.1.3 Influence des conditions de culture et de la composition du milieu sur le bourgeonnement des fragments de tige.	78
b.1.3.1 Influence des facteurs liés au matériel végétal.	78
b.1.3.1.1 Influence du génotype.	78
b.1.3.1.2 Influence du mode de préparation des explantats.	80
b.1.3.1.3 Influence de la densité de population.	82
b.1.3.2 Influence des conditions de culture.	83
b.1.3.2.1 Influence de la température.	83

b.1.3.2.2	Influence de la lumière.	85
b.1.3.2.3	Influence du pH du milieu de culture.	87
b.1.3.2.4	Influence du support de culture.	90
b.1.3.3	Influence des composants du milieu de culture.	92
b.1.3.3.1	Influence des composés organiques.	92
b.1.3.3.1.1	Influence des sucres.	92
b.1.3.3.1.2	Influence de l'inositol.	93
b.1.3.3.1.3	Influence de la glutamine.	94
b.1.3.3.1.4	Influence des composés organiques complexes.	95
b.1.3.3.2	Influence de la composition minérale.	98
b.1.3.3.2.1	Influence de la formulation des microéléments.	98
b.1.3.3.2.2	Influence du fer.	98
b.1.3.3.2.3	Influence des éléments minéraux majeurs.	100
b.1.3.3.2.3.1	Influence de la concentration en nitrates.	105
b.1.3.3.2.3.2	Influence de la concentration en phosphates.	105
b.1.3.3.2.3.3	Influence de la concentration en K^+ .	106
b.1.3.3.2.3.4	Influence de la concentration en Mg^{++} .	106
b.1.3.3.2.3.5	Influence de la concentration en Ca^{++} .	108
b.1.3.3.2.3.6	Influence de la concentration ionique totale.	108
b.1.3.3.2.3.7	Influence des variations minérales multiples.	109
b.1.3.4	Influence du précédent cultural.	119
b.1.4	Poursuite du cycle de multiplication.	120
b.1.4.1	Culture des plantules mères.	120
b.1.4.2	Culture des bourgeons.	121
b.1.4.2.1	Culture des bourgeons formés sur le milieu de base.	122
b.1.4.2.1.1	Distribution de la taille des bourgeons.	122
b.1.4.2.1.2	Culture de bourgeons de plus de 5 mm.	123
b.1.4.2.1.3	Culture de bourgeons de moins de 5 mm.	123
b.1.4.2.1.4	Influence de la densité de population.	125
b.1.4.2.2	Culture de bourgeons formés sur milieu enrichi en potassium et en phosphore.	131
b.1.5	Culture et multiplication des protocormes.	134
b.1.5.1	Structure anatomique des protocormes de néoformation.	134

b.1.5.2	Influence du mode de dissection sur la multiplication des protocormes.	134
b.1.5.3	Influence de la concentration en régulateurs de croissance et de la présence de charbon actif.	135
b.1.5.4	Influence de la composition minérale, de la concentration en ANA et des composés organiques complexes sur la multiplication des protocormes.	137
b.2	Culture de plantules de semis au stade 2 feuilles.	139
b.3	Culture de feuilles.	140
b.4	Culture de racines.	140
b.5	Culture de méristèmes.	141
2)	Culture de fragments de hampes florales.	144
a)	Obtention des plantules primaires.	144
a.1	Matériel et méthodes.	144
a.1.1	Origine du matériel végétal.	144
a.1.2	Préparation des explantats et mise en culture.	144
a.1.3	Conditions de culture.	145
a.2	Résultats.	145
b.	Multiplication végétative des plantules issues de cultures de bourgeons latéraux de hampes florales.	145
II)	LA MULTIPLICATION VEGETATIVE DU PAPHIOPEDILUM.	149
A)	MULTIPLICATION VEGETATIVE IN VITRO.	149
1)	Matériel et méthodes.	149
a)	Provenance du matériel végétal.	149
b)	Mise en culture.	149
b.1	Culture d'explantats prélevés sur plantules aseptiques au stade 4 feuilles.	149
b.2	Culture de méristèmes.	150
c)	Les milieux de culture.	150
c.1	Culture de fragments de tige.	150
c.2	Culture de méristèmes.	152
d)	Conditions expérimentales.	152
2)	Résultats.	152
a)	Culture de tige.	152
a.1	Séquence de développement.	152

a.2	Influence de la BAP.	153
a.3	Influence du milieu de culture.	153
a.4	Influence de la variété.	154
b)	Culture de méristèmes.	154
B)	LA MULTIPLICATION VEGETATIVE IN VIVO.	155
1)	Matériel et méthodes.	155
a)	Origine du matériel végétal.	155
b)	Préparation des plantes.	155
2)	Résultats.	156
C)	CONCLUSION.	156
III)	CULTURE IN VITRO DE PROTOCORMES DE CYMBIDIUM.	158
A)	MATERIEL ET METHODES.	158
1)	Origine du matériel végétal.	158
2)	Mise en culture.	158
3)	Milieu de culture.	158
4)	Conditions de culture.	159
B)	RESULTATS.	159
1)	L'effet de masse.	159
a)	Courbe de croissance d'une culture.	159
b)	L'effet de masse.	162
2)	Influence de la BAP sur les protocormes de Cymbidium.	164
a)	Influence de la BAP sur la croissance et la multiplication des protocormes.	164
b)	Influence de la BAP sur la différenciation des plantules.	165
b.1	Culture sur milieu gélosé.	165
b.2	Culture en milieu liquide agité.	166
b.3	Influence de la BAP en préculture sur la différenciation des plantules.	167
3)	Conclusion.	168
IV)	CONCLUSIONS GENERALES.	169
	BIBLIOGRAPHIE	190

HISTORIQUE

I) LA MULTIPLICATION VEGETATIVE "IN VIVO" DES ORCHIDEES.

La potentialité de multiplication végétative d'une orchidée dépend avant tout de son type de développement suivant que celui-ci est sympodial ou monopodial et de ses capacités de viviparité.

A) LES PLANTES A DEVELOPPEMENT SYMPODIAL.

Les sympodiales telles que Cymbidium, Odontoglossum, Paphiopedilum, Cattleya etc... se multiplient par division, rejets et boutures.

La division des touffes est la méthode la plus simple. Elle consiste à séparer les pseudobulbes et à les repiquer séparément, chacun produisant alors de nouvelles pousses. Chez le Cymbidium, il est même possible d'utiliser des pseudobulbes âgés et effeuillés, l'isolement levant la dormance des méristèmes axillaires qui démarrent en nouvelles pousses feuillées (Photo 1).

Les pseudobulbes allongés de Dendrobium peuvent être coupés en tronçons de 10 à 15 cm de long. Il faut alors les traiter comme des boutures, les repoter dans un bon mélange de culture et les placer dans un endroit à forte hygrométrie jusqu'à l'enracinement complet.

Lorsque la plante produit des rhizomes ramifiés tel que le Cattleya, on peut la diviser à l'époque du repotage en prenant soin que chaque fragment de rhizome ait une pousse.

B) LES PLANTES A DEVELOPPEMENT MONOPODIAL.

Chez les plantes à développement monopodial, hormis celles présentant des cas de viviparité, il n'y a quasiment aucun moyen de les multiplier végétativement par les méthodes horticoles classiques.

C) LES PLANTES PRESENTANT DES PHENOMENES DE VIVIPARITE SPONTANEE.

Certaines orchidées, telles que Dendrobium et Phalaenopsis, présentent relativement fréquemment des cas de viviparité spontanée tandis que chez le Paphiopedilum fairieanum par exemple, cette observation est exceptionnelle (NIEMANN, 1980). Ce phénomène apparaît généralement au niveau des bourgeons présents sur la hampe florale mais à des étages différents suivant l'espèce. Ainsi chez Phalaenopsis amabilis et equestris, les plantules apparaissent à l'extrémité apicale de la hampe florale. Chez Phalaenopsis cornu-cervi et luedemanniana (INTUWONG & SAGAWA, 1974), schilleriana (Anonyme, 1885) et stuartiana (SCULLY, 1971), les plantules adventives apparaissent aux noeuds de la base de la hampe florale.

Les plantules adventives (keikis) peuvent également prendre naissance à partir des méristèmes axillaires normalement destinés à la formation des tiges florifères, c'est le cas chez Dendrobium phalaenopsis (ROTOR, 1949).

Certaines plantes, telles que Phalaenopsis stuartiana et Neottia nidus-avis, peuvent présenter également des formations adventives sur les racines (CHAMPAGNAT, 1971; SCULLY, 1971; INTUWONG & SAGAWA, 1974).

D) LES FACTEURS D'INDUCTION DES PLANTULES ADVENTIVES CHEZ PHALAENOPSIS.

Au cours d'observations sur les phénomènes de viviparité, certains chercheurs ont tenté d'induire ce phénomène pour faciliter la multiplication végétative, en particulier chez le Phalaenopsis.

Les Phalaenopsis présentent deux types de bourgeons axillaires, les uns situés à l'aisselle des feuilles, les autres sur la hampe florale. Les méristèmes situés sur la partie supérieure de la hampe florale se développent en formant les boutons floraux tandis que ceux situés sur la partie inférieure, restent dormants. Il y aura donc deux possibilités d'induction de

plantules adventives, soit par développement des méristèmes axillaires à l'aisselle des feuilles, soit par développement des yeux dormants de la hampe florale.

1) Développement des méristèmes axillaires à l'aisselle des feuilles.

Le méristème situé à l'aisselle des feuilles a une structure particulière (Fig. 1).

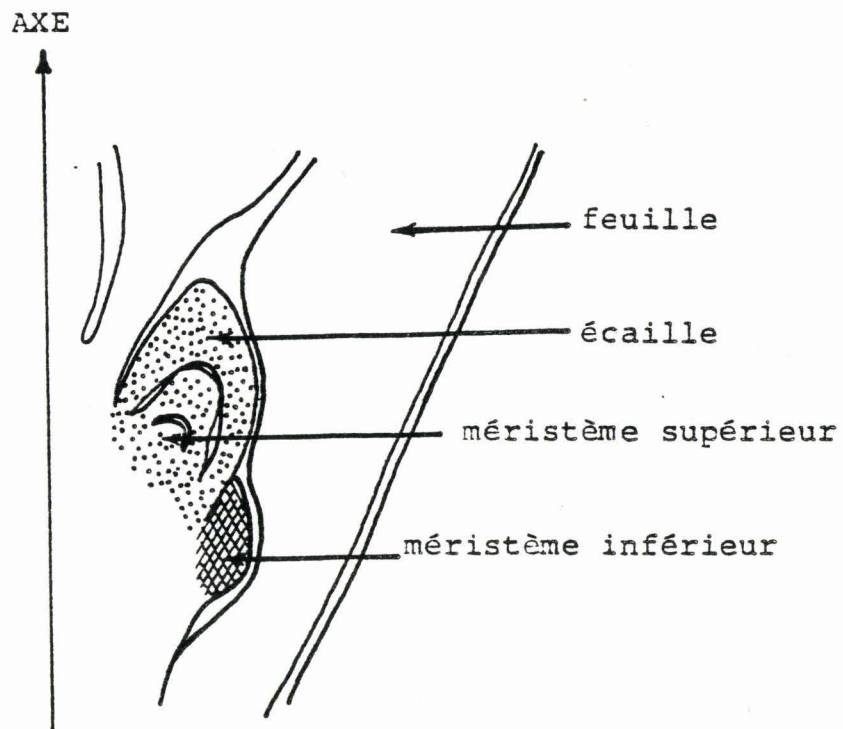


Fig. 1 : Structure du méristème axillaire de *Phalaenopsis* (d'après ROTOR, 1959).

Quand les conditions pour l'initiation florale sont réalisées, l'activité du méristème supérieur s'accroît et on observe alors une elongation rapide de l'inflorescence. Le méristème inférieur demeure inhibé (ROTOR, 1959).

L'inhibition de ce méristème inférieur est en partie due à un phénomène de dominance apicale (ZIMMER & PIEPER, 1979), puisqu'il est possible d'en induire le développement par suppression du méristème apical (technique dite "topping")

(INTUWONG & SAGAWA, 1974; REISINGER, BALL & ARDITTI, 1976). Une plante ainsi traitée placée à 27°, produit 5 à 7 pousses feuillées après deux ans de culture. Un traitement similaire peut être réalisé sur les plantules filles. Par la suite, une alternance de température de 24° de jour et 17° de nuit, provoque une floraison abondante de toutes les plantes adventives (TRAN THANH VAN, 1974).

La formation de plantes adventives sans suppression du méristème apical peut être également obtenue par application de morphactine (acide 9-hydroxyfluorocarbonyl-9-N-butylester) au niveau des méristèmes axillaires (KOCH, 1974 a).

2) Développement des méristèmes axillaires situés sur la hampe florale.

Le développement provoqué des yeux de hampes florales a été obtenu pour la première fois au Brésil en 1938. La technique consistait à entourer les noeuds de sphagnes maintenues humides, une plante adventive se développant parfois (SHARA, 1938, 1952).

Plusieurs facteurs contrôlent le développement des yeux de hampe florale, il s'agit de la température, de la durée d'éclairement et des régulateurs de croissance.

a) Influence de la température et de la durée d'éclairement.

C'est DE VRIES en 1953 qui a constaté l'induction de plantes adventives par l'action de la température. Il travaillait à Bogor (Indonésie) et constatait que dans les conditions climatiques locales (29-34° de jour et 24-25° de nuit), le Phalaenopsis schilleriana développait des hampes qui demeuraient à l'état végétatif et formaient des plantules adventives, alors que lorsqu'il expédiait ses plantes à Tjikopo (26-32° de jour et 18-20° de nuit) celles ci fleurissaient abondamment.

La température conditionne donc en partie le mode de développement des bourgeons axillaires des hampes florales. Une

température constante élevée est primordiale au développement végétatif. Il est même possible d'obtenir la formation de plantules adventives sur des plantes en cours de floraison en les plaçant à 27° après avoir supprimé le méristème apical de la hampe florale. Après 8 à 10 mois, l'application d'une température nocturne basse (17°) provoque le développement de nouvelles hampe florales de type adulte sur les keikis (TRAN THANH VAN, 1974).

La durée d'éclairement joue également un rôle important. Placé en jours courts et à 18°, le Phalaenopsis schilleriana forme de nouvelles hampes florales quelle que soit la période de l'année alors que normalement il ne fleurit qu'une fois en début d'hiver. Placé en jours longs à la même température, l'induction florale est ralentie et des pousses adventives peuvent apparaître sur la hampe florale (ROTOR, 1959).

b) Influence des régulateurs de croissance.
.....

HORICH (1966) puis TEWS (1974) reprirent les expériences de SHARA (1938). Ils remplacèrent les sphaignes qu'utilisait SHARA par des sacs en plastique autour des noeuds de la hampe où ils injectaient divers régulateurs de croissance. Il y avait parfois développement de keikis mais les méthodes n'eurent que peu de succès auprès des horticulteurs. Des résultats meilleurs ont été obtenus en appliquant directement les phytohormones sous forme de pâtes sur les bourgeons. Les pâtes ont pour charge inerte de la lanoline (SAWA, 1972) ou une crème amphiphile (ZIMMER & PIEPER, 1979).

Plusieurs chercheurs avaient déjà noté l'effet de la benzylaminopurine (BAP) sur la levée de l'inhibition des bourgeons latéraux de plantes intactes. Une ramification est obtenue par aspersion foliaire de BAP sur le poinsettia (Euphorbia pulcherina) (CARPENTER, RODRIGUEZ & CARLSON, 1971) et par application de BAP et adénine dans la lanoline sur des bourgeons de rosiers (PARUPS, 1971). En 1972, SAWA montre que des applications de BAP sur les bourgeons axillaires de Phalaenopsis

provoquent leur ramification. Les hampes secondaires sont par la suite conduites à la floraison par application d'une association de BAP et d'acide gibberellique dans la lanoline pendant l'été (SAWA, 1977). Mais il montre aussi que les bourgeons peuvent se développer en keikis.

Des applications successives de pâte ambiphile renfermant de la BAP à raison de 2500 à 5000 mg/kg provoquent la formation de plantules adventives. Des applications uniques de BAP ou d'acide naphtylacétique (ANA) provoquent la ramification de la hampe florale. Des applications ultérieures de BAP permettent le développement de plantules adventives sur les hampes secondaires ce qui permet d'augmenter le taux de multiplication. (ZIMMER & PIEPER, 1979).

Cette technique a quelques applications chez de nombreux horticulteurs, on trouve même des pâtes prêtes à l'emploi dans le commerce telle que "KEIKI GROW" (Plant Hormones, Hamilton, Canada).

II) DE LA MULTIPLICATION VEGETATIVE IN VIVO A LA MULTIPLICATION CLONALE IN VITRO.

Hormis le cas des Pleiones où chaque pseudobulbe forme des bulbilles à leur extrémité (ces bulbilles étant facilement utilisées pour la multiplication de ces plantes), les méthodes de multiplication végétative naturelle ou induite présentent un certain nombre d'inconvénients:

- les méthodes conventionnelles de multiplication par division de touffes sont longues. Selon J.W. BLOWERS (1964), suivant le genre, il faut environ 10 ans pour obtenir de 6 à 12 plantes de taille adulte. De plus ces techniques gênent considérablement la floraison de l'année suivant la division.
- les chances de réussite de multiplication par bouturage quand elle est possible sont très aléatoires.
- la formation de keikis est relativement rare spontanément.

De même, les méthodes de multiplication végétative induite (essentiellement le cas de Phalaenopsis) qui permettraient un taux de multiplication potentiellement plus important présentent plusieurs limites:

- le topping peut conduire à des dommages importants pouvant entraîner la mort de la plante mère.
- l'utilisation de régulateurs de croissance pourrait être beaucoup plus intéressante mais l'insuffisance de données sur l'ensemble des facteurs conduisant à la formation de keikis rend cette pratique trop hasardeuse bien que cette méthode ait l'avantage de ne pas léser la plante mère.

La découverte des techniques de propagation clonale par culture de méristèmes apicaux d'orchidées in vitro (MOREL, 1960) a permis d'apporter une réponse à certains problèmes que rencontraient les horticulteurs tels que:

- la synchronisation des dates de floraison avec les périodes

des de forte demande en fleurs coupées, tous les individus d'un même clone répondant de la même manière à un traitement cultural.

- la culture en grand nombre de plantes de valeur reconnue alors que l'extrême hétérozygotie des orchidées commerciales rend vaine toute tentative d'établissement de lignées pures.
- la culture d'hybrides intergénériques dont les graines sont stériles.

Enfin et surtout, la culture de méristèmes rend possible la multiplication en nombre illimité de certains genres, et ce, beaucoup plus rapidement que par les méthodes conventionnelles. Ainsi, il est possible, à partir d'un méristème de Cymbidium, d'obtenir plus de 4 000 000 de plantules identiques en un an.

III) LA MULTIPLICATION VEGETATIVE IN VITRO.

Avant de donner un rapide aperçu des recherches effectuées sur les techniques de multiplication végétative in vitro des orchidées les plus connues, nous nous étendrons plus particulièrement sur trois plantes :

- A : le Cymbidium, plante remarquable par son aptitude à être multipliée in vitro. C'est sur le Cymbidium que MOREL mit au point sa technique de régénération et de multiplication de protocormes.
- B : le Phalaenopsis, chez qui les techniques pratiquées avec le Cymbidium ne sont pas applicables, mais qui peut être multiplié végétativement in vitro par d'autres moyens.
- C : le Paphiopedilum, plante jusqu'ici rebelle à toute tentative de propagation clonale commercialement applicable.

A) LA PROPAGATION CLONALE DU CYMBIDIUM.

La découverte essentielle qui allait permettre un essor extraordinaire de la culture des orchidées fut réalisée par le Dr Georges MOREL en 1960. Celui ci signalait déjà en 1956 que chez les plantes atteintes de maladies à virus, le méristème apical ainsi que l'embryon échappaient à l'infection. Et c'est en appliquant les techniques de culture in vitro existantes (WETMORE & MOREL, 1949; WETMORE, 1954) à l'étude de la transmission des virus chez le Cymbidium, qu'il remarqua que le méristème apical cultivé sur milieu de KNUDSON (1946) glucosé, grossit rapidement et forme une masse globuleuse, entourée de rhizoïdes, absolument analogue à un protocorme au sens de BERNARD (1908). Le développement du méristème est en tout point identique à celui d'un embryon (Fig. 2 et 3).

Si aussitôt après l'apparition des feuilles, le protocorme est sectionné en trois ou quatre fragments, on constate que chaque fragment repiqué sur un milieu identique, bourgeonne et reforme de quatre à huit "protocorm like body" (MOREL, 1964) semblables aux précédents (Fig. 4), si bien que l'on peut

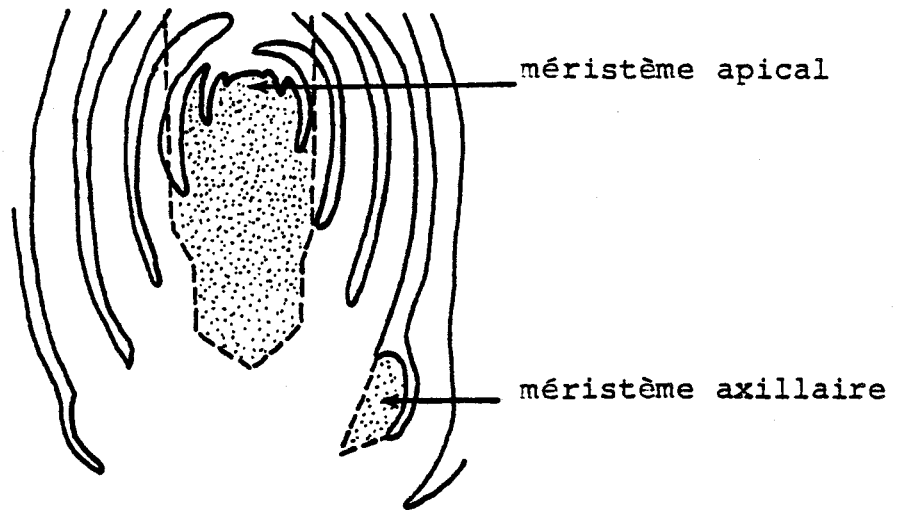


Fig. 2 : Mode de prélèvement des méristèmes apical et axillaire (d'après MOREL, 1970).

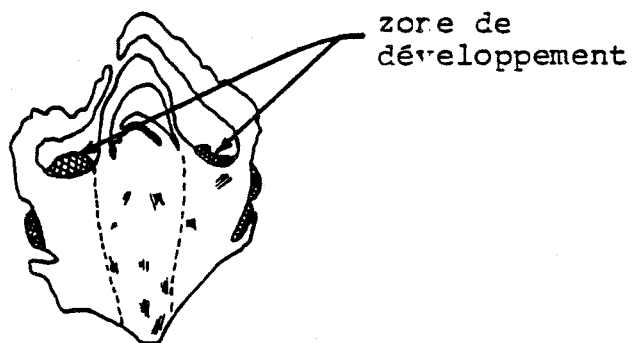


Fig. 3 : Coupe d'un méristème apical après deux mois de culture montrant les zones de développement des protocormes (d'après MOREL, 1970).

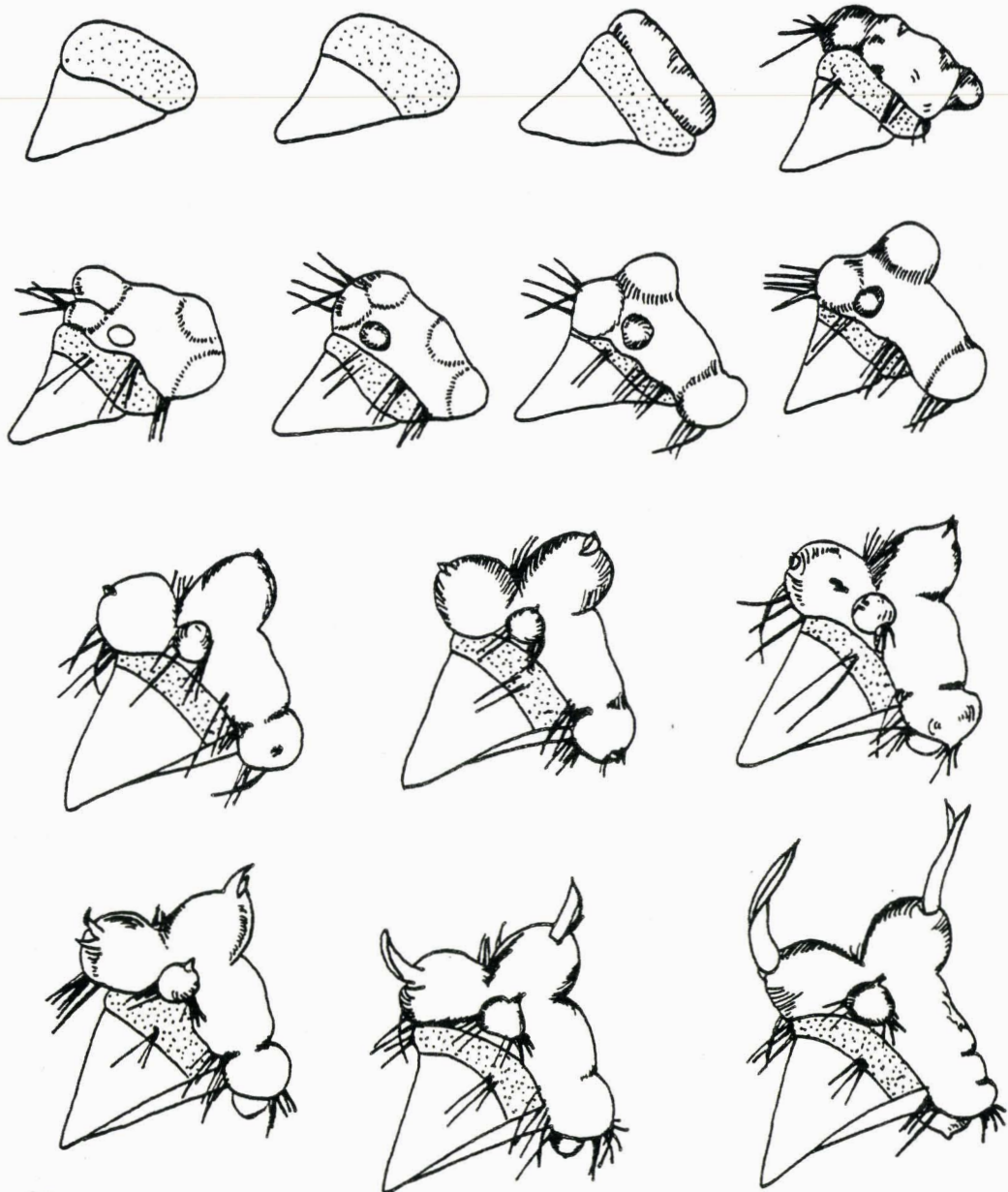


Fig. 4 : Régénérations de protocormes à partir d'un fragment de protocorme (d'après MOREL, 1971).

reproduire ce phénomène aussi souvent qu'on le désire et maintenir indéfiniment cet état juvénile. Par contre, dès que l'on cesse de fragmenter les protocormes, une plantule se développe sur laquelle se forment des racines. Ainsi dans le cas du Cymbidium, chaque bourgeon peut régénérer trois à cinq protocormes en deux mois. Chaque protocorme peut alors être sectionné en quatre morceaux, chacun régénérant à son tour le même nombre de protocormes. De cette manière en un an, il est possible de produire plusieurs centaines de milliers de plantes toutes identiques entre elles (MOREL, 1960; 1963; 1964 a et b; 1965 a et b; 1970; 1974).

Depuis la découverte de MOREL, de nombreuses recherches ont été effectuées d'une part sur la régénération de protocormes par culture de méristèmes apicaux et axillaires et d'autre part, sur la multiplication de ces protocormes.

1) Les différentes techniques de culture des méristèmes.

a) Méristème apical et méristème axillaire.
.....

Généralement le clonage de protocormes de Cymbidium est initié par culture de méristème apical prélevé sur une jeune pousse latérale longue d'environ 10 cm. Cette technique a l'avantage d'assurer une croissance plus active du méristème terminal mais également présente une plus grande sécurité d'asepsie des cultures, les jeunes pousses en croissance étant naturellement peu contaminées par rapport aux pousses adultes (MOREL, 1960; 1964 a et b; 1965 a et b).

Toutefois, il est possible de démarrer une culture de protocormes à partir de méristèmes axillaires prélevés sur des pseudobulbes adultes. Seuls les méristèmes de la partie aérienne du pseudobulbe sont utilisés (environ une dizaine de méristèmes), ceux de la partie souterraine se développant en plantules ou en tiges florales. Repiqués sur le milieu C de KNUDSON (1946) additionné de BAP (10^{-5} M/l) pour contrebalancer le phénomène de dominance apicale, les méristèmes supérieurs se développent en un grand nombre de protocormes (environ une vingtaine).

Cette méthode malgré quelques difficultés d'asepsie présente l'avantage de ne pas nécessiter de microdissection, les explants étant suffisamment gros mais aussi de montrer un développement très rapide des méristèmes en protocormes (TRAN THANH VAN, 1974, b).

b) Choix du milieu de culture.
.....

L'initiation d'une culture de protocormes peut être réalisée soit entièrement sur milieu gélosé tel que MOREL l'a décrit, soit par ensemencement du méristème et des protocormes sur milieu liquide agité (WIMBER, 1963, 1965). Les deux types de milieux peuvent aussi être associés, une préculture étant réalisée sur milieu liquide agité avant transfert sur milieu gélosé (SAGAWA, SHOJI & SHOJI, 1966; FONNESBECH, 1972 a et b).

L'utilisation du milieu liquide favorise le développement des protocormes et inhibe partiellement la formation des tiges et des racines alors que le milieu gélosé, d'un emploi plus aisé, accélère la régénération des plantes.

2) La multiplication des protocormes.

a) Influence de l'état physique du milieu.
.....

Quatre états différents des milieux de culture ont été utilisés, ce sont:

- le milieu solide gélosé;
- le milieu liquide agité par rotation;
- le milieu liquide statique;
- le milieu liquide traversé par un courant d'air stérile.

Les milieux liquides permettent un taux de multiplication très supérieur à celui obtenu avec les milieux gélosés. Toutefois il retarde la différenciation des plantules sur les protocormes (KUSUMOTO, 1980, a).

Il est à noter qu'en milieu liquide, plus l'oxygénation est faible, plus la différenciation des plantes est retardée et c'est le cas du milieu liquide statique (HOMES, FRESON &

VERMYLEN, 1973), tandis que l'emploi de milieux liquides traversés par un courant d'air stérile permet des taux de multiplication très importants (plus d'un kilogramme de protocormes ont été obtenus en 14 semaines et un seul repiquage) (KOCH, 1973, 1974, c; PIEPER & ZIMMER, 1976, a). Le milieu liquide agité donne des résultats intermédiaires (WIMBER, 1963).

Enfin, l'utilisation de milieux liquides accroît la sensibilité des protocormes à l'addition de régulateurs de croissance alors que l'emploi de milieux gélosés nivelle plus ou moins les différences de réaction (KUSUMOTO, 1980, a).

b) La formulation des solutions minérales.
.....

Les solutions minérales les plus couramment utilisées sont celles proposées par KNUDSON (1946) (MOREL, 1964; 1965; MATSUI, KAWAI & SAMATA, 1970; ZIMMER & PIEPER, 1976; DALLA ROSA & LANERI, 1977), WIMBER (1963) (FONNESBECH, 1972 a et b), TSUCHIYA (1954) qui n'est autre que la solution de WHITE (1943) (KUKULCZANKA & PALUCH, 1971), MURASHIGE & SKOOG (1962) (RUCKER, 1974, 1975; NAGL & RUCKER, 1972; de BRUIJNE & DEBERGH, 1974) et par KANO (1965) (formulation dite solution de Kyoto) (KUSUMOTO & FURUKAWA, 1977; KUSUMOTO, 1980, a). (Table 1).

Peu de travaux ont été publiés pour comparer les qualités de ces différents milieux entre eux, nous citerons seulement KUSUMOTO & FURUKAWA (1977) qui ont montré la supériorité de la solution de Kyoto sur les milieux de KNUDSON (1946) et WHITE (1943).

Notons aussi que de BRUIJNE & DEBERGH (1974) ont étudié le rôle de différents ions de la solution de MURASHIGE & SKOOG (1962). Les éléments N, P et K sont évidemment indispensables, l'absence de S et Ca ne gêne que modérément la croissance de fragments de protocormes tandis que l'absence de Mg favorise la différenciation des plantules. A l'inverse, l'augmentation de la concentration en Mg inhibe la différenciation des plantules (KUKULCZANKA & JASTRZEBSKA-KOLODYNska, 1976).

c) Les sucres.
.....

Différents sucres sont utilisables par les protocormes de Cymbidium. Ainsi à la concentration de 2 %, la croissance la plus active est obtenue en utilisant du saccharose puis par ordre décroissant: maltose - glucose - fructose - mannose (FONNESBECH, 1972, b).

En présence de saccharose, la croissance des protocormes est optimale à la concentration de 2% (FONNESBECH, 1972, b; VAN SEVEREN & COUTREZ, 1974; KUSUMOTO, 1980, a), alors que l'accroissement en poids sec est optimal à 4% (VAN SEVEREN & COUTREZ, 1974). Enfin, la teneur en matière sèche augmente parallèlement à la concentration en sucre du milieu de culture (FONNESBECH, 1972, b).

La concentration en saccharose du milieu joue également sur la teneur en chlorophylle, celle ci étant d'autant plus faible que la concentration en sucre augmente, la teneur en chlorophylle étant maximale à 0,25% (VAN SEVEREN, 1973; VAN SEVEREN & COUTREZ, 1974; KUSUMOTO, 1980, a) de même, la forme des plastes diffère avec la teneur du milieu en sucre (HOMES & VAN SEVEREN, 1972, 1973, b).

Enfin, la vitesse de différenciation des plantules varie avec la concentration en sucre et passe par un optimum à 0,6%. Au delà, la multiplication des protocormes est favorisée (FRESON, 1969; HOMES & VAN SEVEREN, 1973, a).

d) Les additifs organiques complexes.
.....

L'action d'un grand nombre d'additifs organiques complexes, depuis longtemps utilisés dans les milieux pour germinations aseptiques a été étudiée pour la multiplication des protocormes de Cymbidium. Les plus couramment utilisés sont les suivants:

- le lait de coco : il favorise nettement la multiplication des protocormes à la concentration de 10% (FONNESBECH, 1972 b; DALLA ROSA & LANERI, 1977). Aux concentrations élevées (25%), on constate une inhibition partielle de la différenciation des plantules (KUSUMOTO, 1980, a).

- l'hydrolysate de caséine: il accélère la croissance des protocormes entre 400 mg/l (KUKULCZANKA, PALUCH & WOZAKOWSKA-NATHANIEC, 1975) et 2 g/l (FONNESBECH, 1972, b).
- la peptone: son effet optimum se situe à 2 g/l, des concentrations supérieures inhibent la différenciation des plantules (KUKULCZANKA & PALUCH, 1971).
- la tryptone: l'optimum de concentration de ce composé se situe entre 2 g/l (KUSUMOTO, 1978) et 4 g/l (FONNESBECH, 1972, b). La tryptone a une action stimulante sur la vitesse de différenciation des plantules (KUSUMOTO, 1978).
- la banane verte: à raison de 150 g/l, cet additif favorise la croissance des protocormes ainsi qu'une différenciation des plantules précoce. La banane verte stimule nettement le développement racinaire des jeunes plantes. Il est à noter que l'action de ce complexe organique est très nettement affaiblie par addition de peptone ou de tryptone (KUSUMOTO & FURUKAWA, 1977).
- la sève de bouleau blanc: utilisée par PIEPER & ZIMMER en remplacement du lait de coco, son action est favorable à la croissance des protocormes quand elle est additionnée à raison de 10% (PIEPER & ZIMMER, 1974; ZIMMER & PIEPER, 1976).

e) Les régulateurs de croissance.
.....

Les facteurs de croissance modifient à la fois la prolifération des protocormes et leur différenciation.

e.1 Influence des facteurs de croissance sur la multiplication.

Plusieurs molécules ont été étudiées:

- L'acide naphtylacétique (ANA) augmente nettement la croissance des protocormes mais en diminue le nombre. Le poids optimum de matière fraîche est obtenu pour des concentrations variant entre 1 et 10 ppm (SCULLY, 1967; REINERT & MOHR, 1967; FONNESBECH, 1972, a; KUKULCZANKA, 1975). Des concentrations trop élevées entraînent l'apparition de malformations et de défauts de coloration (TORIKATA, 1968; FONNESBECH, 1972, a).

- L'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) à la concentration de 1 μM provoque un très fort accroissement du poids des protocormes. Aux concentrations supérieures, la croissance est très rapidement inhibée. Toutefois, l'utilisation du 2,4-D entraîne l'apparition de très nombreuses malformations (UEDA & TORIKATA, 1968; FONNESBECH, 1972, a).

- Les cytokinines telles que la kinétine et la benzyl-aminopurine (BAP) modifient peu ou inhibent légèrement l'accroissement pondéral des cultures (FONNESBECH, 1972, a; KUSUMOTO, 1980, a). Par contre, ces substances augmentent nettement le nombre de protocormes néoformés par culture avec un optimum de concentration de 0,1 ppm pour la BAP (MATSUI, KAWAI & SAMATA, 1970) et de 1 ppm pour la kinétine (KUKULCZANKA, 1975).

- L'acide gibbérellique inhibe partiellement la croissance des protocormes de Cymbidium (FONNESBECH, 1972, a; KUKULCZANKA, 1975).

e.2 Influence des régulateurs de croissance sur la différenciation.

Les auxines aux doses couramment utilisées ont peu d'influence sur la différenciation des plantules. Notons seulement qu'à aux concentrations élevées (1 à 5 ppm), l'acide indolylacétique (AIA) stimule l'enracinement (KUKULCZANKA, 1975), l'ANA retarde l'apparition des pousses feuillées (FONNESBECH, 1972, a; KUSUMOTO, 1980, a) et enfin qu'en milieu liquide, le 2,4-D bloque toute différenciation (KUSUMOTO, 1980, a).

Les cytokinines ont comme effet majeur de retarder l'apparition des tiges et d'inhiber le développement racinaire (MATSUI, KAWAI & SAMATA, 1970; FONNESBECH, 1972, a; RUCKER, 1974; KUKULCZANKA, 1975; KUSUMOTO, 1980, a).

Les gibbérellines provoquent une différenciation rapide des plantules entre 1 et 5 ppm (FONNESBECH, 1972, a; KUKULCZANKA, 1975; KUSUMOTO, 1980, a).

En associant ces différents facteurs de croissance, on ne modifie guère l'effet de chacun d'eux sur la multiplication par contre les associations se révèlent efficaces pour contrôler la différenciation des plantes. KUSUMOTO (1978) préconise suivant le but recherché, l'utilisation des associations suivantes:

- multiplication des protocormes 2,4-D 0,1 ppm + K 1,0 ppm
- apparitions des points végétatifs 2,4-D 0,1 ppm + AG₃ 1,0 ppm
- développement des tiges 2,4-D 0,1 ppm + AG₃ 1,0 ppm
- développement des racines AG₃ 1,0 ppm + ANA 0,1 ppm

alors que MATSUI, KAWAI & SAMATA (1970) préconisent pour une différenciation rapide, la combinaison suivante: BAP 10 ppm et ANA 1 ppm. Il est d'ailleurs à remarquer que dans ce cas, l'association d'ANA à la BAP inverse les effets que cette dernière aurait pu entraîner seule.

f) Le pH du milieu de culture.
.....

Les protocormes de Cymbidium sont capables de se développer sur des milieux à pH fort différents (à partir de 3,0) en rétablissant eux-mêmes le pH du milieu à une valeur favorable à leur développement (VAN SEVEREN, 1974). L'optimum de croissance est observé pour des pH variant entre 5,0 et 5,5 (KUSUMOTO, 1980, b).

g) La lumière et la température.
.....

HOMES & VAN SEVEREN (1973, a) ont montré que plus la durée d'éclairement est longue, plus l'accroissement pondéral des protocormes est important alors que l'intensité lumineuse n'a pratiquement pas d'influence (entre 2900 et 5800 Lux).

Pour les températures, il n'y a pas d'étude systématique mais on constate que les températures de culture sont le plus souvent voisines de 23-25°.

3) La croissance des plantules in vitro.

Primitivement, les plantules issues du développement des protocormes étaient repiquées en serre alors qu'elles n'atteignaient qu'un centimètre de haut (MOREL, 1960).

Depuis, il a paru préférable de continuer la culture des jeunes plantules en conditions aseptiques sur milieu synthétique. Le plus simple est de repiquer ces jeunes plantules sur le même milieu de base que celui utilisé pour la multiplication des protocormes mais il est préférable de modifier légèrement la solution nutritive.

Ainsi l'addition de composés organiques complexes est bénéfique à la croissance des plantes, MOREL (1974) remplace les 100 ml/l de lait de coco du milieu de multiplication par 40 g/l de banane verte, 200 ml/l de jus d'ananas et 500 mg/l d'émulsion de poisson. Les effets stimulateurs de la croissance de la banane verte ont été également montrés par DALLA ROSA & LANERI (1977) et KUSUMOTO & FURUKAWA (1977).

L'apport d'une quantité supplémentaire d'éléments minéraux au milieu de base avant repiquage (PRASAD & MITRA, 1975) ou en cours de culture (KUSUMOTO, 1981) permet une croissance plus active.

Les régulateurs de croissance jouent également un rôle important sur la croissance des plantules, KUSUMOTO (1981) a déterminé que l'association optimale est 0,1 ppm de 2,4-D, 1,0 ppm d'ANA et 5 à 10 ppm d'AG₃, l'action positive ou négative des cytokinines étant restée peu claire.

Enfin, il est à noter que l'éclaircissement continu des cultures provoque un retard de la croissance (WERCKMEISTER, 1970 a et b; 1971; KUSUMOTO, 1981).

Lorsque les plantes atteignent 8 à 10 cm de longueur, les plantes sont alors aptes à être repiquées en serre.

4) Les autres méthodes de multiplication végétative du Cymbidium.

En 1965, Wimber a montré la possibilité de néoformation de protocormes à partir de très jeunes feuilles de pousses immatures cultivées sur milieu de VACIN & WENT (1949) liquide agité.

F.C. STEWARD et M.O. MAPES ont travaillé sur la possibilité

de cultiver des cellules isolées de Cymbidium, le passage par le stade cellulaire ayant l'avantage de fournir un nombre très important d'individus en un temps restreint. Pour cela, ils ont repiqués après quelques semaines de culture sur milieu de WHITE (1943) gélosé additionné de 10 % de lait de coco et 5 ppm d'ANA, un méristème apical en milieu liquide agité additionné de lait de coco et 5 ppm de 2,4-D et ont constaté l'apparition dans le milieu de culture de cellules isolées. Ces cellules ont été ensuite repiquées sur le même milieu mais dont le 2,4-D a été remplacé par de l'ANA et ont formé de nombreux protocormes. Par la suite, la normalité des floraisons de plantes obtenues par cette technique a pu être observée. Toutefois, aucune publication ultérieure n'a été rapportée sur cette technique (STEWART & MAPES, 1971).

Enfin, plus récemment, des protoplastes de feuilles et de protocormes de Cymbidium ont été obtenus avec des rendements atteignant 90%, mais aucune culture de ces protoplastes n'a été tentée (CAPESIUS & MEYER, 1977).

B) LA PROPAGATION CLONALE DU PHALAEOPSIS.

1) Culture de méristèmes terminaux et axillaires.

Pour la multiplication végétative du Phalaenopsis par culture in vitro de méristèmes, les techniques mises au point par MOREL ne sont guère applicables. En effet, le relargage dans le milieu de culture de composés toxiques vraisemblablement de nature polyphénolique (MOREL, 1970; 1974) par les explantats, nuit à leur développement.

En 1974, INTUWONG & SAGAWA obtiennent des néoformations de protocormes par culture de méristèmes apicaux et axillaires sur milieu de VACIN & WENT (1949) liquide additionné de 15% de lait de coco. Pour éviter l'intoxication des explantats, les méristèmes sont transférés sur milieu neuf tous les dix jours. Après leur formation, les protocormes sont repiqués sur le même milieu solidifié, ceux ci se développent alors en plantules.

2) La culture de noeuds de hampes florales.

a) Méthodes ne faisant pas intervenir le stade protocorme.
.....

Les premières tentatives réussies de multiplication végétative de Phalaenopsis par culture in vitro de noeuds de hampes florales sont l'oeuvre de G. ROTOR (1949).

Celui ci constatait que des fragments de 4 à 5 cm de long, munis chacun d'un bourgeon, stérilisés selon la méthode de WILSON (1915) et repiqués sur le milieu C de KNUDSON (1946) donnent naissance chacun, après deux semaines, à une plantule qui s'enracine spontanément après 5 mois de culture (stade 3 feuilles).

Cette méthode fut aussitôt utilisée par les horticulteurs puis abandonnée par la suite en raison de hauts pourcentages de contamination avant d'être modifiée par SAGAWA & NIIMOTO (1960) puis par la suite par de nombreux autres auteurs. Ces modifications ont porté sur le prélèvement des explantats et les techniques de stérilisation (SAGAWA, 1962; SCULLY, 1966; INTUWONG, KUNISAKI & SAGAWA, 1972).

Une technique de culture semi-stérile a été décrite par URATA & IWANAGA (1965). Seule la partie inférieure, stérilisée, des fragments de hampe plonge dans le milieu de culture aseptique, la partie supérieure y compris le bourgeon, étant à l'air libre. Le tube de culture est obturé par un bouchon caoutchouc percé d'un trou dans lequel est glissé l'explantat (Fig. 5).

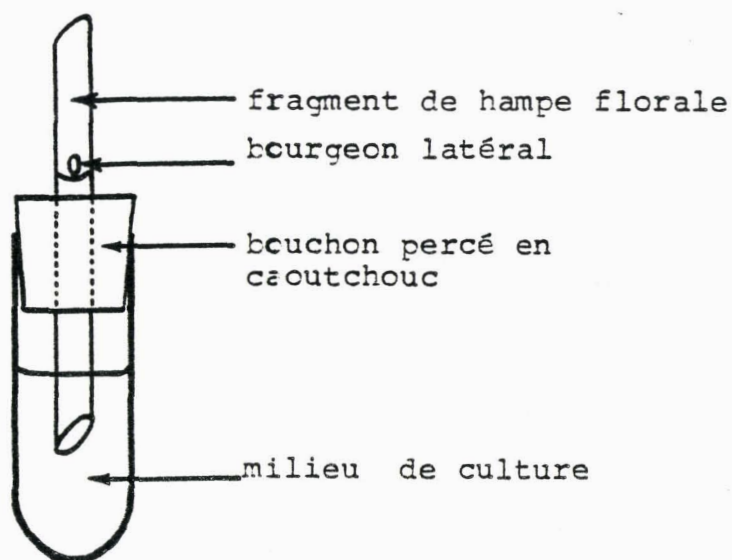


Fig. 5 : Culture semi stérile de fragments de hampe florale (d'après URATA & IWANAGA, 1965).

Quelquesoit le mode de prélèvement et de préparation des explantats, ceux ci montrent trois modes de comportement :

- 1- le bourgeon reste dormant puis meurt au bout d'un certain temps (Fig. 6 A).
- 2- le bourgeon se développe en formant une nouvelle inflorescence, elle même munie de bourgeons latéraux dont les supérieurs se différencient en boutons floraux (développement reproductif) (Fig. 6 B).
- 3- le bourgeon latéral se développe en une ou parfois deux plantules sans passer par le stade protocorme (développement végétatif) (Fig. 6 C).

(TANAKA & SAKANISHI, 1978; BOURIQUET, BROLY & LEGRAND, 1981).

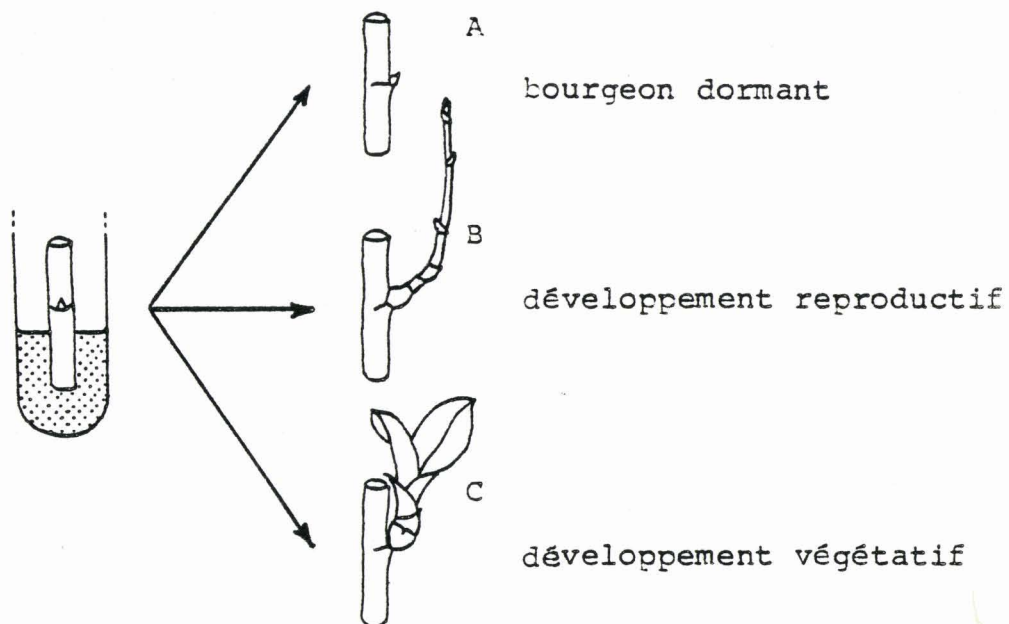


Fig. 6 : Modes de développement des bourgeons latéraux de hampes florales cultivés in vitro.

Le mode de développement des bourgeons est sous la dépendance d'une série de facteurs que sont:

- la position de l'oeil sur la hampe florale;
- la technique de prélèvement des explantats;
- le génotype de la plante;
- la composition minérale du milieu de culture;
- la présence de régulateurs de croissance;
- la présence de composés organiques complexes;
- la température et la lumière.

a.1 Influence de la position et du mode de prélèvement de l'explantat.

Les bourgeons prélevés sur la partie inférieure de la hampe florale se développent préférentiellement en plantules alors que les bourgeons prélevés dans la partie supérieure montrent plutôt un mode de développement reproductif ou restent inhibés (URATA. & IWANAGA, 1965; KOCH, 1974, a; TANAKA & SAKANISHI, 1978).

Le lieu de prélèvement de l'explantat détermine le pourcentage de contamination. Plus le fragment est situé bas sur la hampe florale, plus le taux de contamination est important (KOCH, 1974, a).

Les bourgeons prélevés sur les hampes florales obtenues in vitro se développent uniquement en plantules mais le nombre d'yeux qui restent dormants est également plus important (BOURIQUET, BROLY & LEGRAND, 1981). Le même résultat est observé lorsque le bourgeon seul est mis en culture (KOTOMORI & MURASHIGE, 1965; ZIMMER & PIEPER, 1979; BOURIQUET, BROLY & LEGRAND, 1981).

a.2 Influence du génotype.

Le génotype de la plante contrôle les potentialités de développement des bourgeons latéraux (ZIMMER & PIEPER, 1978). Ainsi certaines espèces (P. schilleriana et P. sanderiana) sont plus propices que d'autres à former des plantules végétatives in vitro (URATA & IWANAGA, 1965).

a.3 Influence de la composition minérale du milieu.

Les milieux de cultures les plus couramment utilisés sont ceux proposés par VACIN & WENT (1949) (KOTOMORI & MURASHIGE, 1965; SCULLY, 1966; INTUWONG, KUNISAKI & SAGAWA, 1972; TANAKA & SAKANISHI, 1978), KNUDSON (1946) (URATA & IWANAGA, 1965; REISINGER, BALL & ARDITTI, 1976; PIEPER & ZIMMER, 1976).

Quelques auteurs ont étudié l'influence de la composition minérale du milieu de culture sur le développement des bourgeons et ont permis parfois quelques classements tels que:

- le milieu de MURASHIGE & SKOOG (1962) est plus favorable au développement végétatif que le milieu de KNUDSON (1946) (FLAMEE & BOESMAN, 1977).
- le milieu de KNOP est supérieur au milieu de KNUDSON C (REISINGER, BALL & ARDITTI, 1976).

Mais l'adjonction de nombreuses substances organiques différentes d'un auteur à l'autre, rend difficile la comparaison

de ces milieux entre eux.

a.4 Influence des régulateurs de croissance.

Le 2,4-D, la kinétine et l'AIA sont inefficaces sur le développement de noeuds de hampes florales cultivés in vitro (KOCH, 1974, b; REISINGER, BALL & ARDITTI, 1976; FLAMEE & BOESMAN, 1977).

Il s'avère que seule la BAP influence nettement le développement des bourgeons (KOCH, 1974 a et b; FLAMEE & BOESMAN, 1977; TANAKA & SAKANISHI, 1978). La BAP stimule le développement des bourgeons latéraux. Plus la concentration en BAP est élevée, plus le pourcentage de bourgeons dormants diminue et plus le développement végétatif est favorisé. Toutefois, de trop fortes concentrations (5 et 10 ppm) bien que favorisant le développement d'un plus grand nombre de bourgeons et les développements multiples de plantules par bourgeon, provoquent l'apparition de malformations des feuilles (TANAKA & SAKANISHI, 1978). L'optimum de concentration est compris entre 1 ppm (KOCH, 1974, a) et 2,5 ppm (TANAKA & SAKANISHI, 1978).

L'association d'ANA stimule l'efficacité de la BAP (FLAMEE & BOESMAN, 1977) alors que seule, cette phytohormone n'a pas d'action (REISINGER, BALL & ARDITTI, 1976).

ARDITTI et son équipe ajoutent au milieu de culture de l'acide transcinnamique. Considéré comme une substance à propriété antiauxinique (VAN OVERBEEK, BLONDEAU & HORNE, 1954), l'acide transcinnamique inhibe partiellement l'effet de dominance apicale des bourgeons latéraux (ARDITTI, 1976; REISINGER, BALL & ARDITTI, 1976; ARDITTI, BALL & REISINGER, 1975; 1977).

a.5 Influence de la température et de la lumière.

Entre 20 et 28°, l'élévation de température favorise la reprise d'activité des bourgeons latéraux cultivés in vitro ainsi que le développement de type végétatif. Ces observations demeurent valables même lorsque le milieu est additionné de

BAP à sa concentration optimale (TANAKA & SAKANISHI, 1978).

Des températures de culture très élevées (37-38°) inhibent totalement le développement reproductif mais le nombre de bourgeons qui restent au repos est plus important qu'à 25° (REISINGER, BALL & ARDITTI, 1976).

Il est à remarquer que la température à laquelle est cultivée la plante en serre n'a pas d'influence sur le type de développement du bourgeon in vitro (TANAKA & SAKANISHI, 1978).

Il n'y a pas eu d'étude systématique de l'influence de la durée d'éclairement par jour ni de la quantité d'énergie lumineuse émise sur le développement des bourgeons, mais on constate que la plupart des auteurs utilisent des périodes lumineuses longues et des énergies relativement faibles (Table 2), une photopériode longue devant être favorable au développement végétatif si l'on admet qu'il y a une similitude de réaction au facteur lumière des bourgeons latéraux in vivo et in vitro.

AUTEURS	T°C	période	intensité
INTUWONG et al., 1972	24-29°	24/0	2500 Lux
KOCH, 1974, a	25°	20/4	2500 "
REISINGER et al., 1976	25°	16/8	2000 "
PIEPER & ZIMMER, 1976			
2 premières semaines	26°	0/24	0 "
semaines suivantes	22°	20/4	2500 "
FLAMEE & BOESMAN, 1977	25°	17/7	2000 "
TANAKA & SAKANISHI, 1978	28°	16/8	500 "

Table 2 : Conditions de lumière et de température de cultures de fragments de hampes florales in vitro.

a.6 Influence des composés organiques complexes.

L'adjonction de lait de coco favorise la reprise d'activité des bourgeons latéraux ainsi que la formation de plantules

végétatives (URATA & IWANAGA, 1965; SCULLY, 1966; TANAKA & SAKANISHI, 1978). Son action est comparable à celle de la BAP et peut être avantageusement remplacée par cette dernière.

La sève de bouleau blanc aurait également une action favorable au développement végétatif des bourgeons, comparable à celle du lait de coco (PIEPER & ZIMMER, 1974, 1976; ZIMMER & PIEPER, 1976, a et b; 1978, 1979).

b) Néof ormation de protocormes par culture de fragments de
.....
hampes florales.
.....

En 1970, TSE, SMITH & HACKETT ont observé le développement spontané de protocormes sur des cultures de fragments de hampes florales. Ils ont donc cherché à accroître la fréquence d'apparition de ce type de différenciation en faisant varier:

- la composition minérale du milieu de culture (milieu de MURASHIGE & SKOOG ou milieu de KNUDSON);
- la concentration en ANA (0 ou 2 ppm);
- et en pratiquant différents types de blessures sur les bourgeons avant repiquage.

Dans certains cas (milieu de MURASHIGE & SKOOG + 2 ppm d'ANA + amputation des 2/3 supérieurs du bourgeon et selon aussi la variété utilisée), 60% des bourgeons s'étaient développés en une masse indifférenciée, chaque cal donnant naissance par la suite à une vingtaine de plantules (TSE, SMITH & HACKETT, 1971).

Les recherches de KOCH (1974, a et b) aboutirent à la mise au point d'une nouvelle technique de néof ormation de protocormes par culture de bourgeons excisés. Ayant préalablement remarqué que l'association de 0,5 à 3 ppm d'ANA à 2ppm de BAP dans le milieu de culture induit parfois la néof ormation de protocormes à partir de noeuds, KOCH favorise ces néof ormations par l'utilisation d'un milieu liquide dans lequel circule un courant d'air stérile et additionné de 2 ppm de BAP et 0,5 à 3 ppm d'ANA et

par l'emploi de bourgeons latéraux excisés comme explantats. Dans ces conditions, 50 % des explantats se développent en protocormes.

3) Culture de fragments de feuilles.

Les cultures de feuilles permettent la régénération de protocormes. Ce résultat est l'aboutissement d'études de deux équipes de chercheurs, l'une japonaise conduite par M. TANAKA et l'autre, allemande, constituée de L. KOCH, K. ZIMMER et W. PIEPER.

Les premières études réalisées sur plantules de semis et plantes âgées de trois ans et demi, montrent que les capacités de régénération dépendent du type d'explantat utilisé. Un classement des explantats en fonction de leur capacité de régénération de protocormes peut être établi comme suit:

TYPE D'EXPLANTAT	CAPACITE DE REGENERATION		
	faible	→ élevée	
- feuilles entières			
. situation	feuille basale		feuille terminale
. état	agée	agée-étiolée	jeune
- fragments de feuilles			
. taille	extrémité	moitié	entièr
. situation	extrémité	milieu	base

Ces résultats ont été établis avec un milieu composé de 3,5 g/l d'Hyponex 7-6-19, additionné de 5 ppm d'ANA, de 10 ppm de kinétine et de 100 ml/l de jus de pommes (TANAKA, HASEGAWA & GOI, 1975).

Des fragments de feuilles prélevés sur des plantules issues de cultures de fragments de hampes florales (KOCH, 1974, a et b; PIEPER & ZIMMER, 1976) et cultivés pendant deux semaines à 26° à l'obscurité sur milieu de Knudson additionné de 10% de sève de bouleau blanc, 0,3 ppm d'ANA et 2 ppm de BAP puis transférés à 22° et à la lumière sur le même milieu mais dépourvu de BAP,

montrent des développements de protocormes au niveau des cassures après 8 à 10 semaines. La préculture à l'obscurité accroît le nombre de protocormes obtenus et inhibe partiellement la libération de polyphénols dans le milieu de culture (PIEPER & ZIMMER, 1976; ZIMMER & PIEPER, 1977; 1978; 1979).

Les mêmes résultats ont été obtenus par TANAKA & SAKANISHI (1977) sur milieu de MURASHIGE & SKOOG additionné de 1 ppm d'ANA, 10 ppm d'adénine et 10 ppm de BAP ainsi que par CAHUZAC (1979).

4) Culture d'extrémités de racines.

Quelques cas de néoformations de protocormes à partir de cultures de racines ont été rapportés.

En 1974, KOCH a obtenu une seule et unique néoformation de protocormes sur une pointe racinaire sans toutefois avoir réussi à établir une subculture de ces protocormes.

Par la suite, TANAKA, SENDA & HASEGAWA (1976) rapportent 20% de réussites, quelques explantats ayant donné naissance à des protocormes après 100 à 300 jours de culture à partir de pointes racinaires prélevées sur des plantules de semis. Ces mêmes auteurs ont vu toutes leurs tentatives échouer lorsque les explantats provenaient de plantes plus âgées cultivées en serre.

5) Culture de pousses feuillées.

Des protocormes ont été obtenus par culture de jeunes pousses non encore enracinées, issues du développement de bourgeons latéraux de hampes florales, en milieu liquide traversé par un courant d'air stérile (formulation C de KNUDSON modifiée additionnée de 2 ppm de BAP et 1 ppm d'ANA).

Toutefois, les protocormes qui apparaissent à la base des plantes, meurent pour la plupart d'entre eux, au premier repiquage (KOCH, 1974, a).

6) La multiplication des protocormes.

Peu de travaux ont été réalisés sur la multiplication des

protocormes de Phalaenopsis: d'une part, il demeure très difficile de les obtenir et d'autre part, ceux ci sont beaucoup plus fragiles que ceux de Cymbidium, par exemple, et sont beaucoup plus délicats à repiquer.

INTUWONG & SAGAWA (1974) ont réussi à les multiplier par repiquages fréquents sur milieu neuf de VACIN & WENT (1949) solidifié et dépourvu de sucre. La suppression des repiquages et l'addition de saccharose provoque une rapide différenciation des plantules.

Les recherches de KOCH (1974, a et b) ont montré l'effet bénéfique de l'apport de vitamines. L'addition de 0,5 ppm d'acide pantothénique et de glycocolle et de 0,2 ppm de thiamine, de pyridoxine et d'acide nicotinique au milieu de Knudson modifié par MOREL (1970) permet de multiplier rapidement les protocormes de Phalaenopsis soit en milieu liquide agité, soit sur milieu solide. Par contre l'addition de régulateurs de croissance (2,4-D, AIA et kinétine) n'a pas montré d'effet stimulant sur la croissance pondérale.

7) La culture de protoplastes.

L'isolation de protoplastes de Phalaenopsis a été réussie par TEO & NEUMANN (1978, b). Bien que ces protoplastes demeurent vivants un certain temps et que l'on puisse observer des fusions, les cellules isolées ne se divisent pas.

C) LA PROPAGATION CLONALE DU PAPHIOPEDILUM.

Les premiers résultats positifs ont été rapportés par MOREL (1974). Dans quelques cas, des méristèmes apicaux cultivés sur le milieu de THOMALE (1954) additionné de 1 ppm de 2,4-D forment un cal sur lequel se développent des plantules quand celui ci est repiqué sur un milieu dépourvu de 2,4-D.

Des résultats sensiblement similaires ont été observés par STEWART & BUTTON (1975) par culture d'apex de tige sur milieu liquide de HELLER (1965) additionné de 1 ppm de 2,4-D et 0,5 ppm de BAP. De même, STOKES, THOMAS & HOLDGATE (1975) ont obtenu des néoformations de plantules par culture de méristèmes axillaires de Phragmipedium sur milieu de REINERT & MOHR (1967) additionné d'ANA et de zéatine. La prolifération des plantules ainsi régénérées peut être induite par suppression de l'extrémité apicale.

Des essais de cultures in vitro de cellules isolées de parenchyme foliaire de Paphiopedilum ont également été tentées mais aucune réussite n'a pu être enregistrée (LOAEC & BIGOT, 1976; TEO & NEUMANN, 1978, b).

Cité par ARDITTI (1977), ALLENBERG (1976) a obtenu des régénérations de plantules par culture de fragments de feuilles.

Toutefois en 1979, J.F. MULLER écrivait encore: "la multiplication du Paphiopedilum est toujours exceptionnelle..."

D) LA PROPAGATION CLONALE DES AUTRES ORCHIDÉES.

Comme il serait long et fastidieux de donner en détail les techniques de propagation des orchidées autres que le Cymbidium, le Phalaenopsis et le Paphiopedilum, celles ci sont résumées et classées par plante dans le tableau ci dessous (Table 3).

Nous ne citerons hors tableau que les essais de multiplication de Renantanda par culture de cellules isolées (TEO & NEUMANN, 1978, a). Toutefois, cette technique bien qu'elle ait montré des résultats encourageants puisqu'il a été observé des divisions cellulaires, n'a pas permis d'aboutir à la régénération de plantes entières.

PLANTE	EXPL.	CAL	PLB	MILIEU DE CULTURE	AUTEURS
ANACAMPTIS	ET	-	+	MS; AIA 1,0; K 2,6; LC 20%	MOREL, 1970
ARANDA	ET	+	-	WHITE LA; LC 10%; PEP 2 g/l	GOH, 1973; 1975
"	MA	-	+	" " "	GOH, 1973; 1975
"	EF	-	+	VW LA; LC 20%	LOH, RAO & GOH, 1975
"	ET	-	+	" "	LOH, RAO & GOH, 1975
"	ET	+	+	" "	JIN, SHIONG & RAO (c.p.)
"	MA	+	+	" "	JIN, SHIONG & RAO (c.f.)
"	ET	-	+	VW LA; LC 15%; BV 50 g/l	CHEAH & SAGAWA, 1978
"	FF	-	+	MS; LC 15%; BAP 2,0; 2,4-D 2,0	FU FAN, 1978; 1979
ARANTHERA	ET	-	+	VW LA; LC 15%; BV 50 g/l	CHEAH & SAGAWA, 1978
ARUNDINA	ET	-	+	RT; LC 20%; PEP 1 g/l	MITRA, 1971
ASCOCENDA	FF	-	+	MS; LC 15%; 2,4-D 2,0; BAP 2,0	FU FAN, 1978; 1979
ASCOFINETIA	JJ	-	+	VW LA; LC 15%	INTUWONG & SAGAWA, 1973
BRASSIA	ET	-	+	F LA; EL 0,25 g/l; urée 0,5 g/l; JC 12,5%, AIA 0,5	PIEPER & ZIMMER, 1974 b
BRASSOCATTLEYA	ET	+	-	MS LS; 2,4-D 10; K 10	KAKO, 1973
CALANTHE	ET	-	+	non rapporté	BERTSCH, 1967
CATTLEYA	ET	+	+	MOREL	MOREL, 1965 a et b
"	ET	+	+	MOREL	CHAMPAGNAT & MOREL, 1969
"	MA	-	+	PM; AIB 1,75; ANA 1,75; K 1,0	REINERT & MOHR, 1967
"	MA	+	+	VW LA; LC 25%	SCULLY, 1967
"	FF	-	+	MOREL; K 1,0	CHAMPAGNAT, MOREL & MOUNETOU, 1970
"	ET	+	+	L LA; LC 15%; ANA 0,1; K 0,2	LINDEMANN, CUNCKELL & DAVIDSON, 1970
"	EF	-	+	HELLER LA; 2,4-D 1,0; BAP 0,5	CHURCHILL, ARDITTI & BALL 1971 a et b



PLANTE	EXPL.	CAL	PLB	MILIEU DE CULTURE	AUTEURS
CATTLEYA	ET	-	+	RM; ANA 0,1	ICHIHASHI & KAKO, 1973; 1977
"	FF	-	+	MS; LC 15%; 2,4-D 2,0; BAP 2,0	FU FAN, 1978; 1979
"	ET	-	+	MS	KUSUMOTO, 1979
DACTYLORCHIS	ET	-	+	RM; salep; extrait de feuille	STOKES, 1974
DENDROBIUM	ET	-	+	non rapporté	MOREL, 1965 b
"	ET	-	+	KC; LC 25%	SAGAWA & SHOJI, 1967
"	ET	-	+	VW LA; LC 15%	KIM, KUNISAKI & SAGAWA 1970
"	N	-	-	VW LA; LC 15%	SINGH & SAGAWA, 1972
"	N	-	-	KNOP; BAP 2,0; tCA 15,0	MOSICH, BALL, FLICK & ARDITTI, 1974; ARDITTI, MOSICH, BALL, 1973; MOSICH, BALL & ARDITTI, 1973; 1974; BALL & ARDITTI 1976.
"	ET	-	+	VW LA	INTUWONG & SAGAWA, 1975
EPIDENDRUM	EF	+	+	MS LA; 2,4-D 1,0; BAP 0,5	CHURCHILL, BALL & ARDITTI, 1970, 1973; CHURCHILL, ARDITTI & BALL, 1971; 1972
"	ER	-	+	OF; PEP 0,3 g/l	CHURCHILL, BALL & ARDITTI, 1972; CHURCHILL, FLICK, BALL & ARDITTI, 1973
"	ER	+	0	OF (X2); 2,4-D 0,5	STEWART & BUTTON, 1976, 1978
"	ET	-	+	MS	KUSUMOTO, 1981 b
"	MA	-	+	MS	KUSUMOTO, 1981 b



PLANTE	EXPL.	CAL	PLB	MILIEU DE CULTURE	AUTEURS
EPHRONITIS	MA	-	+	MS	KUSUMOTO, 1981 b
LAELIA	ET	+	-	MS LS; 2,4-D 10; K 10	KAKO, 1973
LAELIOCATTLEYA	ET	+	-	MS LS; 2,4-D 10; K 10	KAKO, 1973
"	EF	-	+	HELLER; 2,4-D 1,0; BAP 0,5	CHURCHILL, ARDITTI & BALL, 1971; 1972; CHURCHILL, BALL & ARDITTI, 1970; 1973
LYCASTE	ET	-	+	non rapporté	MOREL, 1965 b
MILTONIA	ET	-	+	non rapporté	MOREL, 1963; 1965 b
NEOSTYLIS	JI	-	+	VW LA; LC 15%	INTUWONG & SAGAWA, 1973
NEOTTIA	ER	-	+	non rapporté	CHAMPAGNAT, 1971
ODONTODIA	ET	-	+	non rapporté	MOREL, 1974
ODONTOGLOSSUM	ET	-	+	non rapporté	MOREL, 1963; 1965
ODONTONIA	ET	-	+	non rapporté	MOREL, 1974; BERTSCH, 1967
ONCIDIDIUM	ET	-	+	non rapporté	BERTSCH, 1967
"	N	+	+	MS; ANA 0,5; K 0,05; PEP 1 g/l; BV 100 g/l	FAST, 1973
OPIHYS	E	-	+	MS; ANA 0,1; K 0,1	CHAMPAGNAT & MOREL, 1972
"	FT	+	+	MS; ANA 0,1; K 0,1	CHAMPAGNAT & MOREL, 1972
PHAJUS	ET	-	+	non rapporté	MOREL, 1963; 1965 b
PLEIONE	ET	-	+	non rapporté	MOREL, 1971 a
RHYNCHOSTYLIS	ET	+	+	VV; ANA 0,1; TRYP 0,5 g/l; LC 10%	TEO, KUNISAKI & SAGAWA, 1972
SCHOMEURCKIA	MA	+	+	VW LA; LC 25%	SCULLY, 1967
VANDA	ET	+	-	WHITE; LC 20%; 2,4-D 2,0	GOH, 1970
"	MA	-	+	WHITE; LC 20%; 2,4-D 2,0	GOH, 1970
"	ET	-	+	VW LA; LC 15%	TEO, KUNISAKI & SAGAWA, 1973



PLANTE	EXPL.	CAL	PLB	MILIEU DE CULTURE	AUTEURS
VANDA	FF			KYOTO LA; JA 10%; ANA 5,0; K 10	TANAKA, HASEGAWA & GOI, 1975
"	N	-	-	VW	SAGAWA & SEHGAL, 1967
VASCOSTYLIS	JI	-	+	VW LA; LC 15%	INTUWONG & SAGAWA, 1973
VUYLSTEKEARA	ET	-	+	KC	BERTSCH, 1967
ZYGOPETALUM	ET	-	+	KC	BERTSCH, 1967
SIGLES UTILISES					
ET	Extrémité de tige		MS MURASHIGE & SKOOG (1962)		AIA acide indolylacétique
MA	Méristème axillaire		VW VACIN & WENT (1949)		K kinétine
EF	Extrémité de feuille		RT RAGHAVAN & TORREY (1964)		2,4-D ac. 2,4-dichlorophénoxyacétique
FF	Fragment de feuille		RM REINERT & MOHR (1967)		BAP benzylaminopurine
JI	Jeune inflorescence		L LINDEMANN et al. (1970)		AIB acide indolbutyrique
N	Noeud de hampe florale		KC KNUDSON C (1946)		ANA acide naphtylacétique
ER	Extrémité de racine		OF OJIMA & FUJIWARA (1962)		tCA acide transcinnamique
E	Embryon		VV VAJRABHAYA & VAJRABHAYA (1970)		
FT	Fragment de tubercule		F FEHLAND (PIEPER & ZIMMER, 1974 b)		LC lait de coco
					PEP peptone
				LA milieu liquide agité	BV banane verte
				LS milieu liquide statique	TRYP tryptone
				- milieu solide	EL extrait de levure
					JC jus de citron
					JA jus d'ananas

Toutes les concentrations en régulateurs de croissance sont exprimées en ppm



TABLE 1 : SOLUTIONS MINERALES EMPLOYEES EN CULTURE IN VITRO D'ORCHIDEES.

1) WHITE (1943)

	mg/l
KNO ₃	80
KCl	65
Mg SO ₄ 7H ₂ O	360
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	200
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	16
Na ₂ SO ₄	200
Fe ₂ (SO ₄) ₃	2,5
H ₃ BO ₃	1,5
MnSO ₄ 4H ₂ O	4,5
KI	0,75
ZnSO ₄ 7H ₂ O	1,5

2) KNUDSON (1946)

	mg/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	500
KH ₂ PO ₄	250
MgSO ₄ 7H ₂ O	250
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	1000
FeSO ₄ 7H ₂ O	25
MnSO ₄ 4H ₂ O	7,5

3) VACIN & WENT (1949)

	mg/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	500
KNO ₃	525
KH ₂ PO ₄	250
MgSO ₄ 7H ₂ O	250
Ca ₃ (PO ₄) ₂	200
Fe ₂ (C ₄ H ₄ O ₆) ₃	28
MnSO ₄ 4H ₂ O	7,5



4) HELLER (1953)

	mg/l
KCl	750
MgSO ₄ 7H ₂ O	250
CaCl ₂ 2H ₂ O	75
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	125
NaNO ₃	600
FeCl ₃ 6H ₂ O	1
H ₃ BO ₃	1
MnSO ₄ 4H ₂ O	0,01
KI	0,01
ZnSO ₄ 7H ₂ O	1
AlCl ₃	0,03
NiCl ₂ 6H ₂ O	0,03
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,03

5) THOMALE (1954)

	mg/l
NH ₄ NO ₃	370
(NH ₄) ₂ SO ₄	60
KNO ₃	400
KH ₂ PO ₄	300
Mg(NO ₃) ₂ 2H ₂ O	110
FeSO ₄ 7H ₂ O	20

6) OJIMA & FUJIWARA (1959)

	mg/l
KNO ₃	20
KH ₂ PO ₄	4
MgSO ₄ 7H ₂ O	48
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	136
Fe ₂ (SO ₄) ₃	1
H ₃ BO ₃	0,02
MnCl ₂ 4H ₂ O	1
KI	0,02



ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,02
(NH ₄) ₂ MoO ₄	0,02

7) MURASHIGE & SKOOG (1962)

	mg/l
NH ₄ NO ₃	1650
(NH ₄) ₂ SO ₄	1900
KH ₂ PO ₄	170
MgSO ₄ 7H ₂ O	370
CaCl ₂ 2H ₂ O	440
FeSO ₄ 7H ₂ O	38
Na ₂ EDTA	28
H ₃ BO ₃	6
MnSO ₄ 4H ₂ O	22
KI	1
ZnCl ₂	4
CoCl ₂ 5H ₂ O	0,025
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,025

8) WIMBER (1963)

	mg/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	500
KNO ₃	525
KH ₂ PO ₄	250
MgSO ₄ 7H ₂ O	250
CaHPO ₄	200
Fe ₂ (C ₄ H ₄ O ₆) ₃	300

9) RAGHAVAN & TORREY (1964)

	mg/l
NH ₄ NO ₃	80
KH ₂ PO ₄	270
MgSO ₄ 7H ₂ O	240
CaSO ₄ 2H ₂ O	80
CaH ₄ (PO ₄) ₂	100



$\text{Fe}_2(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6)_3$	3
H_3BO_3	0,6
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,4
KI	0,03
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2$	0,05
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,05
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,05

10) MOREL (1965)

	mg/l
NH_4NO_3	500
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1000
KH_2PO_4	250
KCl	250
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	500
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	25
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	7,5

11) REINERT & MOHR (1967)

	mg/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	400
KH_2PO_4	250
KCl	500
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	400
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1000
Na_2EDTA	22
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	11
H_3BO_3	0,03
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	7,5
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,03
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,001



12) LINDEMANN, GUNCKEL & DAVIDSON (1970)

	mg/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1000
KH_2PO_4	135
KCl	1050
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	120
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	500
$\text{Fe}(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6)_3$	5,4
H_3BO_3	1
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,07
KI	0,1
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,6
AlCl_3	0,03
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,02
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,02

13) CHAMPAGNAT, MOREL & MOUNETOU (1970)

	mg/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1000
KH_2PO_4	125
KCl	1000
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	125
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	500
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,01
KI	0,01
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1
AlCl_3	0,03
NiCl_2	0,03
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,03

14) VAJRABHAYA & VAJRABHAYA (1970)

	mg/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	500
KH_2PO_4	250



KCl	250
MgSO ₄ 7H ₂ O	250
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	500
Na ₂ EDTA	30
FeSO ₄ 7H ₂ O	20
H ₃ BO ₃	1
MnCl ₂ 4H ₂ O	2
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,1
CoCl ₂ 5H ₂ O	0,02
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,02
CuCl ₂ 2H ₂ O	0,01

15) FONNESBECH (1972)

	mg/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	300
KH ₂ PO ₄	250
K ₂ HPO ₄	212
MgSO ₄ 7H ₂ O	250
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	400
FeSO ₄ 7H ₂ O	38
Na ₂ EDTA	28
H ₃ BO ₃	10
MnSO ₄ 4H ₂ O	25
ZnSO ₄ 7H ₂ O	10
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,025

16) FEHLAND (PIEPER & ZIMMER, 1974)

	mg/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	375
KH ₂ PO ₄	375
KCl	375
MgSO ₄ 7H ₂ O	375
Fertilon	30
MnSO ₄ 4H ₂ O	80



17) KYOTO (TANAKA, HASEGAWA & GCI, 1975)

mg/l

Hyponex 7-6-19

3500

IV) LIMITES ET PROSPECTIVES DES TECHNIQUES DE MULTIPLICATION.

Les techniques de multiplication végétative du Cymbidium ont été adaptées aux structures commerciales depuis de nombreuses années. Celles ci sont fiables et rapides et leurs modalités sont bien établies, il suffit de consulter la masse impressionnante de travaux réalisés sur ce sujet pour s'en rendre compte.

Mais du point de vue commercial de la multiplication végétative du Cymbidium, si l'on veut réduire les coûts de production d'une plantule, il y a deux possibilités:

- réduire les coûts variables (essentiellement la main d'oeuvre), c'est à dire diminuer le nombre de repiquages pour la même quantité produite. Il faut donc différer le plus longtemps possible la différenciation des plantules tout en conservant une croissance rapide.
- augmenter la quantité produite par unité de temps, ce qui revient à diminuer les coûts fixes par unité de production c'est à dire en augmentant le taux de multiplication.

Deux axes de recherches sont donc déterminés pour le Cymbidium

- 1 - étudier l'action de certaines substances notamment les cytokinines, capables de retarder la différenciation des plantules.
- 2 - chercher à augmenter la vitesse de multiplication des protocormes en améliorant les conditions intrinsèques et extrinsèques de culture ou encore par le passage à la culture de cellules isolées.

Pour le Phalaenopsis, notre but est avant tout d'essayer de mettre au point une technique fiable de multiplication. En effet, les différentes méthodes de multiplication présentent un certain nombre d'inconvénients:

- formation de keikis: l'action des différents facteurs d'environnement (lumière, température, conditions de culture...) et les conditions d'emploi de différentes substances stimulant le démarrage des bourgeons latéraux de hampes

florales, sont encore trop imprécises.

- la culture des méristèmes excisés présente des chances de réussite extrêmement faibles.
- la culture de fragments de hampes florales quoique relativement fiable ne permet que des taux de multiplication très bas.
- les différentes techniques de néoformation de protocormes sont souvent peu reproductibles.
- enfin, la culture et la multiplication des protocormes ne sont pas maîtrisées.

Les objectifs de recherche sont donc de mettre au point une méthode fiable et d'arriver à des taux de multiplication plus élevés que ceux obtenus par les techniques de culture de fragments de hampes florales.

Enfin pour le Paphiopedilum, tout reste à faire.

RESULTATS

I) LA MULTIPLICATION VEGETATIVE DU PHALAENOPSIS.

A) LA MULTIPLICATION VEGETATIVE IN VIVO.

Des plantes cultivées en serre ont été multipliées végétativement par application de benzylaminopurine (BAP) sous forme de pâte à la lanoline, sur les bourgeons latéraux de hampes florales.

Lors d'une première expérience réalisée en avril 1980, un traitement à la BAP à la dose de $5 \cdot 10^{-7}$ M/100 g de lanoline a été effectué sur une plante (cv. Redfan) en fin de floraison. Après 3 semaines, comme nous n'observions pas de développement des bourgeons latéraux, une deuxième application de BAP à raison de 1 g/ 100 g de lanoline a été réalisée. Après 15 jours de culture, les bourgeons se sont développés pour former 3 pousses feuillées au niveau du plus bas bourgeon, 2 pousses feuillées sur le bourgeon médian et 7 pousses feuillées sur le bourgeon supérieur. Après 5 mois, l'apparition de racines (Photo I.1) a permis la séparation des plantules et leur repotage. Les premières hampes florales sont apparues en Octobre 1981 sur ces plantes.

Une deuxième série d'applications de pâtes renfermant 1 g de BAP pour 100 g de lanoline a été réalisée fin août 1981 sur 8 hampes de première floraison de plantes (cv. Redfan X Redfan et Conquête (Concorde X H. Lecoufle)).

Nous avons constaté que le mode de développement des bourgeons latéraux (végétatif ou reproductif) est influencé par la position du bourgeon sur la hampe florale. Plus le bourgeon est situé bas sur la hampe florale, plus le mode végétatif est favorisé (Table I.1).

	Rang du bourgeon latéral				
	1	2	3	4	5
1- Nb de bourgeons traités	8	7	6	2	1
2- Nb de plantules formées	9	3	1	0	0
Rapport 2/1	1.12	0.43	0.17	0	0
3- Nb d'inflorescences formées	3	7	6	2	1
Rapport 3/1	0.38	1	1	1	1

Table I.1 : Influence de la position du bourgeon latéral sur la hampe florale (1 = bourgeon situé le plus bas) sur son développement après traitement à la benzylaminopurine.

Un mois et demi après la première application de BAP, une deuxième application a été réalisée avec les mêmes doses de BAP sur la base des pousses feuillées et sur les bourgeons des inflorescences secondaires.

Sur une pousse feuillée, sont apparus plus d'une vingtaine de bourgeons (Photo I.2) alors que sur les autres pousses feuillées, nous avons vu apparaître à la fois des bourgeons et des inflorescences (Photo I.3). Toutefois dans le cas où des formations multiples de bourgeons ont été observées, seulement une ou deux pousses feuillées se développent, les autres bourgeons demeurant inhibés.

Lorsque la deuxième application de BAP a été réalisée sur des bourgeons latéraux d'inflorescences secondaires, ceux ci se sont développés en inflorescences tertiaires (Photo I.4).

Trois remarques doivent être faites à propos de ces résultats :

- 1 - le premier essai où nous n'avons observé que des développements de type végétatif a été réalisé en conditions de jours longs et de températures élevées (29° et plus de jour, 24° de nuit) alors que le deuxième essai a été conduit en conditions de jours relativement courts (début automne) et de période froide (23° de jour, 17-18° de nuit) et dans ce cas, nous avons observé après la première application de BAP à la fois des développements

inflorescentiels et des développements de type végétatif tandis qu'après la deuxième application réalisée toujours en période froide mais en jours plus courts, nous n'avons observé que des développements d'inflorescences.

Les conditions de culture influencent donc le mode de développement des bourgeons latéraux de hampes florales, des températures élevées alliées à des durées d'éclaircissement longues favorisent le mode végétatif.

2 - les bourgeonnements multiples ne sont apparus que sur des plantes pigmentées présentant des fleurs à dominante rose et des hampes florales rouge-sombre. Le génotype détermine donc les potentialités de développement in vivo des bourgeons latéraux.

3 - en période froide, les bourgeons latéraux supérieurs des hampes florales secondaires se différencient en boutons floraux mais les fleurs obtenues sont parfois anormales (Photo I.5).

-----oOo-----

B) LA MULTIPLICATION VEGETATIVE IN VITRO.

1) La culture de fragments de plantules de semis.

a) Matériel et méthodes.

a.1 Origine du matériel végétal.

Les plantules qui ont servi de matériel de base à ce travail nous ont été fournies par les Ets Vacherot et Lecoufle à Boissy Saint Léger (France). Il s'agit de plantules de semis cultivées aseptiquement sur un milieu de culture synthétique dont nous ignorons la composition et provenant des croisements suivants :

23328	P. cv. Redfan	X P. cv. Redfan
23340	(P. cv. Concorde	X P. cv. H. Lecoufle) = cv. Conquête
23706	(P. cv. Concorde	X P. cv. H. Lecoufle) = cv. Conquête
23721	(P. cv. Minouche	X P. cv. Redfan) = cv. Fifi
23892	P. cv. Danse	X P. cv. Lipperose
23996	P. cv. Apollinaire	X P. cv. Apollinaire
24114	P. cv. Raptigny	X P. cv. Raptigny
24121	P. cv. Scaramouche	X P. cv. Scaramouche

a.2 Préparation des explantats.

Plusieurs types d'explantats ont été mis en culture : des fragments de "tige", de racines et de feuilles ainsi que des méristèmes terminaux et axillaires.

a.2.1 Fragments de feuilles.

Les feuilles prélevées aseptiquement sur les plantules de semis, sont sectionnées en carrés d'un centimètre de côté et les explantats sont repiqués à plat, la face dorsale contre le milieu de culture.

a.2.2 Fragments de "tige".

Les plantules au stade 4 feuilles sont prélevées aseptiquement et disséquées dans des boîtes de Pétri stériles. Les

racines sont d'abord sectionnées au plus près de la base de la plantule puis les feuilles sont incisées dans leur partie supérieure, le long de la nervure centrale. Les deux moitiés du limbe sont ensuite écartées l'une de l'autre et arrachées pour mettre à nu les méristèmes axillaires. Ces opérations sont répétées pour chaque feuille jusqu'à ce qu'il ne reste plus que les deux feuilles terminales qui sont soit laissées intactes, soit sectionnées à 1 cm au dessus du méristème terminal (Fig. I.1).

Les explantats composés de la tige et des deux feuilles terminales, sont repiqués en position normale, la base enfoncée d'un demi centimètre sous la surface du milieu gélosé.

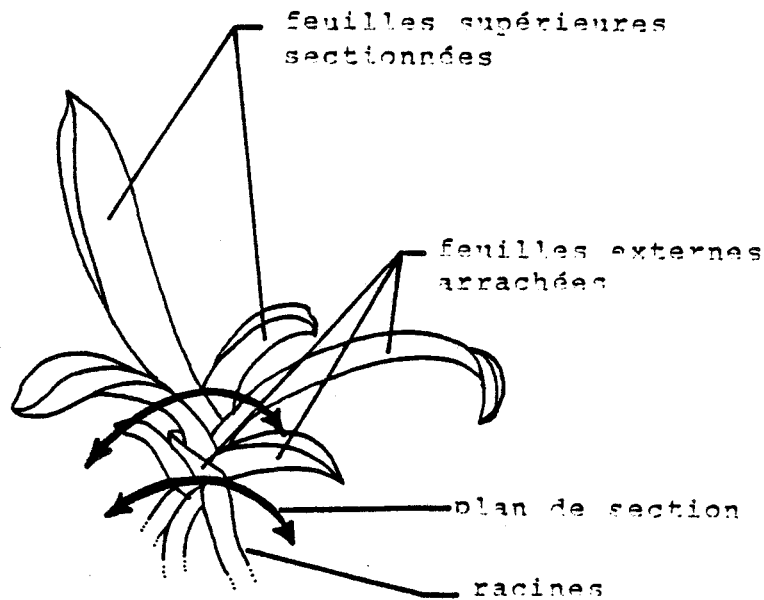


Fig. I.1 : Mode de préparation des fragments de tige.

a.2.3 Fragments de racines.

Les racines sectionnées lors de la préparation des fragments de tige sont récupérées et coupées en tronçons d'un centimètre de long, les tronçons sont donc munis ou démunis de l'apex selon leur position originelle sur la racine.

Les explantats sont repiqués horizontalement à la surface du milieu gélosé.

a.2.4 Méristèmes axillaires et terminaux.

Si les méristèmes sont prélevés sur des plantes cultivées en serre, celles ci sont préalablement désinfectées par une solution d'hypochlorite de calcium à 100 g/l additionnée de quelques gouttes de Tween 80, pendant 15 minutes et rincées trois fois à l'eau distillée stérile (5 minutes) puis disséquées comme pour la préparation des fragments de tige. Ceux ci sont à nouveau stérilisés dans une solution d'hypochlorite de calcium à 70 g/l pendant 10 minutes et rincés trois fois (5 minutes) à l'eau distillée stérile.

Les méristèmes sont ensuite prélevés au scalpel à lame fine (Swann Morton N° 11) par incision conique et placés immédiatement dans une solution nutritive. Les deux feuilles supérieures restantes sont incisées longitudinalement le long de la nervure centrale et chaque moitié du limbe est délicatement arrachée avec des pinces afin de ne pas léser le méristème terminal par un coup de lame de scalpel. Le méristème terminal mis à nu est prélevé par une incision en V et immédiatement repiqué.

Toutes les opérations d'excisions sont réalisées sous loupe binoculaire.

Lorsque les méristèmes sont prélevés sur des plantes déjà stériles, la même technique est utilisée mais il n'y a pas de désinfection préalable à l'hypochlorite.

a.3 Préparation des milieux de culture.

Le milieu de base que nous avons utilisé comprend la solution minérale de FONNESBECH (1972 a), les vitamines du même auteur, 20 g/l de saccharose, 7 g/l d'agar-agar ainsi que les additifs suivants : inositol: 100 mg/l; glyco-colle : 2 mg/l; hydrolysate de caséine (Merck) : 2 g/l.

Le milieu de culture est préparé comme il est indiqué dans la table I.2.

Toutefois, nous avons modifié constamment la composition du milieu de culture au fur et à mesure des résultats que nous avons obtenus au cours de cette étude. Ces modifications seront précisées par la suite.

COMPOSANTS	Quantité par litre de milieu	Concentration de la solu- tion mère	Volume de solution mère / l	Remarques
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	400 mg	40 g/l	10 ml	
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	300 mg	30 g/l	10 ml	
KH_2PO_4	250 mg	25 g/l	10 ml	
K_2HPO_4	212 mg	21,2 g/l	10 ml	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250 mg	25 g/l	10 ml	
Na_2EDTA	37,8 mg	3,78 g/l	10 ml	
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8 mg	2,78 g/l	10 ml	
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	25 mg	25 g/l	1 ml	une seule solution
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 mg	10 g/l		
H_3BO_3	10 mg	10 g/l		
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,5 mg	2,5 g/l		
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,25 mg	0,25 g/l		
NiCl	0,25 mg	0,25 g/l		
$\text{AlCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,25 mg	0,25 g/l		
glycocolle	2 mg	200 mg/100 ml	1 ml	une seule solution éthanol 95%
acide nicotinique	1 mg	100 mg/100 ml		
thiamine HCl	0,5 mg	50 mg/100 ml		
pyridoxine HCl	0,5 mg	50 mg/100 ml		
inositol	100 mg	-	-	
hydrol. caséine	2 g	-	-	
saccharose	20 g	-	-	
eau distillée Q.S.P.	1 l	-	-	
agar-agar	7 g	-	-	

Le pH est ajusté à 6,5 avant autoclavage.

La solution mère de K_2HPO_4 est ajoutée après dilution complète de la solution minérale afin d'éviter la formation d'un précipité insoluble de phosphate de calcium.

Les milieux de culture sont stérilisés à l'autoclave pendant 25 minutes à 110°.

Table I.2 : Composition et préparation du milieu de culture de base.



a.4 Conditions de culture.

Les cultures sur milieu solide sont entreposées dans une pièce climatisée à $25^{\circ} \pm 1^{\circ}$ et éclairées 16 heures par jour à l'aide de tubes fluorescents Sylvania Gro Lux sous une intensité approximative de 500 Lux.

Les cultures en milieu liquide agité sont placées inclinées à 45° sur un agitateur rotatif Biolafitte tournant à $70 \text{ t} \cdot \text{mn}^{-1}$ dans une pièce conditionnée à $21^{\circ} \pm 1^{\circ}$ située à l'Est et reçoivent en plus de la lumière du jour, un éclairage d'appoint fourni 12 heures par jour par des tubes fluorescents "Cool White De Luxe". L'intensité de l'éclairage est d'environ 1000 Lux.

Les expériences se rapportant à l'effet de lumière monochromatiques ont été réalisées en caissons climatisés. Des batteries de tubes colorés PHILIPS TL 40 W sont disposés le long de parois latérales de chacun des caissons. Des filtres ROHM et HAAS, interposés entre les tubes colorés et les cultures permettent de supprimer les radiations indésirables. Les caractéristiques des tubes et des filtres ainsi que les résultats des analyses de la lumière transmise, mesurée grâce à un spectroradiomètre ISCO, modèle SR, sont indiqués dans la figure I.2.

b) Résultats.

b.1 Cultures de fragments de tige.

Différents régulateurs de croissance ont été additionnés aux milieux de culture afin d'étudier leur action, isolément ou en associations, sur le développement des fragments de tige.

Auxines :

acide indolylacétique (AIA)

acide naphtylacétique (ANA)

acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D).

Gibbérelline :

acide gibbérellique (AG_3).

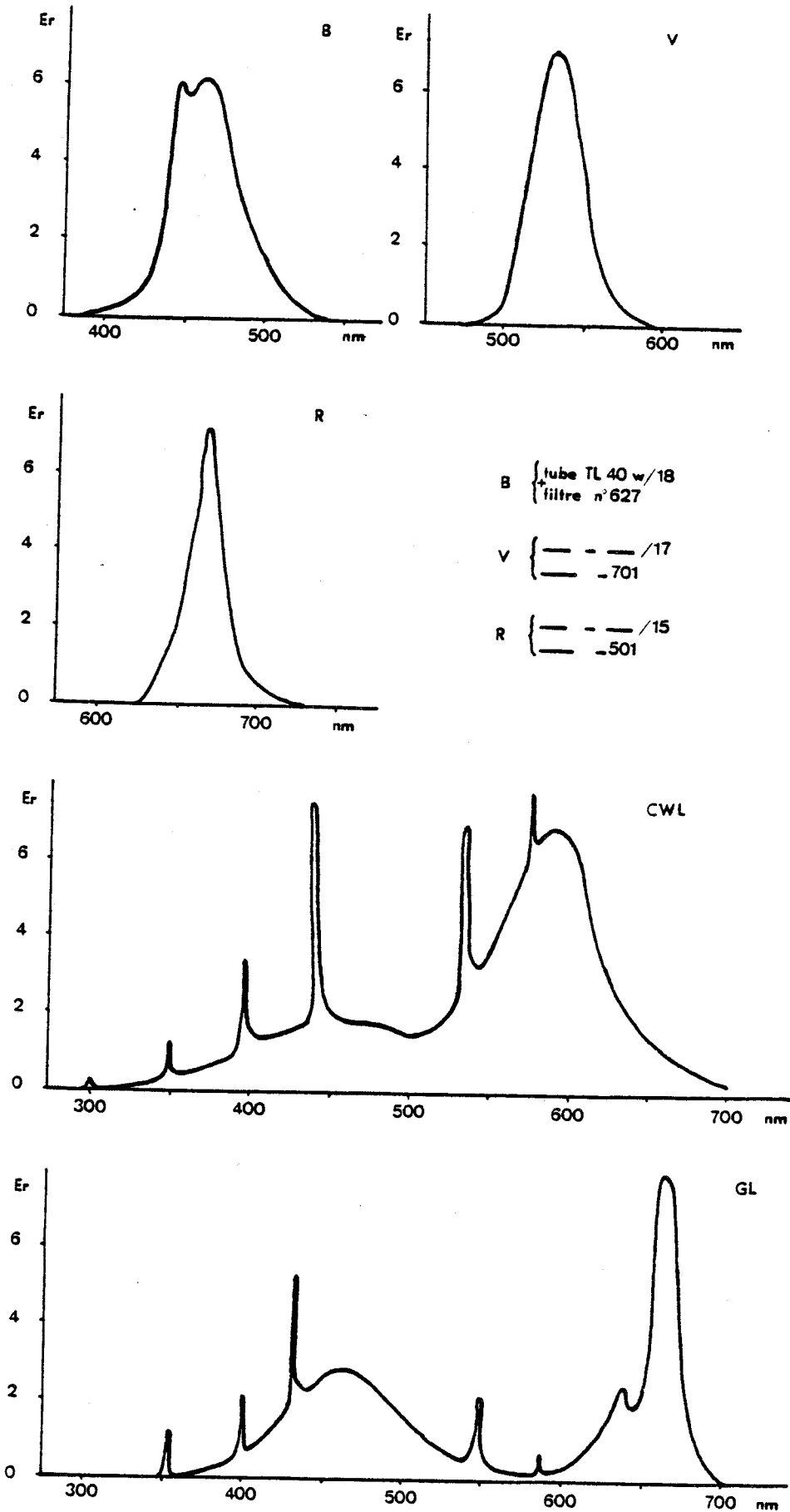


Fig. 7.2 : Spectres des lumières relativement monochromatiques transmises bleues (B), violetes (V) et rouges (R), et de lumières émises par des tubes fluorescents Sylvania Cool White de Luxe (CWL) et Gro Lux (GL).

Cytokinines :

kinétine (6-furfurylaminopurine) (Kin)

6-benzylaminopurine (BAP)

6(8,8-diméthylallylaminopurine = N⁶-(Δ^2 -isopenthényladénine) (IP)

N-benzyl-9-(2-tetrahydropyranyl)aminopurine (PBA).

b.1.1 Développement des explantats en absence de régulateurs de croissance.

Repiqués sur le milieu de base dépourvu de régulateurs de croissance, les fragments de tige se développent en une nouvelle plantule. Le méristème terminal reprend son activité et donne naissance à de nouvelles feuilles tandis que des racines apparaissent. Le développement ultérieur est en tout point identique à celui d'une plantule de semis.

Peu de temps après repiquage, on constate au niveau des zones sectionnées en contact avec le milieu de culture, la formation d'un halo noir dû à la libération dans le milieu de culture de composés de nature polyphénolique (MOPEL, 1974) qui se sont oxydés. Par la suite, toute la moitié supérieure du milieu de culture noircit.

Des dosages de la teneur en composés phénoliques des feuilles par le réactif de FOLIN-CIOCALTEUS (1927) selon la méthode de BRAY et THORPE (1954) modifiée par LEGRAND (1977) ont montré que la mise en culture après blessure provoque une augmentation importante de la teneur en phénols des tissus de feuilles et que la synthèse de ces composés est nettement favorisée par la lumière (Table I.3).

Cette synthèse de polyphénols étant extrêmement gênante par suite de leur phytotoxicité, nous avons additionné au milieu de culture de la polyvinylpyrrolidone (PVP) à 2 et 10 g/l, la PVP étant un adsorbant des phénols. Une réduction de la teneur en phénols des feuilles a bien été constatée lorsque la PVP est additionnée à 10 g/l mais parallèlement on constate une mortalité importante des explantats (Table I.3).

Une autre solution consiste à additionner au milieu de culture du charbon activé pulvérulent à raison de 2 g/l, le

charbon étant un excellent adsorbant des phénols. Bien qu'en présence de charbon, la croissance des plantules soit nettement favorisée, cet additif ne peut être employé constamment puisqu'il rend inefficace, toute adjonction au milieu de culture de régulateurs de croissance qu'il adsorbe également.

Durée de culture (semaines)	0	3	6
Conditions de culture			
- témoin	0,71	-	-
- culture à l'obscurité	-	1,10	0,98
- culture à la lumière			
+ PVP 0	-	1,75	1,87
+ PVP 2 g/l	-	1,98	2,09
+ PVP 10 g/l	-	1,63	1,66

Table I.3 : Teneurs en phénols de feuilles de Phalaenopsis exprimées en mg d'équivalent d'acide chlorogénique pour 1 g de feuille fraîche.

b.1.2 Influence des régulateurs de croissance.

b.1.2.1 Les auxines.

b.1.2.1.1 L'acide naphtylacétique.

Des fragments de tige ont été repiqués sur le milieu de base additionné d'ANA aux concentrations suivantes : 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} et 10^{-5} M/l. Après deux mois de culture, on constate un accroissement très important du nombre des racines à 10^{-5} M/l (Fig. I.3). Aux concentrations inférieures, nous n'avons pas remarqué de modifications de développements des explantats.

b.1.2.1.2 L'acide 2,4-dichlorophenoxyacétique.

Des fragments de tige ont été repiqués sur le milieu de base additionné de 2,4-D aux concentrations suivantes : 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} et 10^{-5} M/l. Les explantats cultivés en présence de 10^{-6} M/l de 2,4-D présentent après deux mois de culture des protubérances généralement au nombre de deux, à la base des

explantats. Ces protubérances sont vertes, lisses et dépourvues de rhizoïdes. Celles ci peuvent atteindre un diamètre de 8 mm environ. Lorsque ces protubérances sont séparées de l'explantat et repiquées sur un milieu sans facteur de croissance, elles développent des racines (Fig. I.4). Le 2,4-D à cette concentration provoque donc une perturbation de la morphologie des racines. Aux concentrations supérieures à 10^{-6} M/l, les explantats meurent rapidement. Pour des doses plus faibles, nous n'observons pas de modifications du développement des plantules.

b.1.2.2 L'acide gibbérellique.

L'adjonction d'acide gibbérellique aux concentrations 10^{-7} , 10^{-6} et 10^{-5} M/l, ne modifie pas le développement des explantats mais plus la concentration en AG_3 est élevée, plus le taux de survie est faible.

b.1.2.3 Les cytokinines.

b.1.2.3.1 La kinétine.

Additionnée au milieu de culture, la kinétine ne modifie pas le développement des explantats jusqu'à 10^{-6} M/l. Au delà, on constate uniquement une inhibition de la rhizogénèse.

b.1.2.3.2 La benzylaminopurine.

b.1.2.3.2.1 Observations morphologiques.

La benzylaminopurine provoque la formation de bourgeons qui apparaissent à la base de l'explantat, ces bourgeons dont le nombre varie généralement entre 1 et 3 se développent par la suite en plantules d'allure identique aux plantules mères (Fig I.5 et I.6, Photo I.6).

Lorsque les explantats sont repiqués sur le milieu de FONNESBECH, la concentration optimale en BAP pour l'apparition des bourgeons est de $5 \cdot 10^{-6}$ M/l (Table I.4).

La croissance des bourgeons est également sous la dépendance de la concentration en BAP du milieu de culture puisqu'au delà de 10^{-5} M/l, on constate un blocage de la différencia-

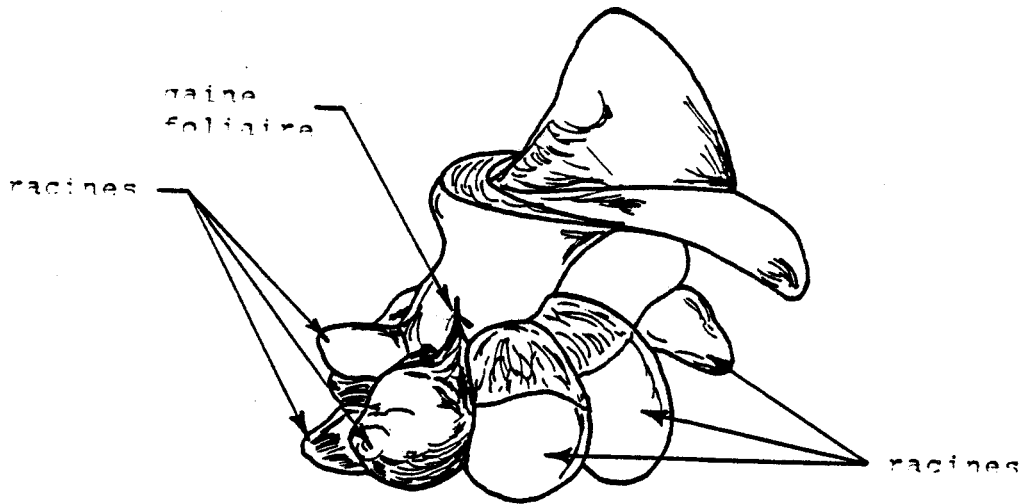


Fig. 1.3 : Fragment de tige après 75 jours de culture en présence de 10^{-5} μ /l d'ANA.

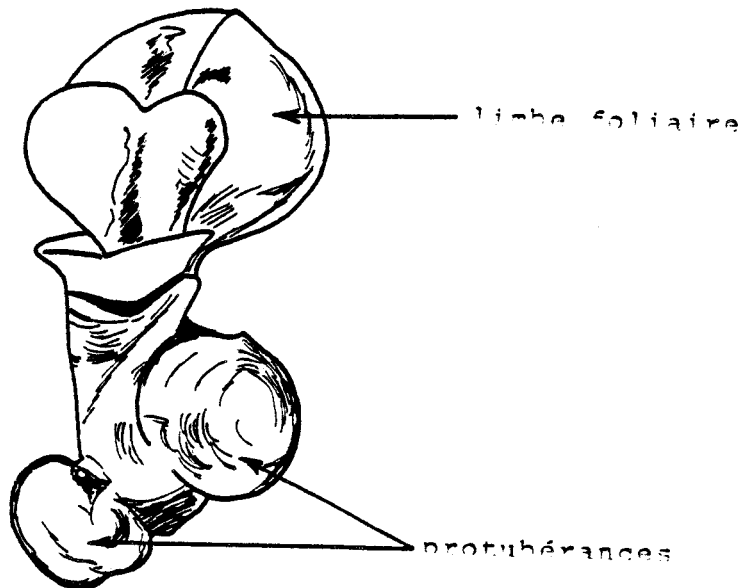


Fig. 1.4 : Fragment de tige après 75 jours de culture en présence de 10^{-6} μ /l de 2,1-D.

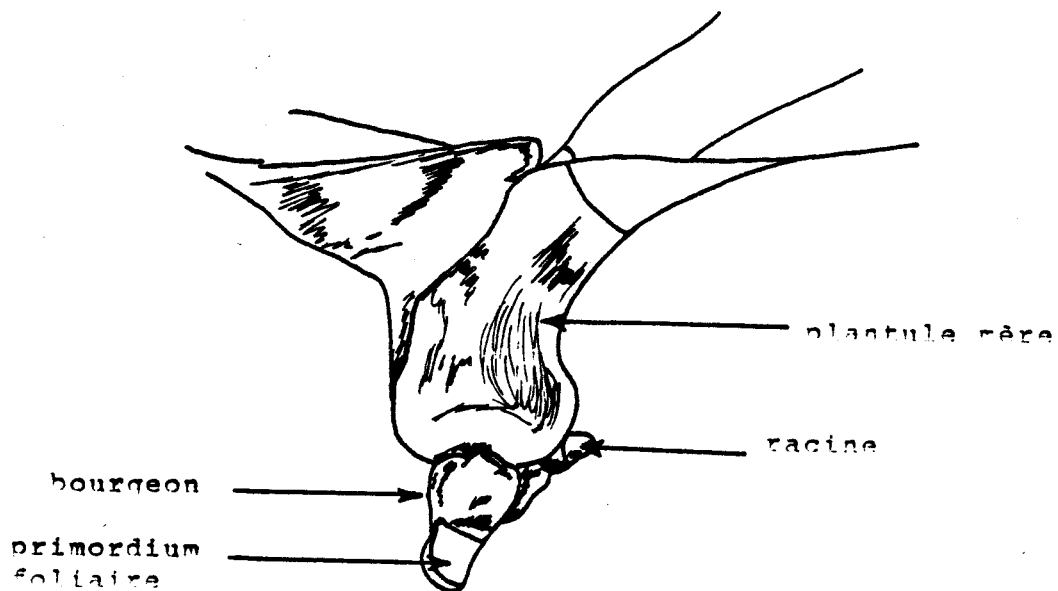


Fig. 1.5 : Fragment de tige cultivé en présence de $5 \cdot 10^{-6}$ M/l de BAP, présentant un bourgeon.

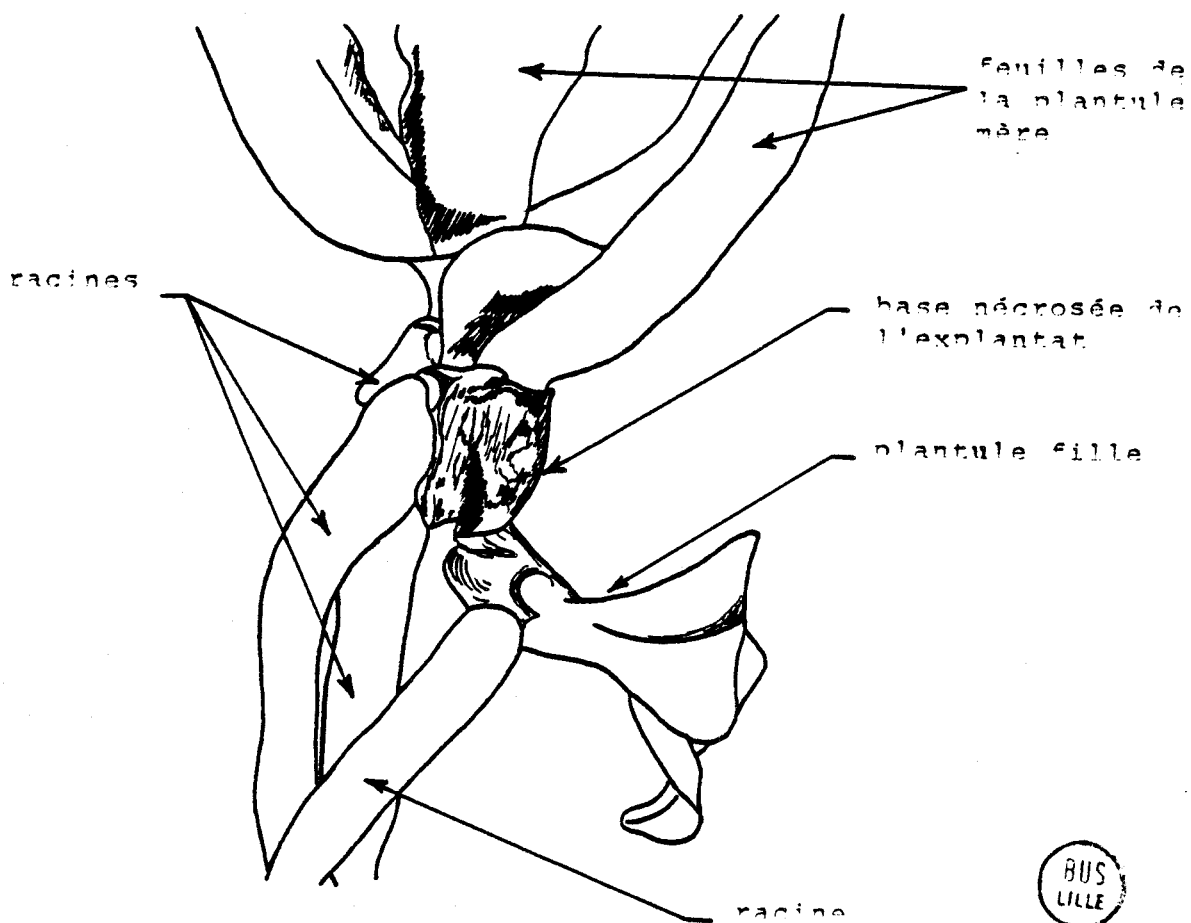


Fig. 1.6 : Fragment de tige cultivé en présence de $5 \cdot 10^{-6}$ M/l de BAP, présentant une plantule fille.



tion des plantules filles.

BAP	Nb Ex	% S	% Pf	Pf < 5	Pf > 5	Pf T	F	R
10^{-6}	20	85	36	0,50	0,67	1,17	3,6	3,0
$5 \cdot 10^{-6}$	21	95	70	0,44	1,25	1,69	4,1	0,7
10^{-5}	22	73	29	0,75	0,25	1,00	2,9	0,3
$5 \cdot 10^{-5}$	23	52	22	1,00	0,00	1,00	1,8	0,0

Table I.4 : Influence de la concentration en BAP (M/l) sur le bourgeonnement de fragment de tige in vitro après 67 jours de culture. (cv 23328).

Nb Ex : nombre d'explantats repiqués par condition.

% S : pourcentage d'explantats survivants en fin de culture.

% Pf : pourcentage d'explantats présentant des bourgeons.

Pf < 5 : nombre de plantules filles de taille inférieure à 5 mm par explantat présentant ces formations.

Pf > 5 : nombre de plantules filles de taille supérieure à 5 mm par explantat présentant ces formations.

Pf T : nombre total de bourgeons par explantat présentant ces formations.

F : nombre de feuilles apparues en cours de culture sur la plantule mère.

R : nombre de racines apparues en cours de culture sur la plantule mère.

La BAP joue également un rôle important sur la croissance des fragments de tige (plantules mères). A $5 \cdot 10^{-6}$ M/l, la formation de feuilles est favorisée par la présence de BAP mais la taille de celles ci est nettement plus réduite. Un effet toxique des concentrations supérieures à $5 \cdot 10^{-6}$ M/l se traduit par un ralentissement important de la croissance exprimée en nombre de feuilles par explantat en fin de culture, ainsi que par une augmentation de la mortalité. Enfin la BAP inhibe plus ou moins totalement la rhizogénèse selon la dose employée.

Afin de déterminer la provenance des bourgeons qui apparaissent sous l'action de la BAP, l'expérience suivante a été entreprise : des plantules sont d'abord cultivées à l'obscurité pendant 60 jours sur le milieu de base dépourvu de régulateur de croissance. La culture à l'obscurité provoque un allongement des entrenœuds de la tige, certaines plantules présentant un espacement entre les nœuds d'environ 1 cm. Les plantules sont ensuite prélevées aseptiquement et effeuillées afin de mettre à nu les méristèmes axillaires puis repiquées sur le même milieu mais additionné de 5.10^{-6} M/l de BAP. Après deux mois de culture, on observe que tous les bourgeons apparaissent au niveau des nœuds et que ces bourgeons sont tous situés dans un même plan et en position alterne

D'après leur lieu d'apparition et leur position les uns par rapport aux autres, on peut donc conclure que les bourgeons sont issus du développement des méristèmes axillaires.

b.1.2.3.2 Observations anatomiques.

Les observations microscopiques de coupes longitudinales de plantules cultivées pendant deux mois et demi en présence de 5.10^{-6} M/l de BAP ont montré que les bourgeons se développent à partir des méristèmes axillaires présents sur l'explantat (Photo I.7).

On constate également que les méristèmes axillaires de la base de la plante ont un état de développement plus avancé (Fig. I.7 c et I.8 c) que les méristèmes situés en position médiane (Fig. I.8 b et I.9) alors que les méristèmes axillaires supérieurs sont dormants (Fig. I.8 a et I.10).

La présence de BAP dans le milieu de culture lève l'inhibition des méristèmes axillaires les plus éloignés du méristème apical. On retrouve donc un phénomène de simple dominance apicale.

b.1.2.3.3 L'isopentényladénine.

L'adjonction au milieu de culture de 5.10^{-6} M/l d'IPA provoque le développement des méristèmes axillaires présents

- 1 Méristème apical du bourgeon.
- 2 Primordia foliaires du bourgeon.
- 3 Limbe foliaire.
- 4 Vaisseaux de xylème.
- 5 Racine.
- 6 Base des racines sectionnées.

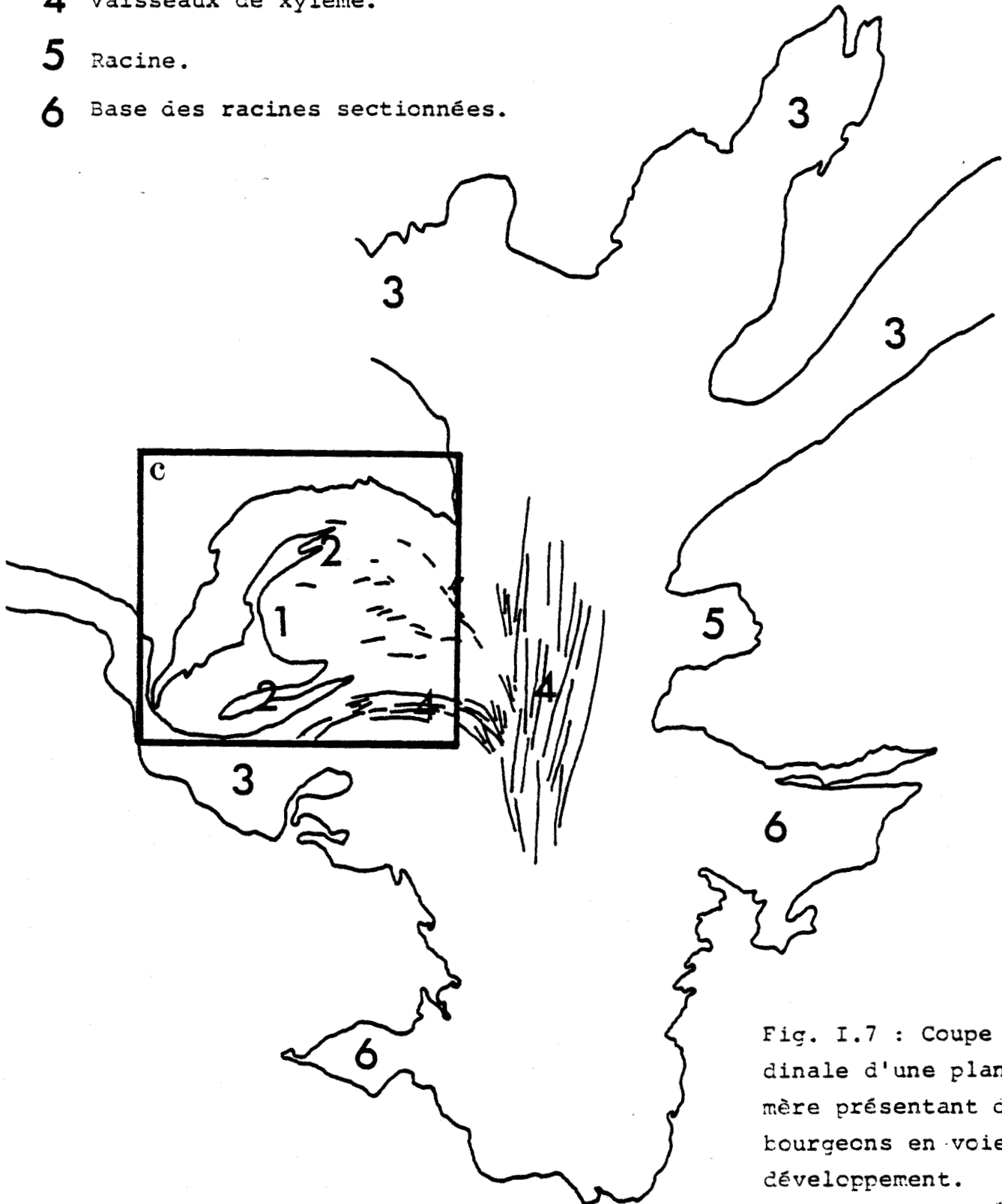


Fig. I.7 : Coupe longitudinale d'une plantule mère présentant des bourgeons en voie de développement.

1mm



- 1 Méristème apical du bourgeon. 64 -
- 2 Primordia foliaires du bourgeon.
- 3 Limbe foliaire.
- 5 Racine.
- 6 Base de racine sectionnée.

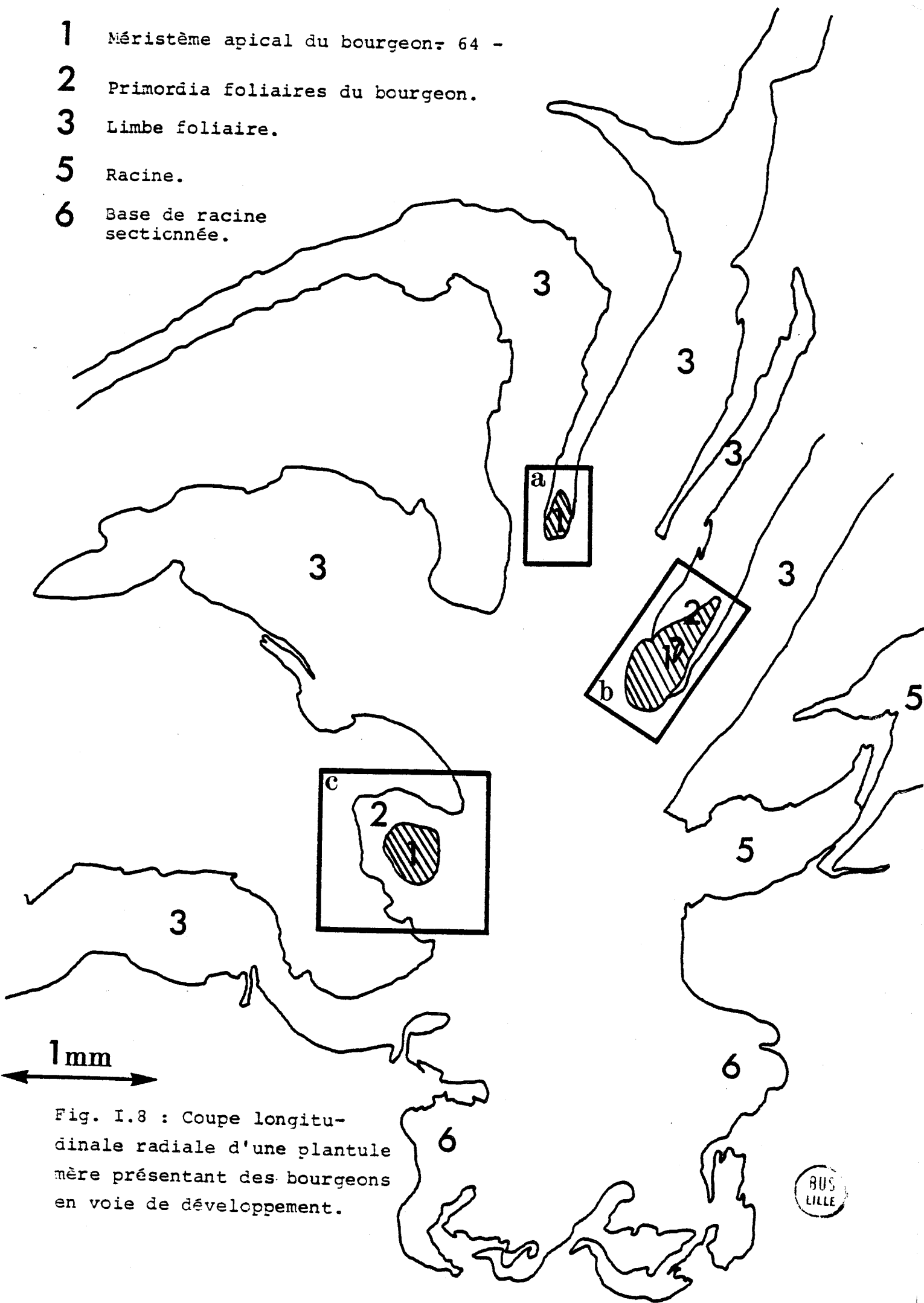


Fig. I.8 : Coupe longitudinale radiale d'une plantule mère présentant des bourgeons en voie de développement.

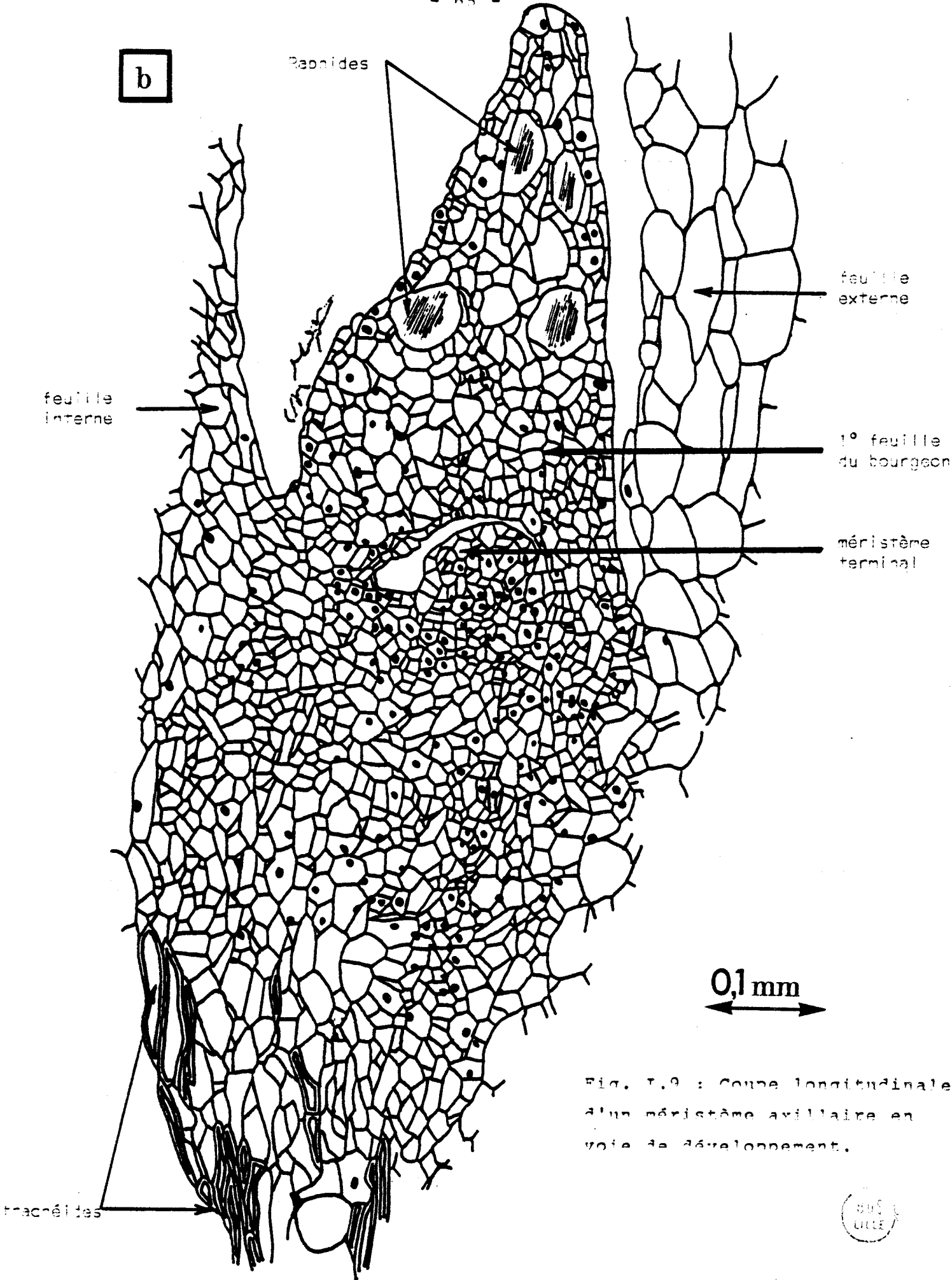


Fig. 1.9 : Coupe longitudinale d'un méristème axillaire en voie de développement.



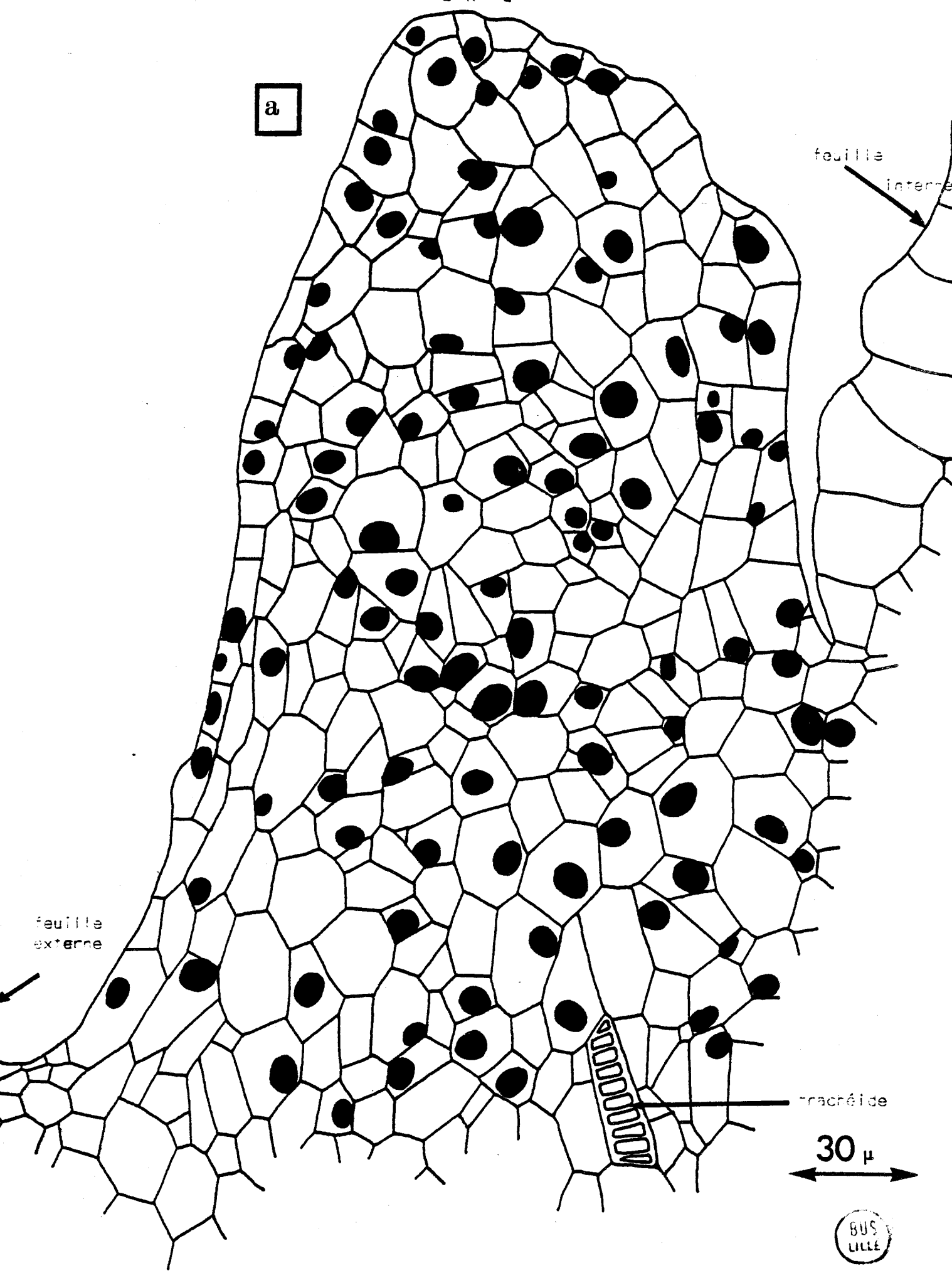


Fig. 1.10 : Coupe longitudinale d'un méristème axillaire supérieur.

sur les fragments de tige mais avec une efficacité moindre que la BAP.

L'IPA est toutefois moins toxique que la BAP puisque l'on n'observe pas de ralentissement de la croissance et il n'inhibe pas la rhizogénèse dans la gamme de concentration testée (Fig. I.11).

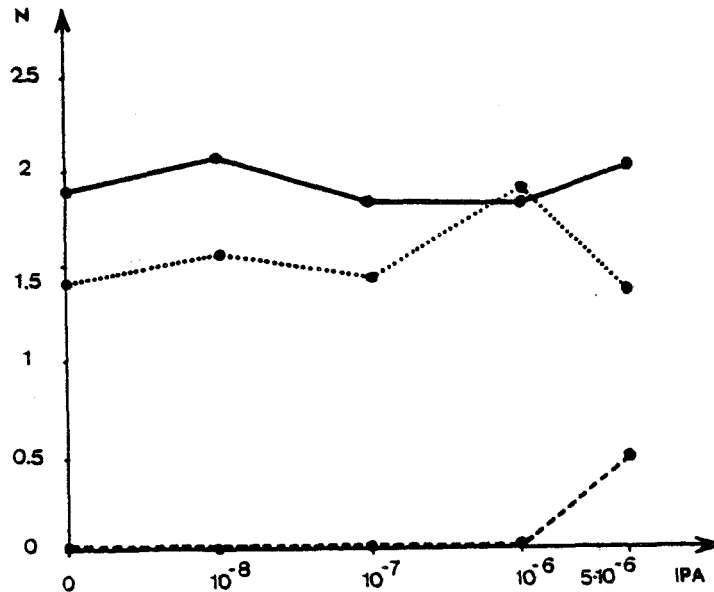


Fig. 11 : Influence de l'IPA (en M/l) sur le nombre (N) de feuilles (—), de racines (···) et de bourgeons (---) de fragments de tiges après 75 jours de culture (cv 23721).

b.1.2.3.4 La benzyl-tetrahydropyranyl-adénine.

La PBA induit également le développement des méristèmes axillaires des fragments de tige, son efficacité étant légèrement inférieure à celle de la BAP mais supérieure à celle de l'IPA.

La PBA d'une part inhibe la rhizogénèse puisqu'à la concentration de 5.10^{-6} M/l, nous n'observons plus aucune formation de racines et d'autre part ralentit la croissance, le nombre de feuilles par explantat décroît avec l'augmentation de la concentration en PBA (Fig. I.12).

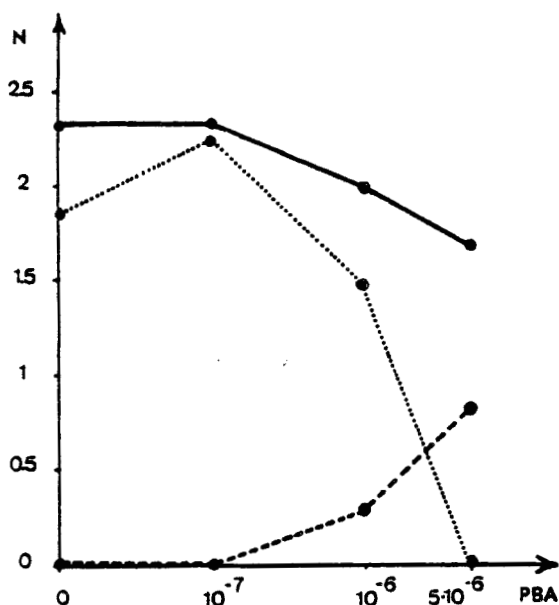


Fig. I.12 : Influence de la PBA (en M/l) sur le nombre (N) de feuilles (—), de racines (···) et de bourgeons (---) de fragments de tige après 75 jours de culture (cv 23328).

b.1.2.4 Les associations de régulateurs de croissance.

b.1.2.4.1 L'association BAP - auxine.

L'adjonction d'auxine au milieu de culture renfermant 5.10^{-6} M/l de BAP modifie le développement des fragments de tige (Fig. I.13).

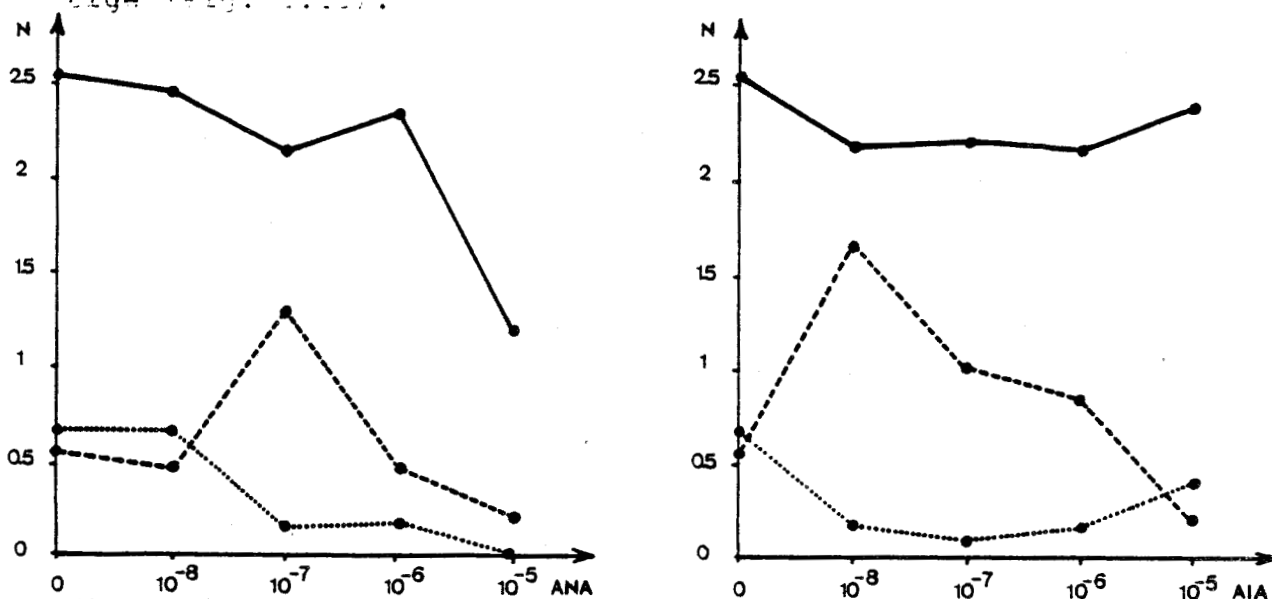


Fig. I.13 : Influence de la concentration en ANA et AIA (M/l) sur le nombre de feuilles (—), de racines (···) et de bourgeons (---) de fragments de tige cultivés en présence de 5.10^{-6} M/l de BAP pendant 75 jours (cv 23328).

Une concentration importante d'ANA (10^{-5} M/l) retarde la croissance des explantats, ce qui se traduit par une diminution du nombre de feuilles et du nombre de racines apparues après 75 jours de culture, alors que l'addition d'AIA ne modifie pas la croissance et lève partiellement l'inhibition de la rhizogénèse aux concentrations élevées (10^{-5} M/l).

La formation de bourgeons est nettement stimulée lorsque la concentration en auxine est égale à 10^{-7} M/l pour l'ANA et 10^{-8} M/l pour l'AIA.

Si au milieu de culture est additionné soit de l'ANA (10^{-7} M/l), soit de l'AIA (10^{-8} M/l), la variation de la concentration en BAP dans une gamme comprise entre $2 \cdot 10^{-6}$ et $8 \cdot 10^{-6}$ M/l, montre que la concentration optimale en BAP pour la formation de bourgeons est de l'ordre de $2 \cdot 10^{-6}$ en présence d'ANA et $6 \cdot 10^{-6}$ en présence d'AIA (Fig. I.14).

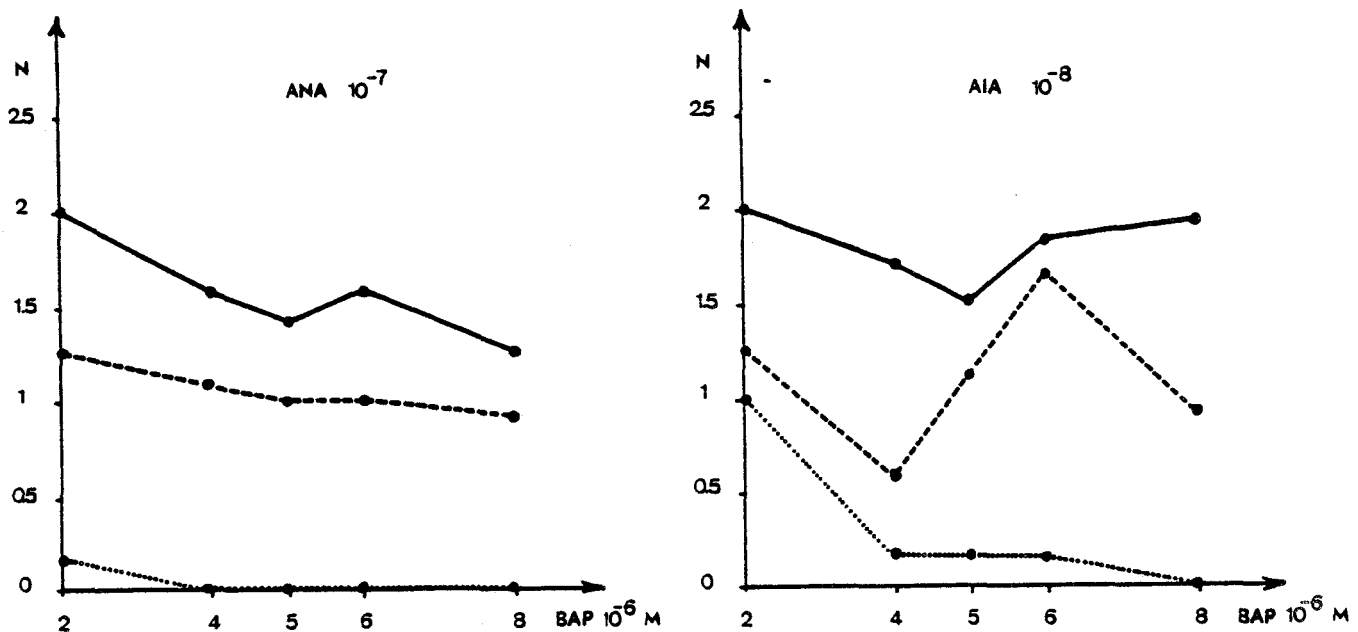


Fig. I.14 : Influence de la concentration en BAP (10^{-6} M/l) sur le nombre (N) de feuilles (—), de racines (···) et de bourgeons (---) de fragments de tige cultivés pendant 75 jours en présence d'ANA (10^{-7} M/l) ou d'AIA (10^{-8} M) (cv 23328).

Enfin nous avons également constaté que l'augmentation de la concentration en BAP inhibe la rhizogénèse quelle que

soit l'auxine associée et retarde la croissance en présence d'ANA.

b.1.2.4.2 Les associations BAP - PBA - IPA.

b.1.2.4.2.1 Les associations BAP - IPA et BAP - PBA.

Des fragments de tige ont été cultivés en présence de BAP à 2 concentrations différentes, l'une optimale pour la formation de bourgeons ($5 \cdot 10^{-6}$ M/l), l'autre inférieure à l'optimum (10^{-6} M/l) en association avec une autre cytokinine, soit l'IPA (10^{-7} ou 10^{-6} M/l), soit la PBA (10^{-7} ou 10^{-6} M/l) (Fig. I.15 et I.16).

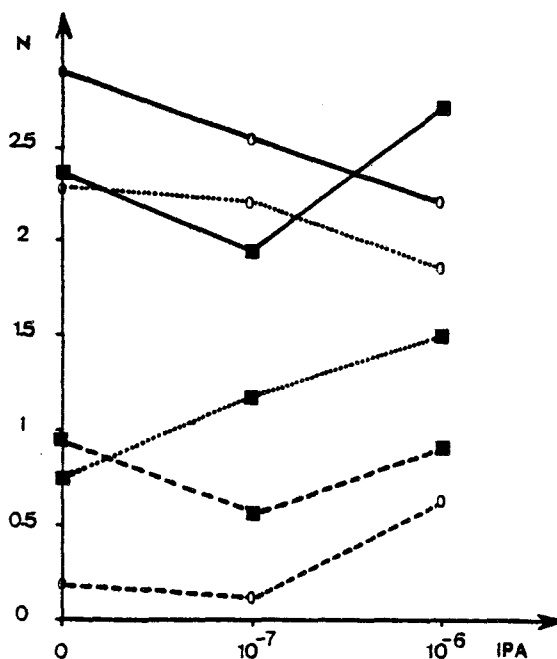


Fig. I.15 : Influence de la concentration en IPA (M/l) sur le nombre (N) de feuilles (—), de racines (···) et de bourgeons (---) de fragments de tiges cultivés pendant 75 jours en présence de $5 \cdot 10^{-6}$ (■) ou 10^{-6} (○) M/l de BAP (cv 23328).

Pour la formation de bourgeons, on constate que lorsque la BAP est en concentration optimale, l'effet cytokinique de l'autre régulateur de croissance (IPA ou PBA) ne s'additionne pas à celui de la BAP alors que lorsque la BAP est en concentration infraoptimale, il y a synergie des effets des deux cytokinines.

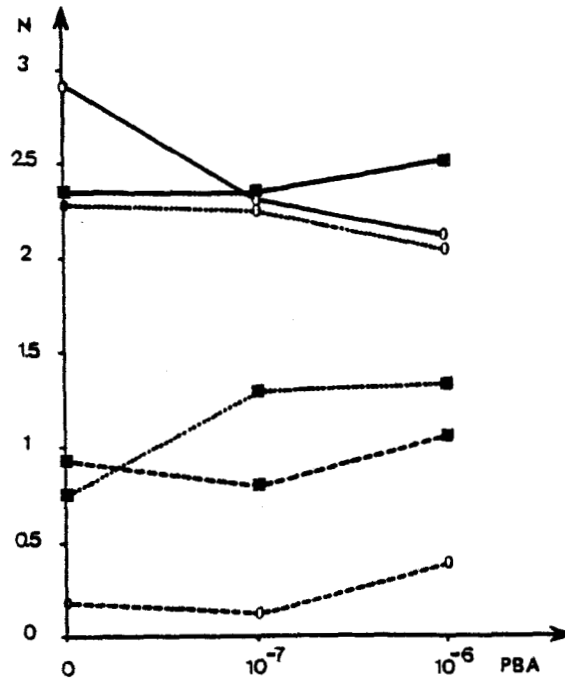


Fig. I.16 : Influence de la concentration en PBA (M/l) sur le nombre de feuilles (—), de racines (···) et de bourgeons (---) de fragments de tiges cultivés pendant 75 jours en présence de $5 \cdot 10^{-6}$ (■) ou 10^{-6} (○) M/l de BAP (cv 23328).

On constate également que l'addition de PBA ou d'IPA à raison de 10^{-6} M/l au milieu contenant de la BAP à $5 \cdot 10^{-6}$ M/l provoque une levée d'inhibition de la rhizogénèse due à la présence de BAP ainsi qu'une dérèpression de la croissance mesurée par le nombre de feuilles apparues pendant la culture.

Par contre, lorsque la BAP est en concentration infraoptimale, l'augmentation de la dose de l'autre cytokinine montre les phénomènes classiques dus à la présence d'une cytokinine : inhibition de la rhizogénèse, stimulation du bourgeonnement ainsi qu'une légère répression de la croissance.

b.1.2.4.2.2 Association PBA - IPA.

Des cultures de fragments de tige sur milieu de base additionné de PBA (10^{-6} ou $5 \cdot 10^{-6}$ M/l) et d'IPA (10^{-8} , 10^{-7} ou 10^{-6} M/l) ont fourni sensiblement les mêmes résultats que lorsque le milieu renferme de la BAP associée à une autre cytokinine (Fig. I.17).

Lorsque la PBA est présente à une concentration infra-

optimale pour le bourgeonnement, l'addition d'IPA stimule le bourgeonnement et inhibe la rhizogénèse alors que l'IPA employée seule n'a pratiquement pas d'influence sur la rhizogénèse.

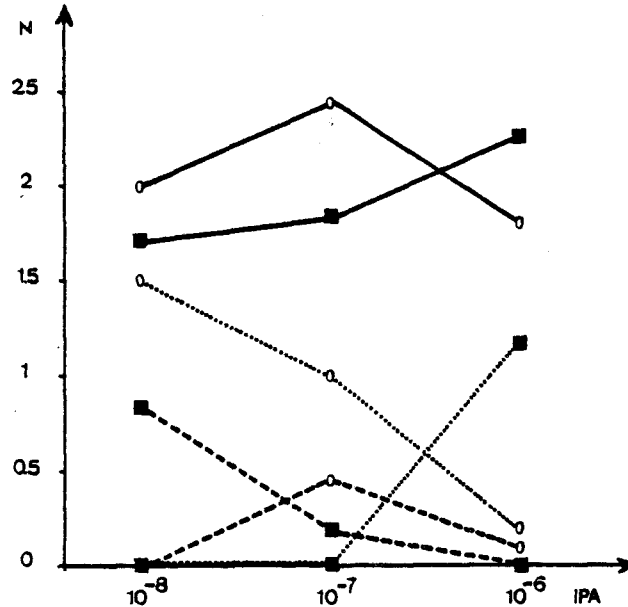


Fig. I.17 : Influence de la concentration en IPA (M/l) sur le nombre (N) de feuilles (—), de racines (···) et de bourgeons (---) de fragments de tige cultivés pendant 75 jours en présence de $5 \cdot 10^{-6}$ (■) ou 10^{-6} (○) M/l de PBA (cv 23721).

Par contre, lorsque la cytokinine la plus active sur le bourgeonnement (PBA) est en concentration optimale, l'addition d'IPA lève l'inhibition de la rhizogénèse provoquée par la PBA et provoque une dérépression de la croissance de l'explantat.

D'autre part, l'addition de 10^{-6} M/l d'IPA, concentration insuffisante pour assurer le développement des méristèmes axillaires quand cette cytokinine est employée seule, ne permet pas non plus la formation de bourgeons, même en présence de $5 \cdot 10^{-6}$ M/l de PBA.

b.1.2.4.3 Association BAP - acide transcinnamique.

L'acide transcinnamique considéré comme une substance à propriété anti auxinique (VAN OVERBEEK, BLONDEAU et HORNE,

1954) associé à la BAP tel que le préconise ARDITTI (1976) ne favorise pas la formation de bourgeons et est même fortement toxique (Fig. I.18).

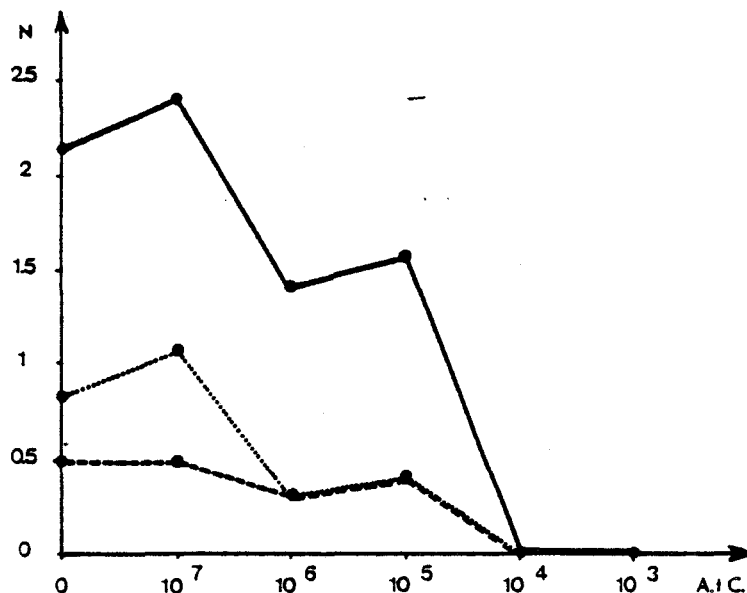


Fig. I.18 : Influence de la concentration en acide trans-cinnamique (AtC en M/l) sur le nombre de feuilles (—), de racines (···) et de bourgeons (---) de fragments de tige cultivés pendant 75 jours en présence de 5.10^{-6} M/l de BAP. (cv 23721).

b.1.2.4.4 Association BAP - composés organiques complexes à action cytokinique faible.

Deux composés connus pour leur faible activité cytokinique, l'adénine et la diphénylurée ainsi qu'une molécule voisine de la BAP, la benzoyladénine, ont été associées à la BAP présente à 5.10^{-6} M/l dans le milieu de culture.

De 0 à 20 mg/l, l'adénine stimule la formation de bourgeons et n'a pas d'action sur la rhizogénèse. Aux concentrations supérieures, l'adénine inhibe le bourgeonnement. Par contre entre 20 et 100 mg/l, l'adénine lève l'inhibition de la rhizogénèse due à la présence de BAP dans le milieu de culture, puis on observe à nouveau une inhibition de la rhizogénèse au delà de 100 mg/l (Fig. I.19).

Aux concentrations supérieures à 200 mg/l, l'adénine provoque une modification de la morphologie des plantules. On constate un gonflement de la base des plantules du à l'épaississement de la gaine des feuilles basales. Les limbes foliaires prennent un aspect charnu et deviennent cassants, d'autre part, leur couleur passe du vert au rouge sombre avec l'augmentation de la teneur du milieu en adénine.

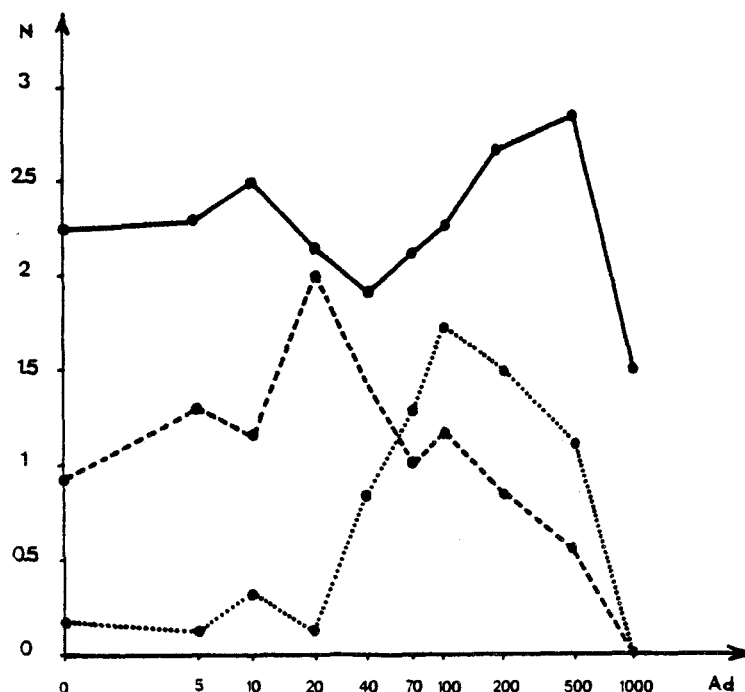


Fig. I.19 : Influence de l'adénine (Ad mg/l) sur le nombre (N) de feuilles (—), de racines (····) et de bourgeons (---) de fragments de tige cultivés pendant 75 jours en présence de 5.10^{-6} M/l de BAP (cv 23328).

La diphénylurée inhibe le bourgeonnement mais n'a pas d'influence sur la rhizogénèse. Ce composé montre un effet toxique à partir de 40 mg/l (Fig. I.20).

Au contraire, la benzoyladénine n'a pas d'action sur le bourgeonnement mais inhibe la rhizogénèse. Un effet toxique apparaît à partir de 500 mg/l.

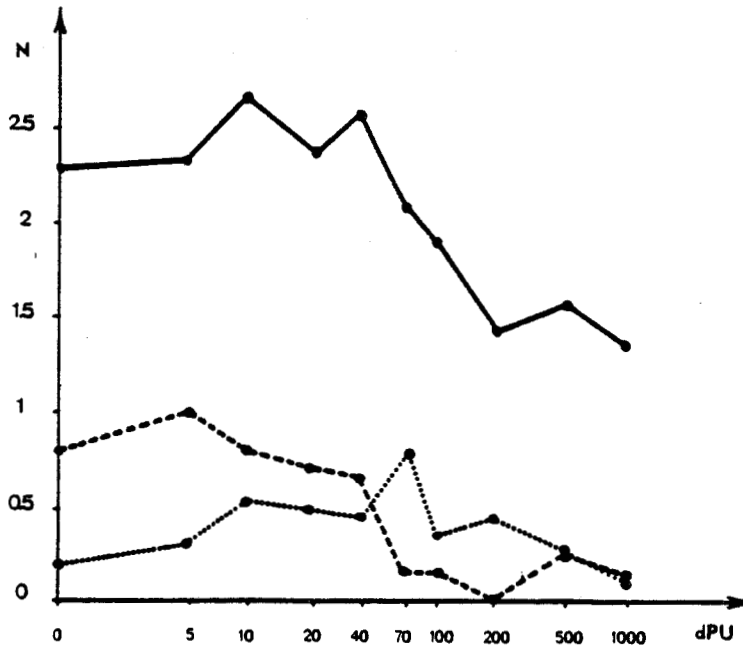


Fig. I.19 : Influence de la concentration en diphénylurée (dPU en mg/l) sur le nombre (N) de feuilles (—), de racines (···) et de bourgeons (---) de fragments de tige cultivés pendant 75 jours en présence de $5 \cdot 10^{-6}$ M/l de BAP (cv 23721).

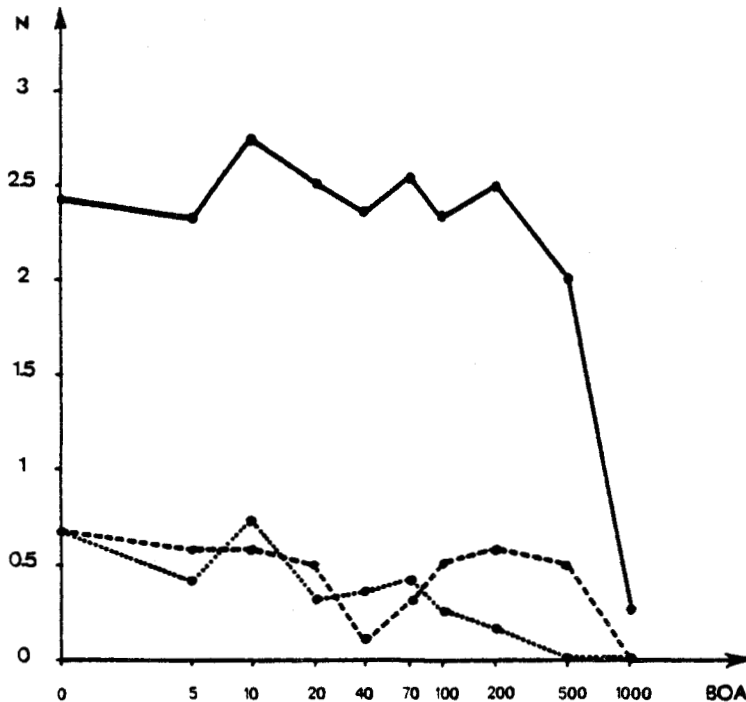


Fig. I.21 : Influence de la concentration en benzoyladénine (BOA en mg/l) sur le nombre (N) de feuilles (—), de racines (···) et de bourgeons (---) de fragments de tige cultivés pendant 75 jours en présence de $5 \cdot 10^{-6}$ M/l de BAP (cv 23721).

b.1.2.4.5 Association BAP - éthylène.

Des fragments de tige ont été cultivés en tubes bouchés au coton hydrophile et placés dans une enceinte en verre, close, dans laquelle ont été introduites différentes doses d'éthylène.

Après deux mois et demi de culture, on constate que l'éthylène provoque une mortalité importante des explantats et inhibe la néoformation de bourgeons normalement induite par la présence dans le milieu de culture de BAP à la concentration de 5.10^{-6} M/l (Table I.5).

Organes	ETHYLENE °/... V/V			
	0	5	10	20
feuilles	1,68	1,95	2,00	2,33
racines	0,27	0,30	0,38	0,00
bourgeons	1,60	0,95	1,13	0,33
% de mortalité	8	17	67	87

Table I.5 : Influence de l'éthylène (en °/... V/V) sur le nombre de feuilles, de racines et de bourgeons de fragments de tige cultivés pendant 75 jours en présence de 5.10^{-6} M/l de BAP (cv 23721).

b.1.3 Influence des conditions de culture et de la composition du milieu sur le bourgeonnement des fragments de tige.

b.1.3.1 Influence des facteurs liés au matériel végétal.

b.1.3.1.1 Influence du génotype.

13 plantules prélevées au sein d'une population hétérogène de plantules de semis (cv 23328) ont été cultivées sur le milieu de base additionné de 5.10^{-6} M/l de BAP. Après deux mois et demi de culture, les bourgeons qui se sont développés, sont isolés et repiqués sur le même milieu. Ces plantules filles développent à leur tour de nouveaux bourgeons qui sont à nouveau isolés et

repiqués. On a donc ainsi 13 lignées numérotées de 1 à 13. A la fin des 2° et 3° passages, on calcule un coefficient de multiplication égal au rapport du nombre de plantules repiquées au passage N + 1 sur le nombre d'explantats au passage N (Fig. I.22).

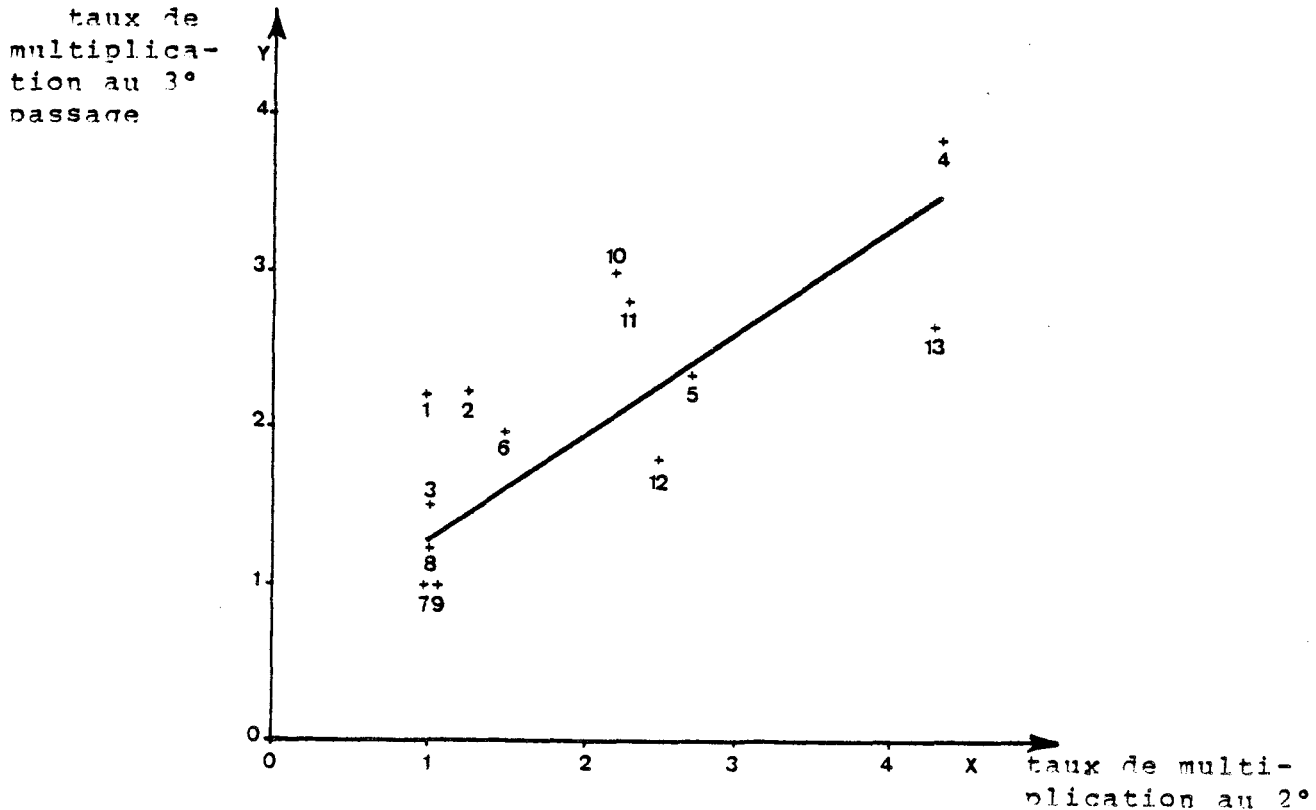


Fig. I.22 : Influence du génotype et du nombre de passages passage sur le taux de multiplication de différentes lignées représentées chacune par un point numéroté.

On constate qu'il existe une corrélation significative au seuil de 1% entre le taux de multiplication au 2° passage et le taux de multiplication au 3° passage. La droite de régression calculée est d'équation $Y = 0,65 X + 0,65$ avec un coefficient de corrélation $r = 0,77$.

Le génotype contrôle donc partiellement le développement des méristèmes axillaires des fragments de tige.

b.1.3.1.2 Influence du mode de préparation des explantats.

Le mode de dissection des plantules lors du prélèvement des explantats, modifie leur évolution au cours de la culture (Table I.6). Cinq types d'explantats ont été repiqués, ce sont :

- 1 - des plantules entières;
- 2 - des pousses feuillées sans racine;
- 3 - des pousses feuillées sans racine dont une partie de la base a été sectionnée transversalement;
- 4 - des fragments de tige effeuillés, sans racine et base sectionnée;
- 5 - des fragments de tige sectionnés longitudinalement dans un plan perpendiculaire au plan formé par les méristèmes axillaires.

		Nature de l'explantat				
		1	2	3	4	5
Organes	Feuilles	+	+	+	-	sect.
	Racines	+	-	-	-	long.
	Base	+	+	-	-	
Feuilles		1,90	1,90	1,90	1,84	0,75
Racines		0,48	0,46	0,19	0,48	0,05
Bourgeons		0,96	0,99	0,15	0,48	0,75
% Survivants		100	100	100	95	40
% Formation de protocormes		0	0	0	0	17

Table I.6 : Influence des techniques de prélèvement des explantats sur la formation des feuilles, des bourgeons et des racines ainsi que sur le pourcentage de survie et le pourcentage de formation de protocormes après 75 jours de culture en présence de BAP (5.10^{-6} M/l) (cv 23328).

On constate que la présence des racines sur l'explantat ne modifie pas son développement. Par contre l'ablation d'une partie de la base de l'explantat, donc l'élimination d'une partie des méristèmes axillaires présents, diminue le nombre de bourgeons par culture. L'élimination des feuilles, donc la mise à nu de la totalité des méristèmes axillaires, rétablit partiellement le taux de bourgeons formés.

La section longitudinale des explantats peut provoquer la néoformation de protocormes (4 cas sur 24 explantats) mais le taux de survie des fragments de plantules est faible.

L'explantat le plus apte à former des bourgeons est donc constitué par une pousse feuillée démunie de ses racines et de ses feuilles externes.

b.1.3.1.3 Influence de la densité de population.

Le comportement des explantats varie selon le nombre de fragments de tige repiqués par flacon de 500 ml contenant 120 ml de milieu de base additionné de BAP (Fig. I.23)

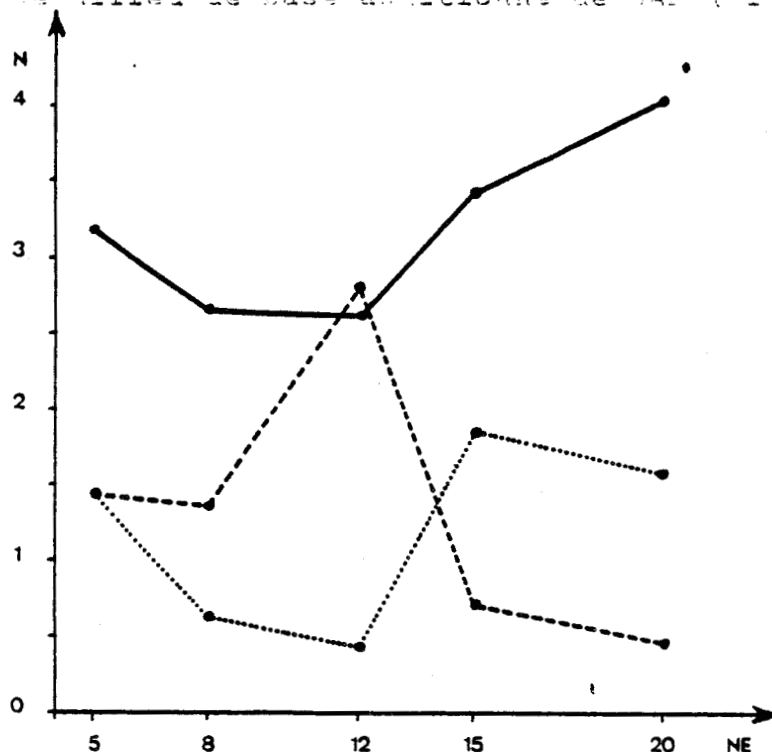


Fig. I.23 : Influence du nombre d'explantats par flacon (NE) sur la formation des feuilles (—), des racines (···) et des bourgeons (---) après 75 jours de culture (cv 23328).

Entre 5 et 12 explantats par flacon, l'augmentation de la densité de population ralentit la croissance apicale des explantats et inhibe fortement la rhizogénèse. Au delà de 12 explantats par flacon, on observe par contre une stimulation de la croissance et une levée partielle de l'inhibition de la rhizogénèse. La formation des bourgeons est optimale quand 12

explantats sont repiqués par flacon.

L'augmentation de la densité de population entraîne également un noircissement important du milieu de culture et empêche de maintenir les cultures sur le même milieu pendant plus de 60 à 75 jours.

b.1.3.2 Influence des conditions de culture.

b.1.3.2.1 Influence de la température.

L'augmentation de la température, entre 20 et 25°, stimule la croissance, l'enracinement et le bourgeonnement des fragments de tige (Fig. I.24) en régime de température constante.

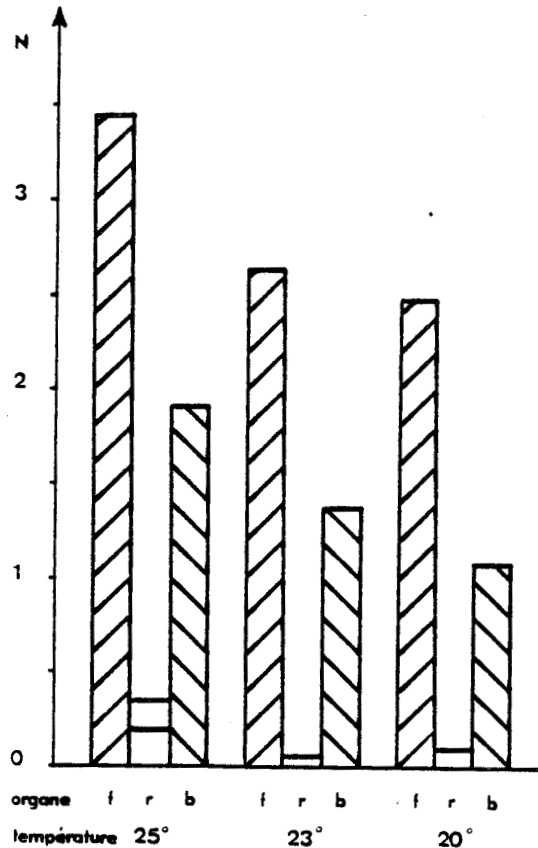


Fig. I.24 : Influence de la température sur le nombre (N) des feuilles (f), des racines (r) et des bourgeons (b) formés par fragment de tige cultivés pendant 75 jours en présence de BAP (cv 23721).

Lors d'un autre essai, nous avons fait subir aux cultures des prétraitements au froid pendant 1, 2 ou 3 semaines à 15°

ou une semaine à 10°. En fin de traitement, les cultures sont replacées à 25°.

On constate qu'à 15°, l'augmentation de la durée du prétraitement au froid stimule le bourgeonnement mais réduit la croissance des explantats (Fig. I.25). Une préculture à 10° stimule également le bourgeonnement moyen par explantat survivant mais l'augmentation de la durée de prétraitement au froid ou la diminution de la température augmentent fortement le taux de mortalité.

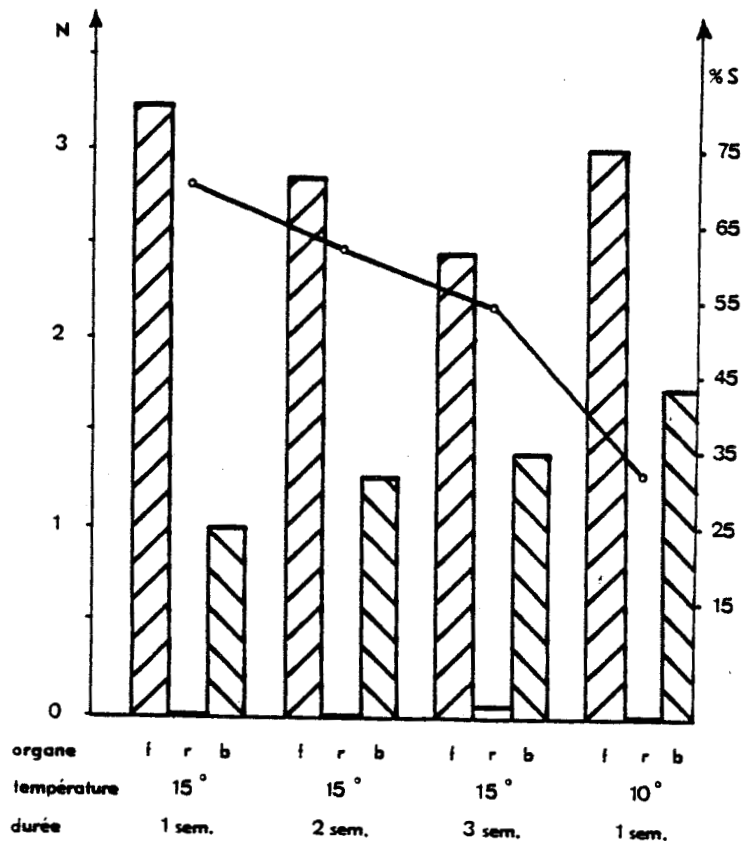


Fig. I.25 : Influence de la température et de la durée du prétraitement au froid sur le nombre des feuilles (f), des racines (r) et des bourgeons (b) formés par des fragments de tige et sur le pourcentage d'explantats survivants (%S) après 75 jours de culture en présence de 5.10^{-6} M/l de BAP (cv 23721).

b.1.3.2.2 Influence de la lumière.

Deux conditions de photopériode ont été comparées, les cultures étant placées soit à 12 h de lumière par jour, soit en lumière continue.

L'éclairement discontinu stimule la croissance et le bourgeonnement tandis que l'éclairement continu provoque l'inhibition totale de la rhizogénèse (Table I.7).

Organes	Photopériode	
	24/0	12/12
Feuilles	3,15	3,45
Racines	0,00	0,27
Bourgeons	0,92	1,91

Table I.7 : Influence de la photopériode sur le nombre des feuilles, des racines et des bourgeons formés par des fragments de tige cultivés pendant 75 jours en présence de 5.10^{-6} M/l de BAP (cv 23721).

La qualité de la lumière a également une action sur le développement des explantats (Fig. I.26).

La lumière fournie par des tubes Sylvania Gro Lux stimule nettement la rhizogénèse et le bourgeonnement alors que les radiations rouges, bleues et vertes inhibent la rhizogénèse et dans une moindre mesure, le bourgeonnement. L'obscurité continue a peu d'influence sur le bourgeonnement mais elle accentue l'inhibition de la formation des racines. La croissance des explantats est peu modifiée par les différents spectres utilisés.

L'existence d'une période obscure de 15 jours en début de culture provoque une diminution du nombre de bourgeon par explantat (Fig. I.27, B et C) et favorise la formation des racines.

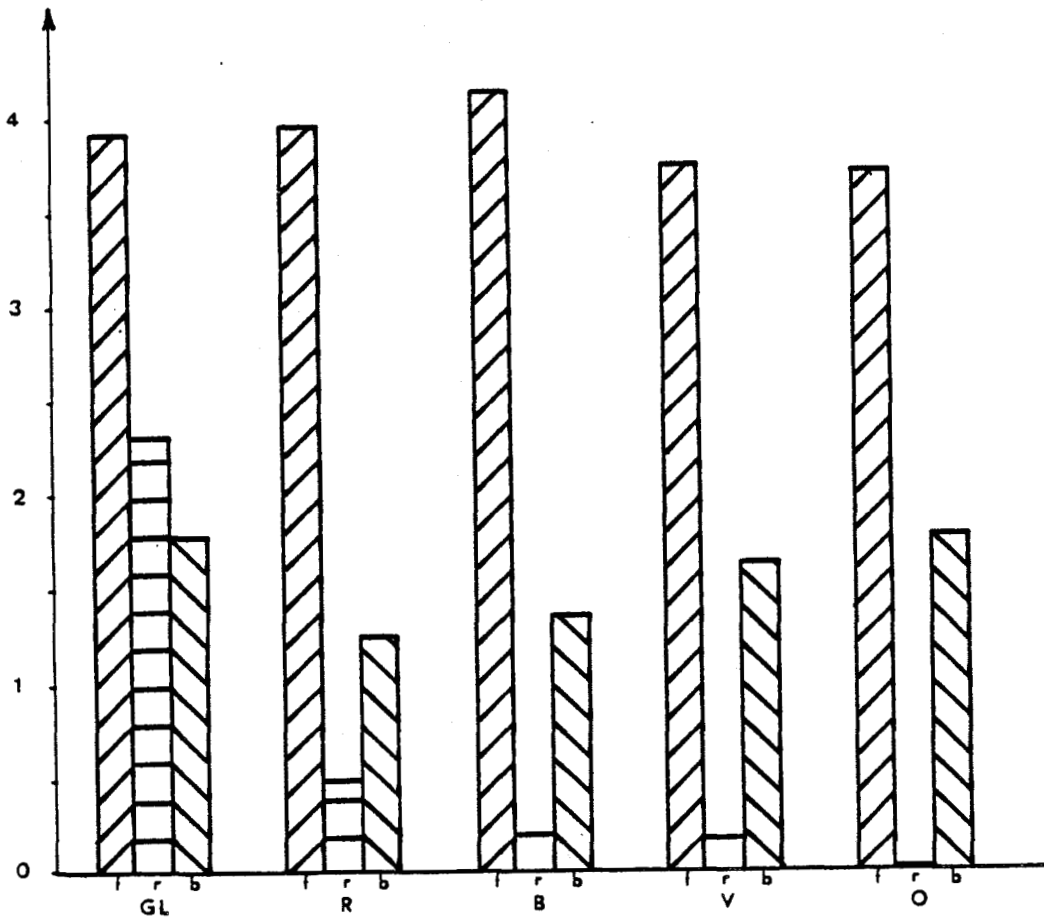


Fig. I.26 : Influence du spectre lumineux (G.L. : Gro Lux; R : rouge; B : bleue; V : verte) et de l'obscurité (O) sur le nombre des feuilles (f), des racines (r) et des bourgeons (b) formés par des fragments de tige après 75 jours de culture en présence de BAP (cv 23721).

Les fortes intensités lumineuses (4000 Lux) inhibent partiellement le bourgeonnement (Fig. I.27, B et D) mais ne modifient pas la croissance des explantats.

Enfin, quoique la comparaison soit difficile à faire, la photopériode étant variable, il semble qu'une alternance de température (26° - 20°) alliée aux photopériodes claires et obscures soient responsables de l'inhibition partielle du bourgeonnement (Fig. I.27, A, B et D).

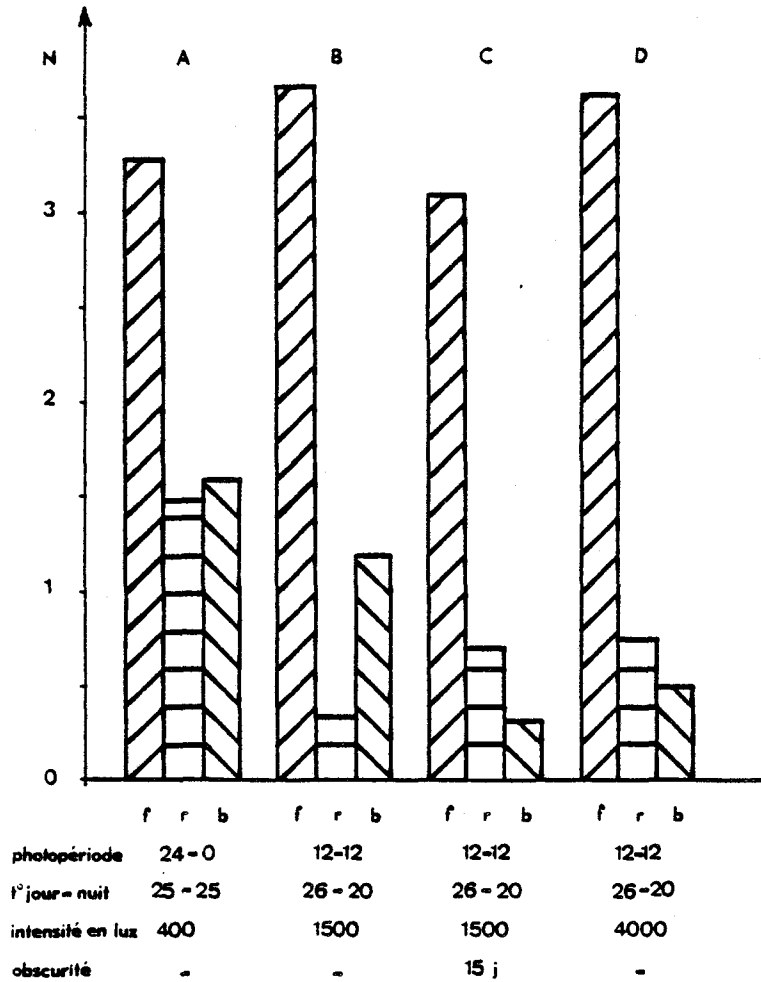


Fig. I.27 : Influence de la photopériode, de l'intensité lumineuse, de la présence d'une photopériode obscure en début de culture et de la continuité ou de la discontinuité de la température sur le nombre des feuilles (f), des racines (r) et des bourgeons (b) formés par des fragments de tige cultivés pendant 75 jours en présence de $5 \cdot 10^{-6}$ M/l de BAP (cv 23721).

b.1.3.2.3 Influence du pH du milieu de culture.

Le pH initial du milieu de culture est de $6,4 \pm 0,1$ mais la stérilisation à l'autoclave abaisse cette valeur de $0,9 \pm 0,1$ unités de pH. De même, le développement des fragments de tige provoque un abaissement de pH de $0,5$ unités (Fig. I.28).

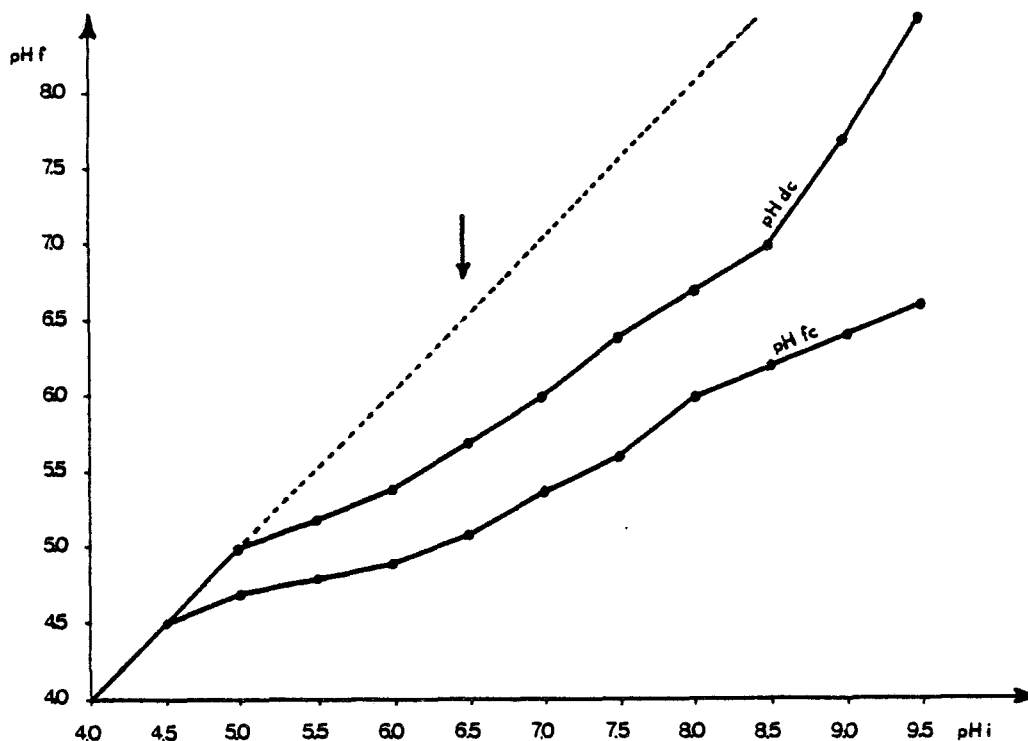


Fig. I.28 : Influence du pH initial avant autoclavage (pHi) sur le pH du milieu de culture après autoclavage ou en début de culture (pHdc) et sur le pH du milieu après 90 jours de culture (pHfc).

Remarque : Lorsque le pH initial est supérieur à 6,0, il peut apparaître un précipité de phosphate de calcium. Pour éviter cette précipitation, il faut additionner la solution mère de K_2HPO_4 après dilution complète des autres composés minéraux.

Pour déterminer le pH le plus favorable au bourgeonnement des fragments de tige, nous avons ajouté de l'HCl 2N ou du KOH 2N au milieu avant autoclavage, de manière à ce que le pH initial du milieu varie entre 4,0 et 9,5. Les valeurs du pH final mesurées après 90 jours de culture sont rapportées dans la figure I.28.

Le développement des fragments de tige acidifie le milieu de culture, l'abaissement du pH étant d'autant plus important

que le pH initial est plus élevé (Fig. I.28).

La croissance ainsi que le bourgeonnement sont modifiés par la valeur du pH du milieu (Fig. I.29).

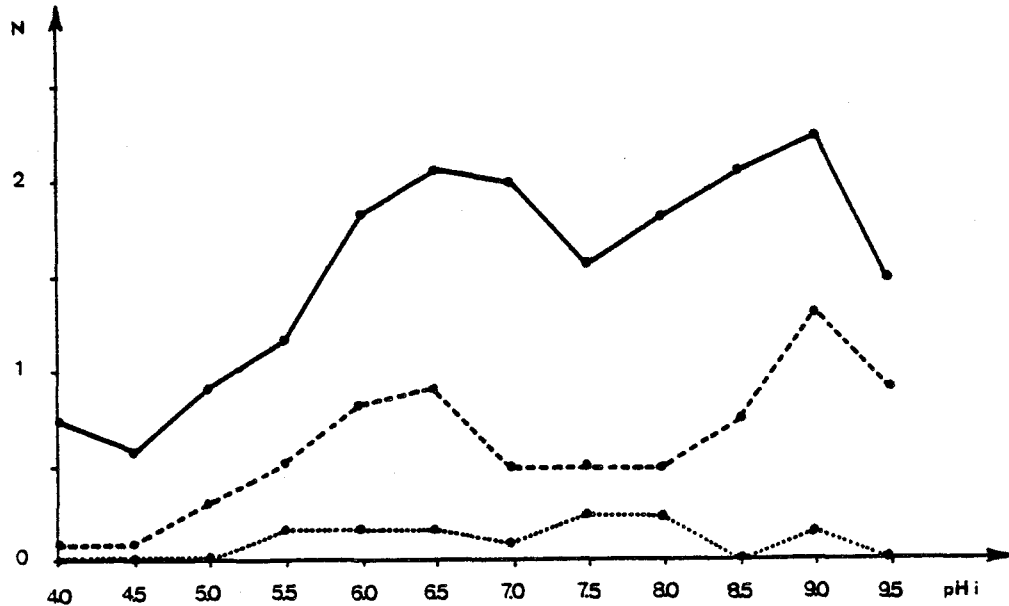


Fig. I.29 : Influence de la valeur du pH du milieu de culture avant autoclavage (pHi) sur le nombre (N) des feuilles (—), des racines (···) et des bourgeons (---) par fragment de tige après 90 jours de culture en présence de BAP (cv 23328).

Pour des pH compris entre 4,0 et 5,0, la croissance et le bourgeonnement sont très faibles; ils s'améliorent ensuite avec l'augmentation du pH jusqu'à 6,5 puis diminuent jusqu'à pH 7,5. Au delà, on constate une nouvelle amélioration de la croissance et du bourgeonnement qui est optimale à pH 9,0.

Le premier optimum semble bien résulter de l'effet du pH tandis que le second pourrait résulter de l'augmentation de la concentration en K^+ , par suite de l'emploi de KOH pour tamponner le milieu.

La rhizogénèse est peu modifiée par la variation des pH et demeure fortement inhibée par la présence de BAP dans le milieu de culture.

Il faut souligner que les pH bas provoquent un noircissement important du milieu de culture par suite de l'hydrolyse partielle de la gélose, la diffusion des polyphénols oxydés étant facilitée. Par contre, aux pH élevés, le noircissement du milieu reste limité au contact de l'explantat.

Aux pH extrêmes, (4,0 à 5,0 et 9,0 - 9,5) les bourgeons ne se développent pas en plantules filles.

Aux pH élevés, 9,0 et 9,5, on observe une modification de la morphologie des plantules mères caractérisée par :

- un gonflement important de la base de l'explantat;
- un épaississement du limbe;
- un raccourcissement des entrenoeuds;
- et enfin, le rapport de la longueur sur la largeur du limbe est voisin de 1 alors que normalement ce rapport est compris entre 2 et 3.

b.1.3.2.4 Influence du support de culture.

Outre la culture sur milieu gélosé, nous avons utilisé deux autres techniques : la culture en milieu liquide agité et la culture sur laine de verre et milieu liquide statique.

Lorsque les explantats sont repiqués en milieu liquide agité, on constate un noircissement rapide du milieu de culture mais aussi que les explantats se recouvrent eux-mêmes d'une pellicule huileuse noirâtre qui s'accompagne d'une nécrose importante.

Lorsque les explantats sont cultivés sur laine de verre en milieu liquide statique selon la méthode de ERNST (1976), on constate également l'apparition d'une pellicule huileuse à la surface du milieu et de nombreuses nécroses sur les plantules. Nous avons cherché à éliminer ce phénomène en renouvelant le milieu chaque semaine grâce à un réservoir de milieu liquide stérile couplé à la fiole de culture (Fig. I.30). Cette technique ne permet cependant pas l'élimination des composés phénoliques qui adhèrent fortement aux fibres de verre, ce qui s'observe aussi avec les milieux liquides

statiques.

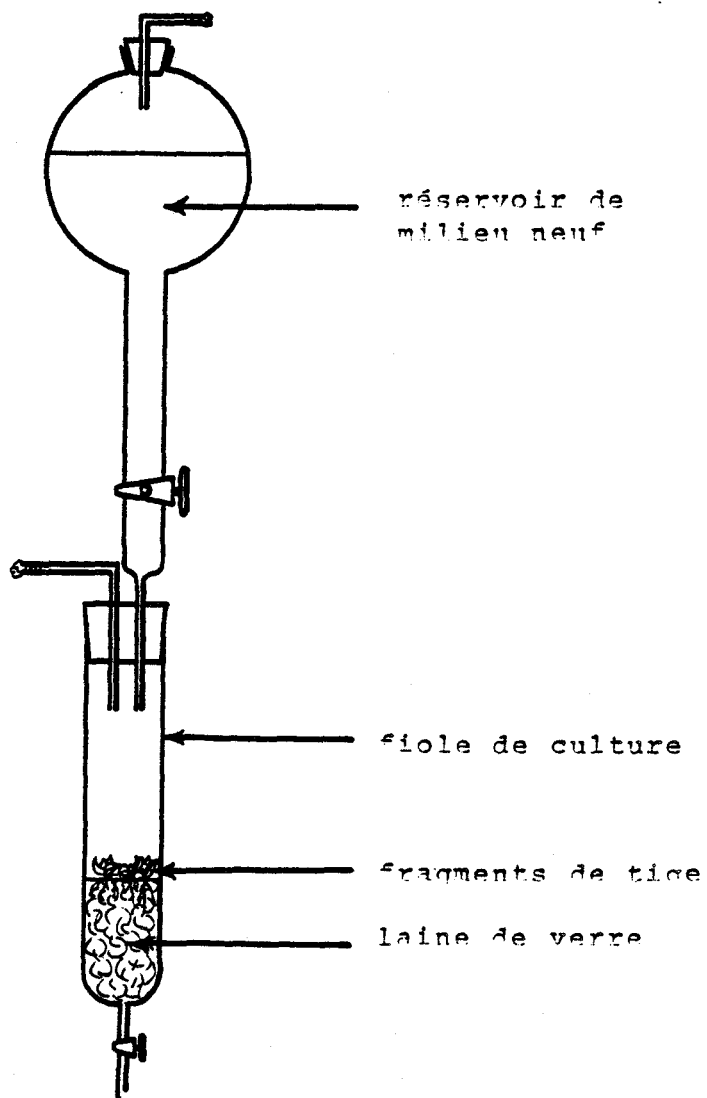


Fig. I.30 : Schéma de montage du matériel utilisé pour la culture en milieu liquide renouvelé.

Dans la suite de nos expériences sur le Phalaenopsis nous avons donc renoncé à l'emploi des milieux liquides.

b.1.3.3 Influence des composants du milieu de culture.

b.1.3.3.1 Influence des composés organiques.

b.1.3.3.1.1 Influence des sucres.

Les fragments de tige sont capables de se développer en absence de sucre, mais dans ce cas, la croissance et le bourgeonnement des explantats sont peu importants et la rhizogénèse est totalement inhibée (Fig. I.31).

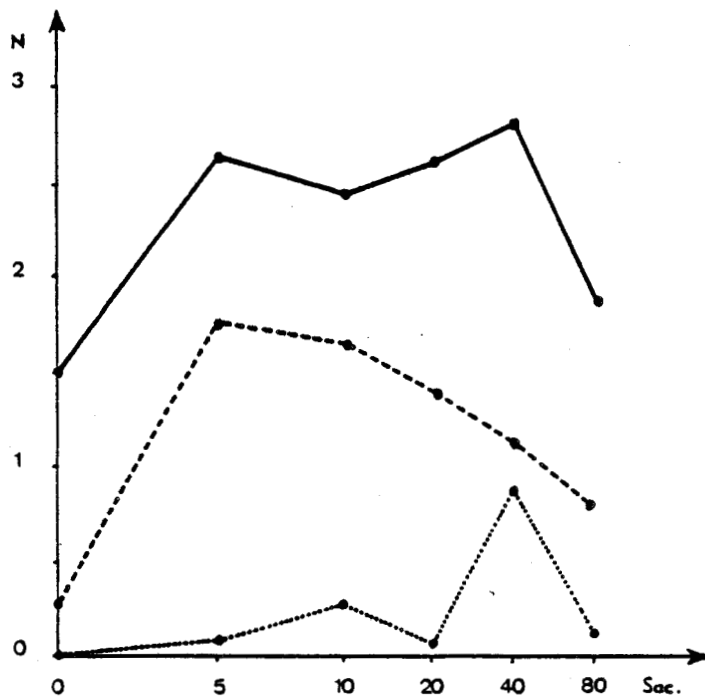


Fig. I.31 : Influence de la concentration en saccharose (Sac) en g/l sur le nombre (N) des feuilles (—), des racines (···) et des bourgeons (---) par fragment de tige après 75 jours de culture en présence de BAP (cv 23328).

L'addition de saccharose stimule la croissance, la rhizogénèse et le bourgeonnement des explantats. La croissance est optimale entre 5 et 40 g/l, le nombre de bourgeons par explantat est le plus important lorsque la concentration en saccharose du milieu est égale à 5 g/l. L'augmentation de la concentration en sucre facilite la rhizogénèse qui est optimale à 40 g/l. Enfin l'addition de 80 g/l de sucre, n'est pas

compatible avec un développement rapide des explantats.

On constate également que l'accroissement de la concentration en sucre stimule la libération de polyphénols dans le milieu.

Nous avons également comparé les effets de quatre sucres différents : le saccharose, le fructose, le maltose et le glucose additionnés à 5, 10 et 20 g/l.

Le glucose et le saccharose sont les sucres les plus efficaces pour la croissance des plantules mères et leur bourgeonnement (Table I.8).

	Concentration g/l	Nombre d'organes formés		
		Feuilles	Racines	Bourgeons
saccharose	5	1,55	0,11	0,44
"	10	2,00	0,00	0,64
"	20	2,17	0,75	0,42
fructose	5	1,75	0,00	0,17
"	10	1,60	0,00	0,30
"	20	1,67	0,00	0,50
glucose	5	1,45	0,00	0,64
"	10	2,00	0,00	0,55
"	20	1,83	0,17	0,92
maltose	5	1,50	0,11	0,30
"	10	1,64	0,00	0,36
"	20	2,00	0,00	0,36

Table I.8 : Influence de la nature du sucre et de sa concentration sur le nombre des feuilles, des racines et des bourgeons formés par des fragments de tige après 75 jours de culture en présence de BAP (cv 23721).

b.1.3.3.1.2 Influence de l'inositol.

L'inositol stimule la croissance des explantats jusqu'à

12 g/l, son action est moins nette sur le bourgeonnement, elle est dépressive quand sa concentration augmente jusqu' 0,8 g/l puis l'effet s'inverse et l'on observe une stimulation du bourgeonnement à 6 g d'inositol par litre de milieu.

Quelle que soit la concentration en inositol du milieu de culture, il n'y a pas de formation de racines (Fig. I.32).

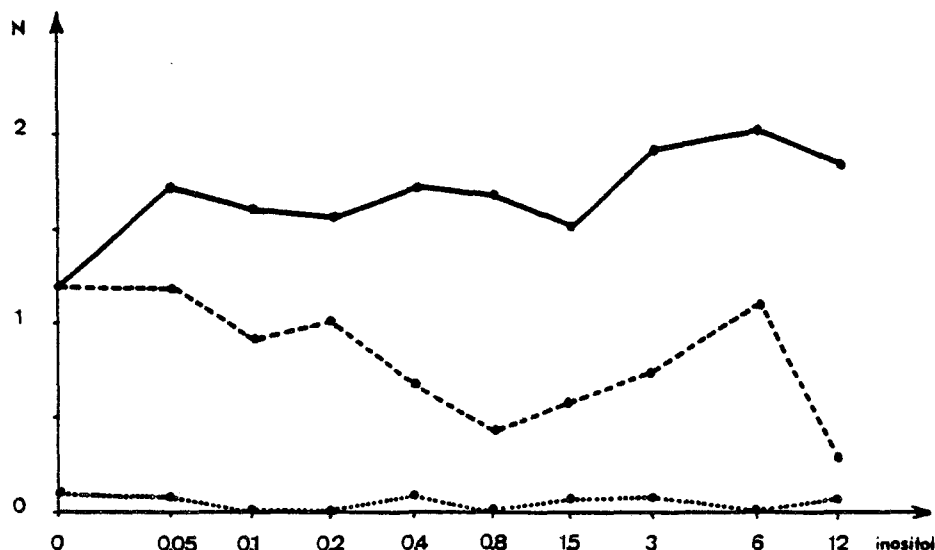


Fig. I.32 : Influence de l'inositol (en g/l) sur le nombre des feuilles (—), des racines (···) et des bourgeons (---) par fragment de tige après 75 jours de culture en présence de BAP (cv 23721).

Aux faibles doses, l'inositol pourrait agir comme un facteur de croissance alors qu' à dose plus élevée, il pourrait se comporter comme un précurseur du glucose (POSTERNACK, SCHOPFER et REYMOND, 1955) et pourrait être utilisé comme élément nutritif carboné et compenserait l'épuisement du milieu.

b.1.3.3.1.3 Influence de la glutamine.

Utilisée comme facteur de croissance des orchidées par de nombreux auteurs (ARDITTI, 1967; FONNESBECH, 1972 b; MITRA, 1975), la glutamine additionnée au milieu de base dépourvu d'hydrolysate de caséine, n'a pas d'action sur le

développement des fragments de tige (Fig. I.33).

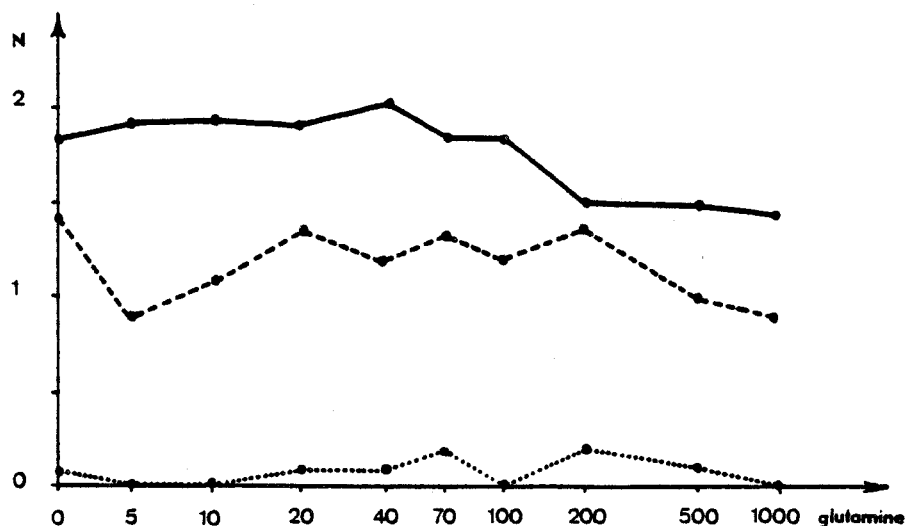


Fig. I.33 : Influence de la glutamine (en mg/l) sur le nombre (N) des feuilles (—), des racines (---) et des bourgeons (···) formés par des fragments de tige cultivés en présence de BAP pendant 75 jours (cv 23721).

b.1.3.3.1.4 Influence des composés organiques complexes.

De jeunes plantules au stade deux feuilles sont repiquées sur le milieu de base additionné de $5 \cdot 10^{-6}$ M/l de BAP et d'hydrolysate de caséine à différentes concentrations. Après 75 jours de culture, on dénombre les feuilles, les racines et les bourgeons (Fig. I.34), les plantules sont alors transplantées sur le même milieu après avoir sectionné les racines et les bourgeons et éliminé les feuilles externes. Le nombre de feuilles, de racines et de bourgeons apparues en cours de culture est déterminé après 90 jours (Fig. I.35).

On constate que l'hydrolysate de caséine stimule faiblement la croissance des jeunes plantules de semis. La croissance la plus active s'observe en présence de 2 g/l. Mais ce composé organique complexe a surtout une action déterminante sur le bourgeonnement. L'optimum de stimulation du bourgeonnement s'observe entre 0,3 et 0,6 g/l d'hydrolysate de caséine.

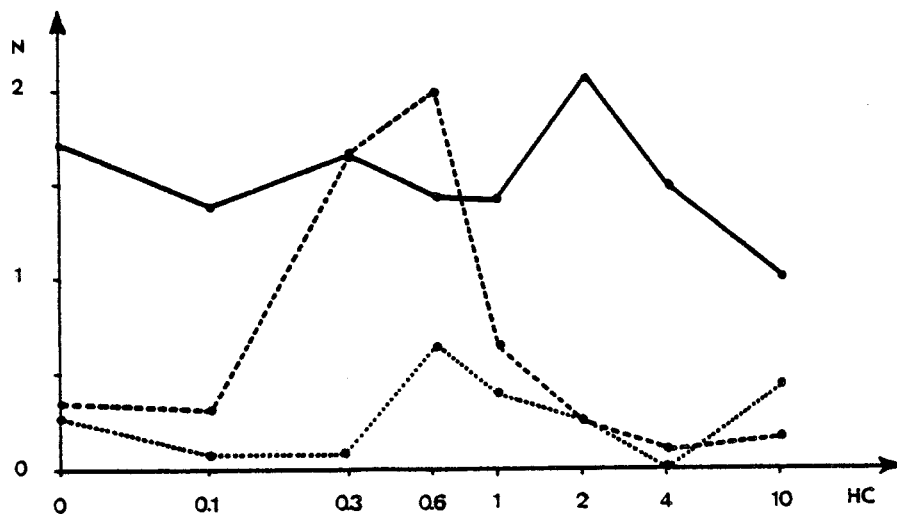


Fig. I.34 : Influence de la concentration en hydrolysate de caséine (HC) en g/l sur le nombre (N) des feuilles (—), des racines (···) et des bourgeons (---) formés par des jeunes plantules après 75 jours de culture en présence de BAP (cv 23721)

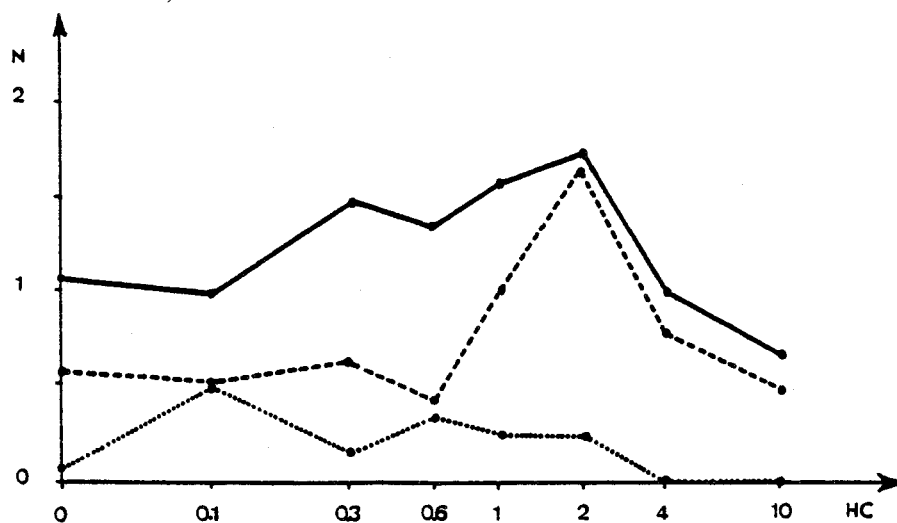


Fig. I.35 : Influence de la concentration en hydrolysate de caséine (HC) en g/l sur le nombre (N) des feuilles (—), des racines (···) et des bourgeons (---) formés par des fragments de tige après 75 jours de culture en présence de BAP (cv 23721).

Les mêmes effets sont observés sur le développement des fragments de tige au cours du 2° passage mais alors le bourgeonnement optimum s'observe pour des concentrations plus fortes (2 g/l).

Quel que soit l'âge de l'explantat, les doses supérieures à 2 g/l sont néfastes au bourgeonnement et à la croissance.

Nous avons également comparé l'action de différents composés organiques complexes : la peptone, la tryptone, l'hydrolysate de caséine, l'émulsion de poisson, la banane verte et l'extrait de levure. La banane verte est additionnée en poudre après lyophilisation de banane fraîche. Ces composés sont ajoutés à raison d'1 gramme de matière sèche par litre de milieu (Table I.9).

Organes	Composés organiques complexes					
	HC	EP	PEP	EL	BV	TRYP
Feuilles	3,12	3,08	3,54	3,17	3,21	3,29
Racines	0,37	0,33	0,47	0,30	0,33	0,42
Bourgeons	0,62	0,00	1,26	0,51	1,14	0,87

Table I.9 : Influence de l'hydrolysate de caséine (HC), de l'émulsion de poisson (EP), de la peptone (PEP), de l'extrait de levure (EL), de la banane verte (BV) et de la tryptone (TRYP) sur le nombre des feuilles, des racines et des bourgeons formés par des fragments de tige cultivés pendant 75 jours en présence de BAP (cv 23996).

La peptone, la banane verte et la tryptone sont les composés organiques complexes les plus efficaces à la fois sur la croissance et le bourgeonnement de fragments de tige, l'hydrolysate de caséine et l'extrait de levure ont une efficacité moindre tandis que l'émulsion de poisson inhibe le bourgeonnement.

b.1.3.3.2 Influence de la composition minérale.

b.1.3.3.2.1 Influence de la formulation des microéléments.

L'addition au milieu de culture de différentes solutions de microéléments stimule la croissance ainsi que le bourgeonnement de fragments de tige (Table I.10). Les formulations étudiées sont celles de HELLER (1953) additionnée de 25 mg/l de sulfate de manganèse, celles de MURASHIGE et SKOOG (1962) et de LESCURE (1969).

Composants (mg/l)	HELLER	M & S	LESCURE	témoin
H ₃ BO ₃	1,0	6,0	1,5	-
KI	0,01	0,83	0,75	-
MnSO ₄ H ₂ O	25,0	17,0	3,38	-
ZnSO ₄ 7H ₂ O	1,0	10,0	1,50	-
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	-	0,25	-	-
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,03	0,025	-	-
CoCl ₂ 6H ₂ O	-	0,025	-	-
AlCl ₃	0,03	-	-	-
NiCl ₂ 6H ₂ O	0,03	-	-	-
Organes				
Feuilles	2,07	2,33	2,60	1,93
Racines	0,33	0,73	0,33	0,00
Bourgeons	0,80	0,67	0,93	0,33

Table I.10 : Influence de la formulation des microéléments sur le nombre des feuilles, des racines et des bourgeons formés par des fragments de tige après 90 jours de culture en présence de BAP (cv 23721).

La formulation de LESCURE est la plus favorable à la croissance et au bourgeonnement.

b.1.3.3.2.2 Influence du fer.

Le fer a été apporté au milieu de culture sous forme de

sulfate ferreux, de chlorure ferrique ou encore de sulfate ferreux chélaté par l'éthylènediaminetétraacétique (EDTA) à raison de 1,36 g d'EDTA par gramme de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ tel que le préconisent MURASHIGE et SKOOG (1962).

L'addition de 20 mg/l de sulfate ferreux non chélaté stimule la croissance des explantats, supprime les phénomènes de chlorose observés en absence de fer dans le milieu de culture et permet partiellement la rhizogénèse.

Dans le cadre de ces expériences où les explantats ne sont pas carencés en fer, l'addition de cet élément réduit le nombre moyen de bourgeon par explantat (Table I.11)

Conditions				Feuilles	Racines	Bourgeons
Témoin				2,75	0,17	1,25
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20 mg/l				3,33	1,33	0,92
" 50 "				2,42	0,75	0,75
" 100 "				2,50	0,33	0,65
" 200 "				1,58	0,33	0,08
+ EDTA	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 27 "			2,58	0,50	0,68
	" 83 "			0,67	0,08	0,00
	" 278 "			0,00	0,00	0,00

BUS
ULIE

Table I.11 : Influence de la concentration en fer chélaté ou non sur le nombre des feuilles, des racines et des bourgeons formés par des fragments de tige après 75 jours de culture en présence de BAP (cv 23721).

Le nombre optimum de bourgeons est observé quand la concentration en sulfate ferreux ou en chlorure ferrique est égale à 10 mg/l. A cette dose, l'addition de fer sous forme de chlorure ferrique est plus efficace que sous la forme de sulfate ferreux mais le chlorure ferrique est rapidement toxique aux concentrations supérieures (Table I.12).

Conditions	Nombre d'organes formés		
	Feuilles	Racines	Bourgeons
FeSO ₄ 7H ₂ O 5 mg/l	2,17	0,00	0,75
" 10 "	2,30	0,10	1,10
" 20 "	2,10	0,00	1,00
FeCl ₃ 5 "	2,27	0,18	1,54
" 10 "	2,82	0,18	1,64
" 20 "	2,27	0,10	0,36

Table I.12 : Influence de la charge et de l'ion d'accompagnement du fer sur le nombre de feuilles, de racines et de bourgeons formés par des fragments de tige cultivés pendant 75 jours en présence de BAP (cv 23721).

b.1.3.3.2.3 Influence des éléments minéraux majeurs.

Dans une première série d'expériences, nous avons étudié l'action isolée de 5 ions minéraux : NO₃⁻, PO₄³⁻, K⁺, Mg⁺⁺ et Ca⁺⁺ sur la croissance, la rhizogénèse et le bourgeonnement des fragments de tige de plantules de Phalaenopsis cv 23721.

Le milieu de base témoin comprend les macroéléments de FONNESBECH (1972 a), le fer de MURASHIGE et SKOOG (1962), les microéléments de LESCURE (1969), les vitamines de FONNESBECH (1972 b), 2 mg/l de glycoColle, 100 mg/l d'inositol, 2 g/l d'hydrolysate de caséine, 20 g/l de saccharose, 5.10⁻⁶ M/l de BAP, 10⁻⁸ M/l d'AIA et 7,5 g/l d'agar-agar. Pour chaque expérience, nous avons fait varier la concentration d'un des ions, celle des autres restant fixe, par contre, les ions accompagnateurs : Na⁺, Cl⁻ et SO₄⁻⁻ peuvent être en concentrations différentes selon les conditions (Tables I.13 et I.14).

De jeunes plantules au stade deux feuilles ont été repiquées sur les différents milieux. Après 75 jours, elles sont prélevées aseptiquement, les racines et les bourgeons sont sectionnés et les feuilles externes sont arrachées afin de ne laisser que deux feuilles sur la tige. Les explantats ainsi préparés sont repiqués sur le même milieu. A la fin du 2^o passage qui dure également 75 jours, les feuilles, les racines

Table I.13 suite

Variant	Composition	Teneur en mm/l	de	élément	variant					
		0,10	0,25	0,50	1,0	2,5	5,0	10	20	mg/l
Mg ⁺⁺	Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	400	400	400	400	400	400	400	400	400
	(NH ₄) ₂ SO ₄	300	300	300	300	300	300	300	300	300
	KH ₂ PO ₄	250	250	250	250	250	250	250	250	250
	K ₂ HPO ₄	212	212	212	212	212	212	212	212	212
	MgSO ₄ 7H ₂ O	25	62	123	247	616	1232	2465	4930	4930
Ca ⁺⁺	Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	24	59	118	400	400	400	400	400	400
	(NH ₄) ₂ SO ₄	233	243	276	300	300	300	300	300	300
	KH ₂ PO ₄	250	250	250	250	250	250	250	250	250
	K ₂ HPO ₄	212	212	212	212	212	212	212	212	212
	MgSO ₄ 7H ₂ O	0	0	0	79	250	250	250	250	250
	CaCl ₂ 2H ₂ O	0	0	0	0	119	486	1222	2695	2695
	Mg(NO ₃) ₂ 6H ₂ O	260	260	260	178	0	0	0	0	0
	NH ₄ NO ₃	93	69	29	0	0	0	0	0	0

102

300
300
300

Table I.14 : Concentrations en mM/l des différents ions minéraux des milieux de culture.

Variant	Concentration mM/l	NO_3^-	NH_4^+	(N)	PO_4^{3-}	K^+	Mg^{++}	Ca^{++}	Cl^-	Na^+	SO_4^{--}	CIT	
NO_3^-	0,10	0,10	4,54	4,64	3,05	4,27	1,01	1,69	3,29	0	3,28	21,23	
	0,25	0,25	4,54	4,79	3,05	4,27	1,01	1,69	3,13	0	3,28	21,22	
	0,50	0,50	4,54	5,04	3,05	4,27	1,01	1,69	2,90	0	3,28	21,24	
	1,00	1,00	4,54	5,54	3,05	4,27	1,01	1,69	2,39	0	3,28	21,23	
	2,50	2,50	4,54	7,04	3,05	4,27	1,01	1,69	0,90	0	3,28	21,24	
	5,00	5,00	4,54	9,54	3,05	4,27	1,01	1,69	0	0	2,88	22,44	
	10,00	10,00	4,54	14,54	3,05	4,27	1,01	1,69	0	0	1,63	26,19	
	20,00	20,00	4,54	24,54	3,05	4,27	1,01	1,69	0	2,75	0	37,31	
	PO_4^{3-}	0,10	3,39	4,54	7,93	0,10	4,27	1,01	1,69	0	0	2,09	17,09
		0,25	3,39	4,54	7,93	0,25	4,27	1,01	1,69	0	0	2,01	17,16
0,50		3,39	4,54	7,93	0,50	4,27	1,01	1,69	0	0	1,88	17,28	
1,00		3,39	4,54	7,93	1,00	4,27	1,01	1,69	0	0	1,64	17,54	
2,50		3,39	4,54	7,93	2,50	4,27	1,01	1,69	0	0	0,66	18,06	
5,00		3,39	4,54	7,93	5,00	4,27	1,01	1,69	0	1,95	0	21,85	
10,00		3,39	4,54	7,93	10,00	4,27	1,01	1,69	0	5,73	0	30,63	
20,00		3,39	4,54	7,93	20,00	4,27	1,01	1,69	0	15,74	0	50,64	
K^+		0,10	3,39	4,54	7,93	3,06	0,10	1,01	1,69	0	2,96	0	16,75
		0,25	3,39	4,54	7,93	3,06	0,25	1,01	1,69	0	2,80	0	16,74
	0,50	3,39	4,54	7,93	3,06	0,50	1,01	1,69	0	2,56	0	16,75	
	1,00	3,39	4,54	7,93	3,06	1,00	1,01	1,69	0	2,06	0	16,75	
	2,50	3,39	4,54	7,93	3,06	2,50	1,01	1,69	0	0,83	0	17,02	
	5,00	3,39	4,54	7,93	3,06	5,00	1,01	1,69	0	0	0,73	19,42	
	10,00	3,39	4,54	7,93	3,06	10,00	1,01	1,69	0	0	5,74	29,43	
	20,00	3,39	4,54	7,93	3,06	20,00	1,01	1,69	0	0	14,18	47,87	



Table I.14 suite

Variant	Concentration mm/l	Tenueur NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	en(N)	PO ₄ ³⁻	des K ⁺	Mg ⁺⁺	Ca ⁺⁺	Cl ⁻	Na ⁺	SO ₄ ⁻⁻	CTP
Mg ⁺⁺	0,10	3,39	4,54	7,93	3,06	4,27	0,10	1,69	0	0	2,37	19,42
	0,25	3,39	4,54	7,93	3,06	4,27	0,25	1,69	0	0	2,52	19,72
	0,50	3,39	4,54	7,93	3,06	4,27	0,50	1,69	0	0	2,77	20,22
	1,00	3,39	4,54	7,93	3,06	4,27	1,00	1,69	0	0	3,27	21,22
	2,50	3,39	4,54	7,93	3,06	4,27	2,50	1,69	0	0	4,77	24,22
	5,00	3,39	4,54	7,93	3,06	4,27	5,00	1,69	0	0	7,27	29,22
	10,00	3,39	4,54	7,93	3,06	4,27	10,00	1,69	0	0	12,27	39,22
	20,00	3,39	4,54	7,93	3,06	4,27	20,00	1,69	0	0	22,27	59,22
Ca ⁺⁺	0,10	3,39	4,54	7,93	3,06	4,27	1,01	0,10	0	0	1,76	18,13
	0,25	3,39	4,54	7,93	3,06	4,27	1,01	0,25	0	0	1,84	18,36
	0,50	3,39	4,54	7,93	3,06	4,27	1,01	0,50	0	0	2,09	18,86
	1,00	3,39	4,54	7,93	3,06	4,27	1,01	1,00	0	0	2,59	19,86
	2,50	3,39	4,54	7,93	3,06	4,27	1,01	2,50	0	0	3,28	23,67
	5,00	3,39	4,54	7,93	3,06	4,27	1,01	5,00	0	0	3,28	31,16
	10,00	3,39	4,54	7,93	3,06	4,27	1,01	10,00	0	0	3,28	46,17
	20,00	3,39	4,54	7,93	3,06	4,27	1,01	20,00	0	0	3,28	76,21



et les bourgeons sont dénombrés.

b.1.3.3.2.3.1 Influence de la concentration en nitrates.

Les nitrates ont peu d'influence sur la croissance des fragments de tige, le milieu de culture comprenant déjà de l'azote ammoniacal apporté sous forme de sulfate d'ammonium et de l'azote organique apporté par l'hydrolysate de caséine. La concentration en NO_3^- a une influence plus nette sur la rhizogénèse qui se manifeste dès 1 mM/l. Enfin le plus grand nombre de bourgeons est obtenu quand la concentration en nitrates est égale à 5 mM/l (Fig. I.36).

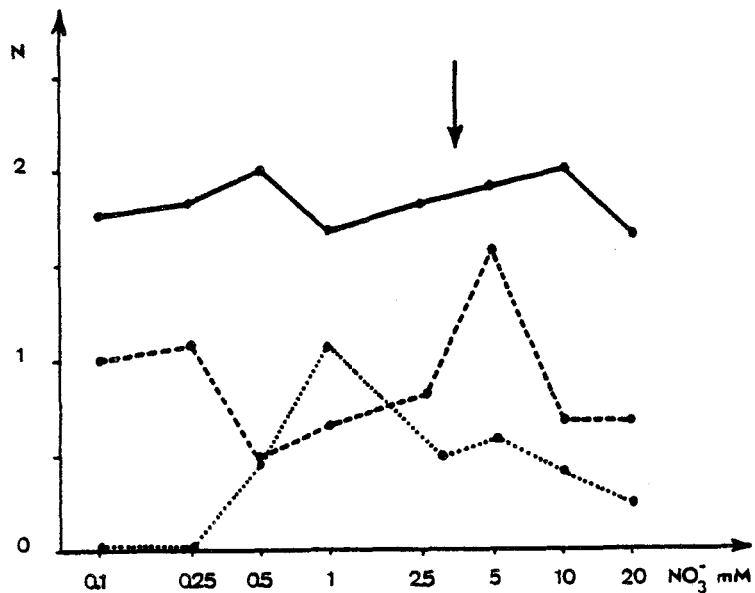


Fig. I.36 : Influence de la concentration en NO_3^- sur le nombre (N) des feuilles (—), des racines (···) et des bourgeons (---) formés par des fragments de tige cultivés pendant 75 jours en présence de BAP (cv 23721).

b.1.3.3.2.3.2 Influence de la concentration en phosphates.

Les phosphates stimulent la croissance des fragments de tige, la concentration optimale étant de 2,5 mM/l mais ils sont sans action sur la rhizogénèse. L'addition de 20 mM/l de phosphates

provoque l'apparition de nombreuses malformations.

Le bourgeonnement est fortement stimulé par la présence de 5 mM/l de PO_4^{3-} , l'optimum devant être situé légèrement au dessus de 5 mM/l (Fig. I.37).

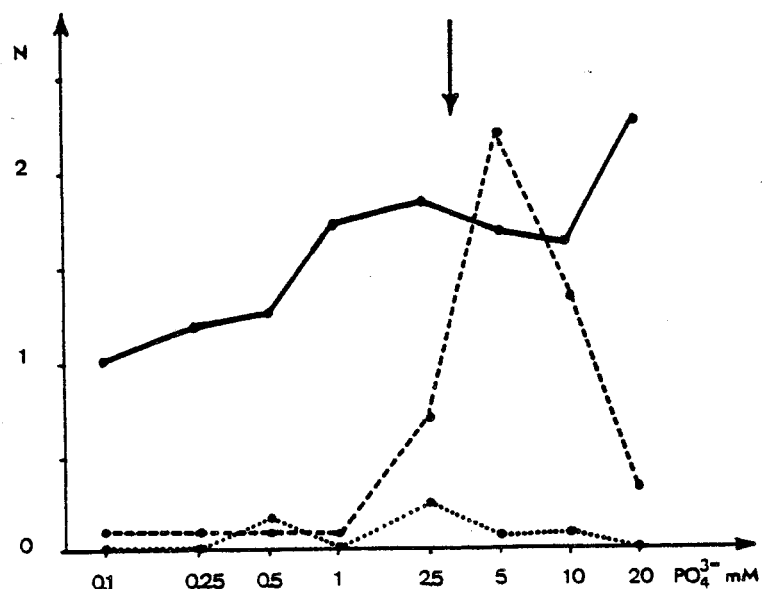


Fig. I.37 : Influence de la concentration en PO_4^{3-} sur le nombre (N) des feuilles (—), des racines (···) et des bourgeons (---) formés par des fragments de tige cultivés pendant 75 jours en présence de BAP (cv 23721).

b.1.3.3.2.3.3 Influence de la concentration en K^+ .

La croissance est favorisée par des doses croissantes de potassium, les doses élevées (20 mM/l) stimulent la rhizogénèse.

Mais l'effet le plus spectaculaire des ions K^+ se manifeste sur le bourgeonnement qui est très fortement stimulé quand la concentration en K^+ du milieu est de 5 mM/l (Fig. I.38).

b.1.3.3.2.3.4 Influence de la concentration en Mg^{++} .

Au delà de 1 mM/l, l'augmentation de la concentration en magnésium retarde la croissance des fragments de tige. La capacité de bourgeonnement et l'inhibition de la formation de racines ne sont pas modifiées (Fig. I.39).

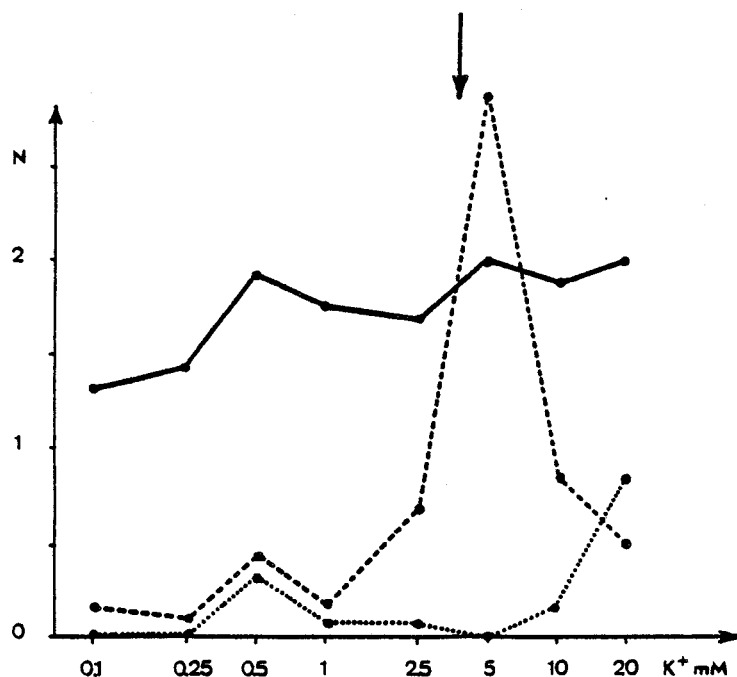


Fig. I.38 : Influence de la concentration en K^+ sur le nombre (N) des feuilles (—), des racines (···) et des bourgeons (---) formés par des fragments de tige cultivés pendant 75 jours en présence de BAP (cv 23721).

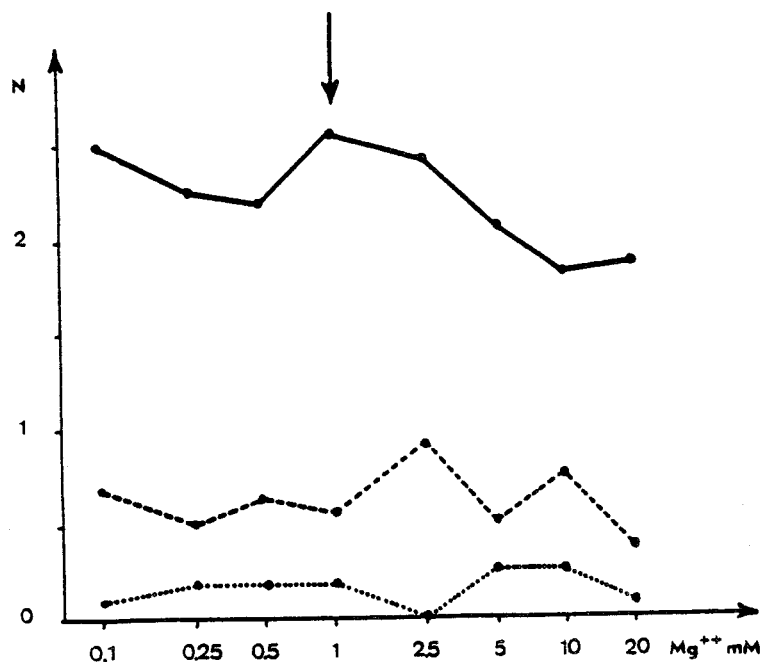


Fig. I.39 : Influence de la concentration en Mg^{++} sur le nombre des feuilles (—), des racines (···) et des bourgeons (---) formés par des fragments de tige cultivés pendant 75 jours en présence de BAP (cv 23721).



b.1.3.3.2.3.5 Influence de la concentration en Ca^{++} .

La concentration en calcium du milieu de culture a également peu d'influence sur la croissance et le bourgeonnement des explantats. Nous notons seulement l'effet néfaste sur la croissance, des concentrations supérieures à 1 mM/l et une légère stimulation du bourgeonnement lorsque la concentration en Ca^{++} est égale à 5 mM/l (Fig. I.40).

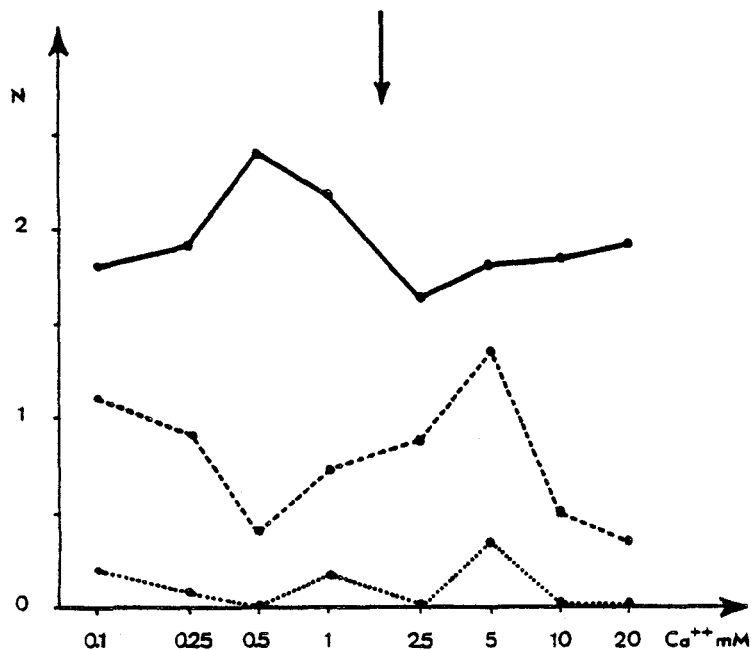


Fig. I.40 : Influence de la concentration en Ca^{++} sur le nombre (N) des feuilles (—), des racines (···) et des bourgeons (---) formés par des fragments de tige cultivés pendant 75 jours en présence de BAP (cv 23721).

b.1.3.3.2.3.6 Influence de la concentration ionique totale.

Lors de cette expérience, nous avons fait varier la concentration totale en éléments minéraux tout en conservant la même balance ionique entre tous les éléments, c'est à dire que le milieu minéral de base a été concentré ou dilué à des taux différents (Table I.15).

Composants	Coefficients de concentration								
	0,1	0,3	0,5	0,7	1,0	1,5	2,5	5,0	
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	40	120	200	280	400	600	1000	2000	mg/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	30	90	150	210	300	450	750	1500	"
KH ₂ PO ₄	25	75	125	175	250	375	625	1250	"
K ₂ HPO ₄	21	64	106	148	212	318	530	1060	"
Mg(SO ₄) 7H ₂ O	25	75	125	175	250	375	625	1250	"
NO ₃ ⁻	0,34	1,02	1,70	2,37	3,39	5,09	8,48	16,95	mM/l
NH ₄ ⁺	0,45	1,36	2,27	3,18	4,54	6,81	11,35	22,70	"
(N)	0,79	2,38	3,97	5,55	7,93	11,90	19,82	39,65	"
PO ₄ ³⁻	0,31	0,92	1,53	2,45	3,05	4,58	8,75	15,25	"
K ⁺	0,43	1,28	2,14	2,99	4,27	6,41	10,68	21,35	"
Mg ⁺⁺	0,10	0,30	0,51	0,71	1,01	1,52	2,53	5,05	"
Ca ⁺⁺	0,17	0,51	0,85	1,18	1,69	2,54	4,23	8,45	"
SO ₄ ⁻⁻	0,33	0,98	1,64	2,30	3,28	4,92	8,20	16,40	"
CIT	2,12	6,37	10,62	14,86	21,23	31,84	53,08	106,15	"

Table 1.15 : Concentrations pondérales et molaires des différents milieux de culture.

Le milieu témoin (coefficient de concentration = 1) est le plus propice à la croissance des explantats alors que l'emploi du même milieu concentré 1,5 fois favorise le bourgeonnement (Fig. I.41).

Exprimées en mM/l, les concentrations ioniques totales (CIT) optimales sont donc de 21 pour la croissance et de 32 pour le bourgeonnement.

b.1.3.3.2.3.7 Influence des variations minérales multiples.

Nous avons d'abord étudié l'influence de variations simultanées de la concentration en K⁺ et PO₄³⁻, ces deux ions ayant une action importante sur le bourgeonnement des fragments de tige (Table I.16).

		Concentrations molaires en K ⁺ et PO ₄ ³⁻								
K ⁺	mM/l	2,5	2,5	2,5	5,0	5,0	5,0	7,5	7,5	7,5
PO ₄ ³⁻	mM/l	2,5	5,0	10	2,5	5,0	10	2,5	5,0	10
Composants										
NO ₃ ⁻		3,39	3,39	3,39	3,39	3,39	3,39	3,39	3,39	3,39
NH ₄ ⁺		4,54	4,54	4,54	4,54	4,54	4,54	4,54	4,54	4,54
(N)		7,93	7,93	7,93	7,93	7,93	7,93	7,93	7,93	7,93
PO ₄ ³⁻		2,50	5,00	10,00	2,50	5,00	10,00	2,50	5,00	10,00
K ⁺		2,50	2,50	2,50	5,00	5,00	5,00	7,50	7,50	7,50
Mg ⁺⁺		1,01	1,01	1,01	1,01	1,01	1,01	1,01	1,01	1,01
Ca ⁺⁺		1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69
Cl ⁻		0,00	0,00	0,00	1,84	0,00	0,00	4,36	0,54	0,00
SO ₄ ⁻⁻		3,28	3,28	3,28	3,28	3,28	3,28	3,28	3,28	3,28
Na ⁺		0,33	2,82	7,83	0,00	1,45	6,43	0,00	0,00	4,64
CIT		19,24	24,23	34,24	23,25	25,36	35,34	28,27	30,77	36,05

Table I.16 suite : Teneurs en mM/l des ions minéraux des milieux de culture.

Les fortes concentrations en K⁺ et PO₄³⁻ stimulent la croissance des explantats sauf dans le cas des concentrations extrêmes (7,5 et 10 mM/l).

Le nombre de bourgeons par explantat dépend des concentrations en potassium et en phosphates. L'augmentation de la teneur en phosphates favorise le bourgeonnement et la teneur en potassium est optimale à 7,5 mM/l quand la concentration en phosphates est de 2,5 mM/l et à 5 mM/l quand la concentration en phosphates est supérieure à 2,5 mM/l. Le nombre maximum de bourgeons est obtenu quand le potassium et les phosphates sont additionnés à raison de 5 mM/l chacun, l'association K = 5,0 mM/l et P = 10,0 mM/l devant être rejetée par suite de l'apparition de nombreuses malformations (Table I.17).

K ⁺ mM/l PO ₄ ³⁻ mM/l	Concentrations molaires en K ⁺ et PO ₄ ³⁻								
	2,5	2,5	2,5	5,0	5,0	5,0	7,5	7,5	7,5
	2,5	5,0	10	2,5	5,0	10	2,5	5,0	10
Organes									
Feuilles	1,89	2,00	1,80	2,30	2,19	2,29	2,25	2,89	1,76
Racines	0,33	0,52	0,20	0,20	0,09	0,24	0,40	0,26	0,12
Bourgeons	0,50	1,38	0,80	0,95	1,90	1,94	1,10	1,37	1,47
Bo. > 5 mm									
Bo. < 5 mm	0,50	0,38	0,19	1,38	0,18	0,18	0,22	0,18	0,00

Table I.17 : Influence de la teneur en potassium et en phosphates sur le nombre de feuilles, de racines et de bourgeons par fragment de tige cultivés pendant 75 jours en présence de BAP et sur le rapport du nombre de bourgeons de taille supérieure à 5 mm sur le nombre de bourgeons de taille inférieure à 5 mm (cv 23328).

Nous avons également étudié l'influence de la teneur totale en azote minéral et du rapport $\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+$ sur le développement des fragments de tige sur un milieu modifié de telle sorte que la concentration en potassium soit égale à 5,50 mM/l et celle des phosphates à 7,5 mM/l. Outre l'azote minéral, le milieu de culture comprend également de l'azote organique apporté par l'hydrolysate de caséine additionné à raison de 1 g/l de milieu (Tables I.18 et I.19).

Lorsque le milieu de base est enrichi en K⁺ et PO₄³⁻, le plus grand nombre de bourgeons est obtenu quand la concentration en azote minéral est compris entre 2,5 et 5,0 mM/l. La croissance la plus active est également obtenue pour les mêmes valeurs (Fig. I.42).

Les variations de la concentration en azote minéral n'ont pas d'influence sur la formation des racines qui demeure inhibée par la présence de BAP.

La croissance optimale des explantats est obtenue quand le rapport $\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+$ est égal à 2,33, la concentration totale en azote minéral demeurant fixe et égale à 7,93 mM/l. Une levée partielle de l'inhibition de la rhizogénèse est observée pour $\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+ = 2,33$.

(N) mM/l	Concentrations molaires en azote total								
	0,00	2,50	5,00	7,93	10,0	12,5	15,0	17,5	20,0
Composants mg/l									
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	0	127	254	400	400	400	400	400	400
(NH ₄) ₂ SO ₄	0	94	188	300	377	471	496	520	542
KH ₂ PO ₄	418	418	418	418	418	418	418	418	418
K ₂ HPO ₄	212	212	212	212	212	212	212	212	212
Mg(SO ₄) 7H ₂ O	250	250	250	250	137	0	0	0	0
CaCl ₂ 2H ₂ O	248	170	90	0	0	0	0	0	0
Mg(NO ₃) ₂ 6H ₂ O	0	0	0	0	117	259	259	259	259
NH ₄ NO ₃	0	0	0	0	0	0	83	169	255
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	443	443	443	443	443	443	443	443	443

Table I.18 : Composition en mg/l des milieux de culture utilisés pour l'étude de l'influence de la concentration totale en azote minéral.

NO ₃ ⁻ / NH ₄ ⁺	0,00	0,18	0,43	1,00	2,33	5,67	∞
Composants mg/l							
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	0	141	281	400	400	400	400
(NH ₄) ₂ SO ₄	524	445	367	242	148	0	0
KH ₂ PO ₄	418	418	418	418	418	418	418
K ₂ HPO ₄	212	212	212	212	212	212	212
MgSO ₄ 7H ₂ O	250	250	250	177	0	0	0
CaCl ₂ 2H ₂ O	248	160	73	0	0	0	0
Mg(NO ₃) ₂ 6H ₂ O	0	0	0	74	259	259	259
NH ₄ NO ₃	0	0	0	0	11	95	0
NaNO ₃	0	0	0	0	0	12	214
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	443	443	443	443	443	443	443

Table I.19 : Composition en mg/l des milieux de culture utilisés pour l'étude de l'influence du rapport NO₃⁻ / NH₄⁺.



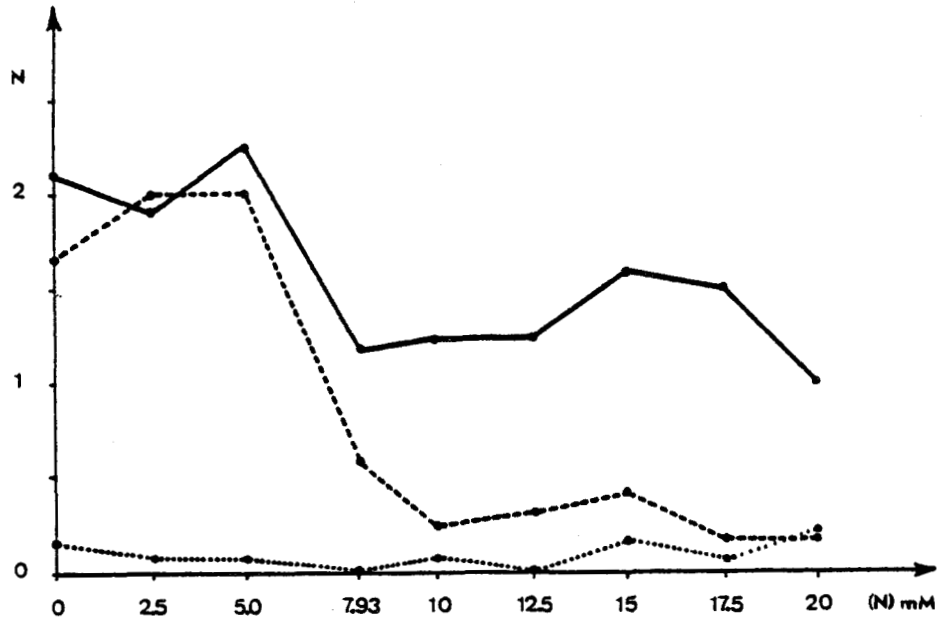


Fig. I.42 : Influence de la concentration totale en azote minéral (N) en mM/l sur le nombre (N) des feuilles (—), des racines (···) et des bourgeons (---) formés par des fragments de tige cultivés pendant 75 jours en présence de BAP (cv 23721).

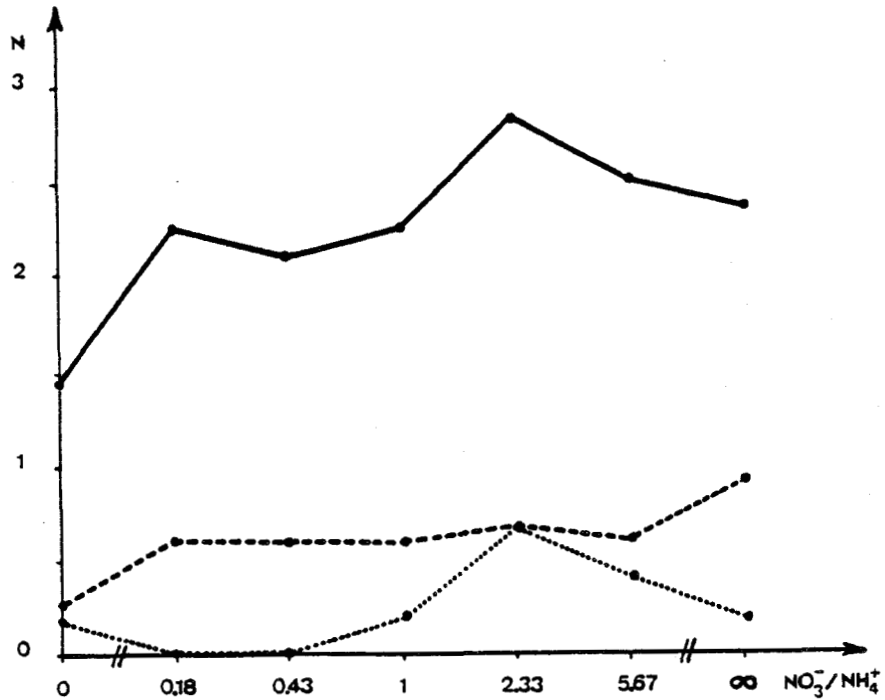


Fig. I.43 : Influence du rapport $\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+$ sur le nombre (N) des feuilles (—), des racines (···) et des bourgeons (---) formés par des fragments de tige après 75 jours de culture en présence de BAP (cv 23721).



Entre 0,18 et 5,67, les variations du rapport $\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+$ n'ont pas d'influence sur le bourgeonnement (Fig. I.43).

A la suite des résultats précédents, nous avons essayé plusieurs formulations minérales (Table I.20).

Composants mg/l	Milieux de culture						
	A	B	C	D	E	F	G
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	400	400	400	400	400	160	360
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	300	100	100	100	100	100	500
KH_2PO_4	250	250	418	418	418	418	250
K_2HPO_4	212	212	212	212	212	212	0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250	250	250	250	250	0	250
$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0	0	0	0	0	260	0
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0	0	0	276	443	276	0
KNO_3	0	0	0	0	0	0	550

Table I.20 : composition minérale (en mg/l) des milieux de culture.

Au milieu minéral est additionné le fer de la solution de MURASHIGE et SKOOG (1962) dilué au 1/4, les microéléments de LESQUIRE (1969), les vitamines de KOCH (1974), 20 mg/l d'adénine, 50 mg/l d'inositol, 500 mg/l de peptone, 500 mg/l de tryptone, 2 mg/l de glycocolle, 5 g/l de saccharose, 10 g/l de glucose, $5 \cdot 10^{-6}$ M/l de BAP, 10^{-8} M/l d'AIA et 8,5 g/l d'agar-agar, le pH avant autoclavage est ajusté à 6,5.

Lorsque l'on diminue la concentration totale en azote minéral de 7,93 (milieu témoin A) à 4,90 mM/l sans modifier la teneur en potassium et en phosphates (milieu B), on constate une diminution du nombre de feuilles et de bourgeons, par contre, lorsque la teneur en K est égale à 5,50 mM/l et celle de PO_4 à 4,30 mM/l (milieu C), la croissance est moins active mais le nombre de bourgeons par plantule mère est plus important (Table I.21).

Organes	Milieux de culture						
	A	B	C	D	E	F	G
Feuilles	4,44	4,30	4,14	4,56	3,26	4,10	3,74
Racines	1,50	1,45	1,48	2,31	0,74	2,22	2,10
Bourgeons	1,33	1,10	1,86	1,19	2,16	1,33	1,05

Table I.21 : Influence de la composition minérale du milieu de culture sur la formation de feuilles, de racines et de bourgeons par des fragments de tige cultivés pendant 75 jours en présence de BAP (cv 24297).

Par rapport au milieu C (N = 4,9 mM/l; K = 5,5 mM/l et P = 4,29 mM/l), l'addition d'une quantité supplémentaire de phosphates dont la concentration passe de 4,29 à 6,29 mM/l (milieu D), stimule la croissance et la rhizogénèse mais réduit le bourgeonnement. Si la concentration en phosphates est encore augmentée (7,5 mM/l) (milieu F), la croissance est fortement réduite au profit d'une stimulation importante du bourgeonnement.

Il faut remarquer qu'en présence du milieu F, en plus des bourgeons qui résultent du développement des méristèmes pré-existants, apparaissent des bourgeons surnuméraires (Photo I.8).

L'emploi de ce milieu entraîne cependant en fin de culture un certain nombre de nécroses. N'ayant pas fait l'essai, il ne nous est pas possible de dire si des repiquages plus fréquents sur milieu neuf, aurait évité cet inconvénient.

La réduction de la quantité du calcium sans modifier les concentrations en N, K⁺ et PO₄³⁻ (milieu F) améliore la croissance des explantats mais réduit le nombre de bourgeons.

Le milieu G utilisé pour la croissance des jeunes plantules de Phalaenopsis (PARISOT, communication personnelle) ne nous a pas donné satisfaction, la croissance et le bourgeonnement des plantules mères sur ce milieu étant relativement faibles.

Comme la présence simultanée de nitrate de calcium et de phosphate dipotassique dans le milieu de culture provoque souvent la formation d'un précipité insoluble de phosphate de calcium, nous avons, pour éviter cet inconvénient, essayer de le remplacer par du phosphate monopotassique sans modifier la concentration molaire des principaux ions (Table I.22)

Composants mg/l	Milieux de culture		
	H	I	J
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	400	400	400
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	300	300	100
KH_2PO_4	418	750	750
K_2HPO_4	212	0	0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250	250	250
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	276	110	110
Organes			
Feuilles	3,06	3,00	3,00
Racines	0,06	0,35	0,33
Bourgeons	1,75	1,71	1,93

Table I.22 : Influence de la composition minérale du milieu sur la formation de feuilles, de racines et de bourgeons par des fragments de tiges cultivés pendant 75 jours en présence de BAP (cv 24121).

On constate qu'en remplaçant le phosphate dipotassique (milieu H) par du phosphate monopotassique (milieu I), on ne modifie pas le développement des explantats mais la diminution de la concentration en azote total par suppression d'une fraction du sulfate d'ammonium favorise le bourgeonnement (milieu J).

Nous avons enfin étudié l'influence des variations de la concentration en potassium (milieux L et M) sur milieu appauvri en azote ammoniacal en comparant avec un milieu

témoin (milieu K) et un milieu à forte teneur en phosphates (milieu N). Nous avons également utilisé un nouveau milieu dont les caractéristiques sont les suivantes :

- la concentration ionique totale est égale à 27 mM/l;
- le rapport $\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+$ est égal à 3,0;
- les rapports suivants entre les différents éléments sont conservés :

- . N = 2,00
- . P = 0,30
- . K = 2,90
- . Mg = 0,90
- . Ca = 2,00

elles correspondent en fait aux teneurs en pourcents de la matière sèche des différents éléments minéraux constituant des feuilles de Phalaenopsis (Soil and Plant Lab. Inc., Santa Clara, Calif. USA) (Table I.23).

Composants mg/l	Milieux de culture.				
	K	L	M	N	O
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	400	400	400	400	820
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	300	100	100	100	140
KH_2PO_4	250	418	418	418	100
K_2HPO_4	212	212	212	212	0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250	250	250	250	695
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0	0	0	443	0
K_2SO_4	0	0	350	0	420
NH_4NO_3	0	0	0	0	43
Organes					
Feuilles	3,14	3,23	3,28	2,67	2,55
Racines	0,57	1,07	0,50	0,33	0,09
Bourgeons	2,07	2,62	2,43	2,17	1,91

Table I.23 : Influence de la composition minérale du milieu sur la formation de feuilles, de racines et de bourgeons par des fragments de tige cultivés pendant 75 jours en présence de BAP (cv 24002).

Les fragments de tige repiqués sur ces différents milieux ont été obtenus par dissection de plantules de semis au stade 4-5 feuilles, donc des plantules plus âgées que celles que nous avons habituellement utilisées.

L'addition d'une quantité supplémentaire de potassium active la croissance des explantats et favorise le bourgeonnement quand la concentration en K^+ est égale à 5,5 mM/l. Par contre lorsque la concentration en PO_4^{3-} est augmentée et égale à 7,5 mM/l, la croissance est fortement réduite tandis que le bourgeonnement est légèrement supérieur au témoin. Enfin sur le milieu 0, la croissance et le bourgeonnement des explantats sont moins actifs que sur le milieu témoin.

b.1.3.4 Influence du précédent cultural.

Deux lots de fragments de tige sont cultivés, l'un en présence de BAP, l'autre en absence de régulateur de croissance. Après 45 jours de culture, les plantules sont prélevées aseptiquement et les bourgeons des plantules mères cultivées en présence de BAP sont éliminés. Les deux lots sont ensuite repiqués sur un milieu enrichi en potassium et additionné de 5.10^{-6} M/l de BAP. Les feuilles, les racines et les bourgeons sont dénombrés après 75 jours de culture (Table I.24)

Organes	Conditions de préculture	
	BAP 5.10^{-6}	BAP 0
Feuilles	3,00	3,00
Racines	0,16	0,53
Bourgeons 5 mm	0,58	1,47
Bourgeons 5 mm	0,96	0,87
Bourgeons totaux	1,53	2,33

Table I.24 : Influence de la préculture sur la formation de feuilles, de racines et de bourgeons par des fragments de tige cultivés pendant 75 jours en présence de BAP (cv 24297).

On constate que la réalisation d'une préculture sur milieu additionné de BAP ne modifie pas la croissance des explantats mais provoque une inhibition plus importante de la rhizogénèse. D'autre part, cette préculture diminue le nombre de bourgeons par explantat et réduit leur taille.

La préculture en présence de BAP en provoquant une diminution du nombre de méristèmes axillaires par explantat puisqu'une partie d'entre eux se sont développés en plantules filles, explique le moindre nombre de bourgeons par explantat en fin de culture proprement dite, des plantules mères dont la préculture a été réalisée en présence de BAP.

b.1.4 Poursuite du cycle de multiplication.

Les plantules mères et les bourgeons obtenus par culture in vitro de fragments de tige en présence de BAP, peuvent à nouveau être utilisés pour la multiplication végétative in vitro du Phalaenopsis.

b.1.4.1 Culture des plantules mères.

Les plantules mères sur lesquelles les bourgeons ont été prélevés aseptiquement, repiquées sur le même milieu de base sans régulateur de croissance se développent rapidement. Le développement racinaire, inhibé lors de la culture sur le milieu pour bourgeonnement est très actif pendant le premier mois de culture (Fig. I.44). Il n'y a pas de développement des méristèmes axillaires sur ce milieu. Après deux à trois mois de culture sur ce milieu, les plantules sont aptes à être repiquées en serre.

Lorsque les plantules mères sont repiquées sur le milieu de base additionné de BAP, d'AJA et d'adénine, les méristèmes axillaires de la base de la plantule se développent en bourgeons. Toutefois, le nombre de bourgeons présents sur les plantules mères en fin de culture, est moins important que si la même culture est réalisée avec des plantules n'ayant pas encore été cultivées en présence de BAP (Table I.24, § b.1.3.4),

La croissance de ces bourgeons est également moins rapide.

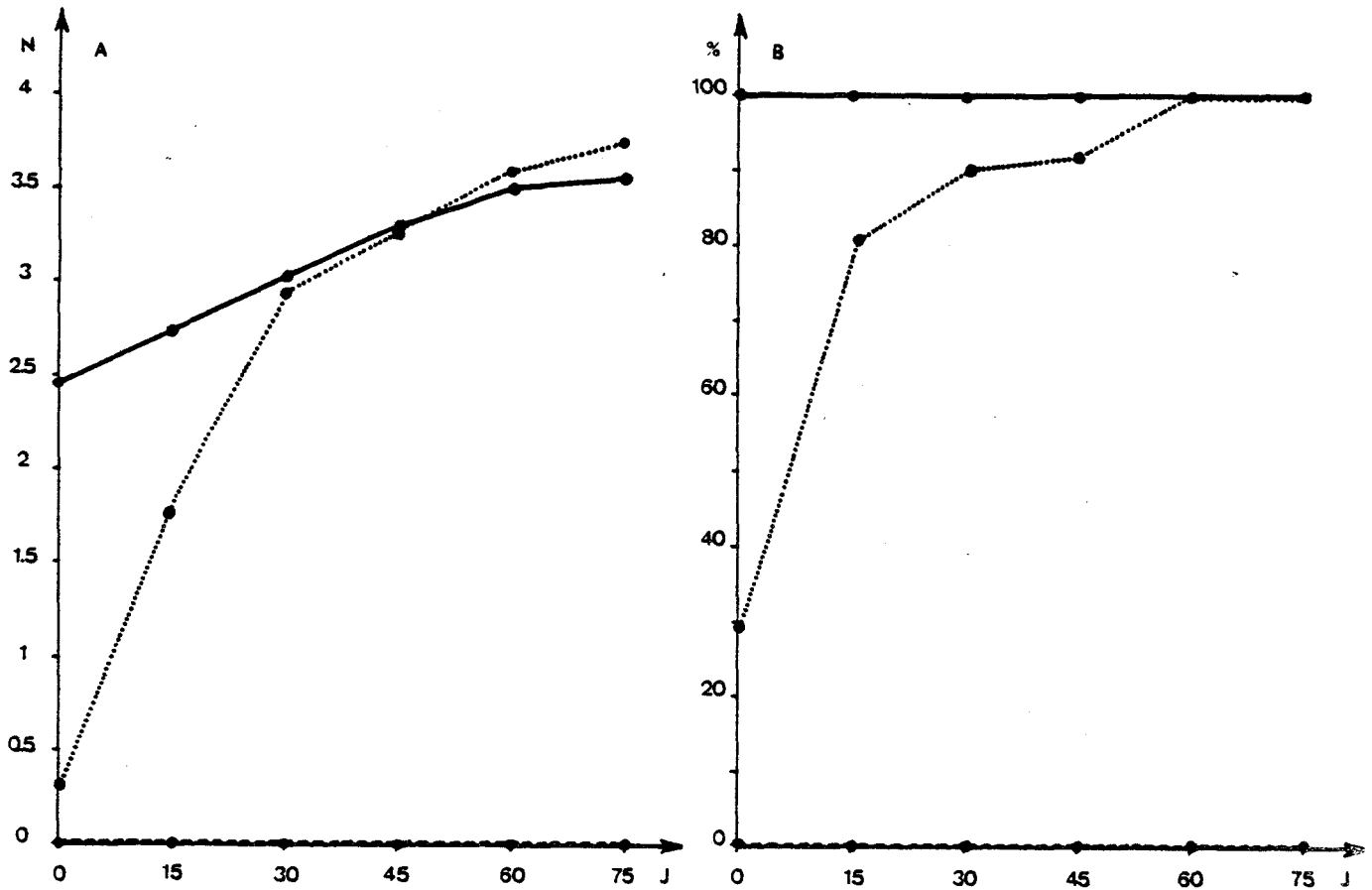


Fig. I.44 : A : Evolution du nombre de feuilles (—), de racines (···) et de bourgeons (---) formés par plantule mère cultivée sur milieu sans régulateur de croissance en fonction de la durée de la culture en jours (J). B : Pourcentage de plantules mères présentant des feuilles (—), des racines (···) et des bourgeons (---) en fonction de la durée de la culture en jours (J). (cv 23340).

h.1.4.2 Culture des bourgeons.

Les conditions antérieures de culture des plantules mères ayant une importance prépondérante sur le devenir des bourgeons, nous devons distinguer les résultats des cultures de bourgeons

provenant du développement des méristèmes axillaires de fragments de tige cultivés sur le milieu de base non enrichi en potassium et en phosphore et les résultats des cultures de bourgeons provenant du développement des méristèmes axillaires ou obtenus par dédifférenciation d'autres tissus de fragments de tige cultivés sur les milieux enrichis en phosphore et en potassium que nous avons formulés.

b.1.4.2.1 Cultures de bourgeons formés sur le milieu de base.

b.1.4.2.1.1 Distribution de la taille des bourgeons.

La taille des bourgeons après 75 jours de culture est en moyenne de 5 mm, mais elle peut varier entre 1 et 16 mm (Fig. I.45).

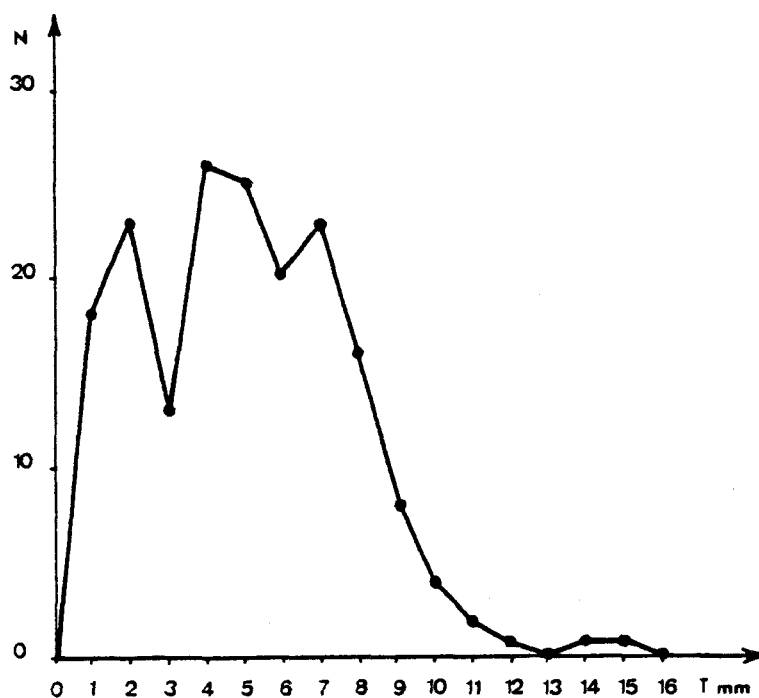


Fig. I.45 : Distribution suivant la taille en mm (T mm) d'un lot de 181 bourgeons issus de la culture de 95 fragments de tige.

b.1.4.2.1.2 Culture de bourgeons de plus de 5 mm.

Les bourgeons dont la taille est supérieure à 5 mm, cultivés en présence de 5.10^{-6} M/l de BAP se comportent comme les fragments de tige obtenus par dissection des plantules de semis.

En présence de BAP, les méristèmes axillaires présents sur les bourgeons sont capables de se développer à leur tour en bourgeons tandis que la rhizogénèse demeure inhibée (Fig. I.46 A).

En absence de BAP, nous n'observons pas de bourgeonnement mais des racines apparaissent rapidement (Fig. I.46 B), bien que les feuilles soient légèrement moins nombreuses quand les plantules filles sont cultivées en absence de BAP, celles ci sont d'une taille nettement plus grande.

b.1.4.2.1.3 Culture de bourgeons de moins de 5 mm.

Deux essais de culture de bourgeons de petite taille ont été réalisés. Lors du premier essai, les bourgeons répartis selon leur taille sont repiqués en tubes de 160 x 22 mm contenant 18 ml de milieu de culture comprenant les macro-éléments et les microéléments de FONNESBECH (1972 a), 1 g/l d'hydrolysate de caséine, 20 g/l de saccharose, le fer selon MUPASHIGE et SKOOG dilué de moitié ainsi que 5.10^{-6} M/l de BAP, 10^{-8} M/l d'AIA et 8,5 g/l d'agar-agar. Les cultures sont placées à l'obscurité pendant 15 jours après le repiquage (Table I.25).

Taille	NF	NR	Pf	Pr	Pf+Pr	% S
> 5 mm	3,25	0,21	1,79	0,00	1,79	100
5 > T > 3 mm	2,71	0,25	1,67	0,12	1,79	100
3 > T > 2 mm	2,21	0,00	2,65	0,39	3,04	88
≤ 2 mm	1,74	0,00	2,16	0,72	2,88	71

Table I.25 : Influence de la taille des explantats sur la formation des feuilles (NF), des racines (NR), des plantules filles (Pf), sur la néoformation de protocormes (Pr) et sur le pourcentage de survivants après 75 jours de culture. Moyennes calculées sur 24 explantats par condition (cv 23721).

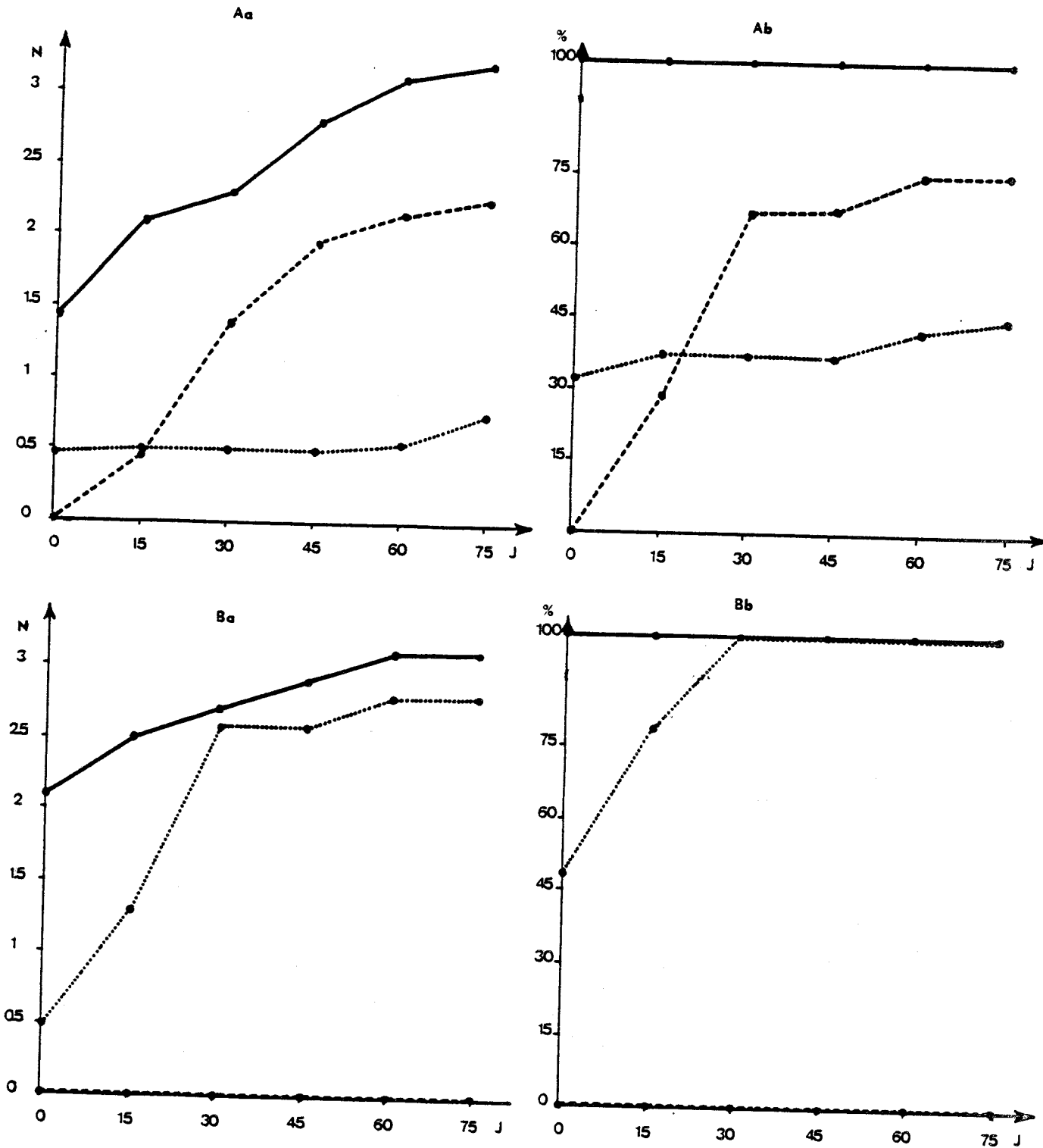


Fig. 1.46 : a : évolution du nombre (N) de feuilles (—), de racines (···) et de bourgeons (---) formés par les plantules filles cultivées en présence (A) ou en absence (B) de BAP en fonction de la durée de culture en jours (J). b : pourcentage (%) de plantules filles présentant des feuilles (—), des racines (···) et des bourgeons (---) en fonction de la durée de culture en jours (J) (cv 23340).

Lors du deuxième essai, les bourgeons ont été repiqués en flacons de 500 ml à raison de 10 explantats par flacon contenant 120 ml de milieu de culture comprenant les macroéléments et les microéléments de FONNESBECH (1972 a), le fer selon MURASHIGE et SKOOG (1962) dilué au demi, 1 g/l d'hydrolysate de caséine, 20 mg/l d'adénine, 10 g/l de saccharose, $5 \cdot 10^{-6}$ M/l de BAP, 10^{-8} M/l d'AIA et 8,5 g/l d'agar-agar. Les cultures sont placées à la lumière immédiatement après le repiquage (Table I.26).

Taille	NF	NR	Pf	Pr	Pf+Pr	% S
20 > T ≥ 10 mm	3,00	0,10	1,00	0,00	1,00	100
10 > T ≥ 7 mm	3,00	0,20	0,90	0,00	0,90	100
7 > T ≥ 4 mm	2,60	0,50	1,20	0,00	1,20	100
4 > T ≥ 2 mm	1,77	0,11	0,33	2,56	2,89	90
T = 2 mm	1,38	0,00	0,00	4,25	4,25	80
2 > T ≥ 1 mm	0,50	0,00	0,00	3,83	3,83	60
T = 1 mm	0,75	0,00	0,00	3,25	3,25	40

Table I.26 : Influence de la taille des explantats sur la formation des feuilles (NF), des racines (NR), des plantules filles (Pf), sur la néoformation de protocormes (Pr) et sur le pourcentage d'explantats survivants après 75 jours de culture. Moyennes calculées sur 10 explantats par condition (cv 23721)

Des protocormes apparaissent sur les explantats à condition que ceux ci aient une taille inférieure à 5 mm (Photo I.9), alors que les explantats de plus de 5 mm ne régénèrent que des plantules filles sans passage par le stade protocorme. Toutefois, plus la taille des explantats diminue, plus le taux de mortalité augmente.

b.1.4.2.1.4 Influence de la densité de population.

En repiquant un nombre différent de bourgeon de 9 à 5 mm, par flacons de 300 ml contenant 60 ml de milieu de culture, on constate que la densité de la population influe sur le dévelop-

pement des explantats, le milieu de culture comprenant les éléments minéraux, les vitamines et les additifs de FONNESBECH (1972 a et b), 1 g/l d'hydrolysate de caséine, 20 g/l de saccharose, $5 \cdot 10^{-6}$ M/l de BAP, 10^{-8} M/l d'PIA et 8,5 g/l d'agar-agar (Table I.27).

Nombre d'explantats	Nombre d'organes en fin de culture			
	Feuilles	Racines	Bourgeons	Protocor.
20	2,54	0,41	0,86	4,00
15	3,00	0,80	0,60	3,20
12	2,50	0,50	0,00	3,00
8	2,78	0,86	1,14	0,00
5	2,25	0,00	1,75	0,00

Table I.27 : Influence du nombre d'explantats par flacon sur le développement de ceux ci après 90 jours de culture.

Nous pouvons tirer de cette expérience plusieurs conclusions :

- l'accroissement de population a une action stimulante sur la néoformation des protocormes;
- en flacon et à condition que la densité de population soit suffisante, les protocormes apparaissent sur des explantats dont la taille est supérieure à 5 mm, ce que nous n'avons pas remarqué lorsque les cultures sont réalisées en tube;
- la formation de bourgeons sur les explantats est optimale aux plus basses densités alors que la formation de protocormes est optimale aux plus fortes densités;
- il peut y avoir simultanément formation de bourgeons et de protocormes.

Toutefois, l'augmentation du nombre d'explantats par unité de volume de milieu provoque un noircissement important du milieu de culture dû à la synthèse de phénols par les bourgeons. En conséquence, aux densités élevées, des nécroses apparaissent

à partir d'une cinquantaine de jours de culture. Il faudrait donc ultérieurement prévoir en cours de culture de renouveler le milieu usagé par du milieu neuf ce que nous n'avons pas réalisé lors de cette expérience.

b.1.4.2.2 Culture de bourgeons formés sur milieu enrichi en potassium et en phosphore.

Nous avons réitéré l'étude de l'influence de la taille de l'explantat en utilisant comme matériel pour l'ensemencement primaire des bourgeons obtenus par culture de fragments de tige sur un milieu contenant de fortes concentrations en K^+ et PO_4^{3-} (Fig. I.47)

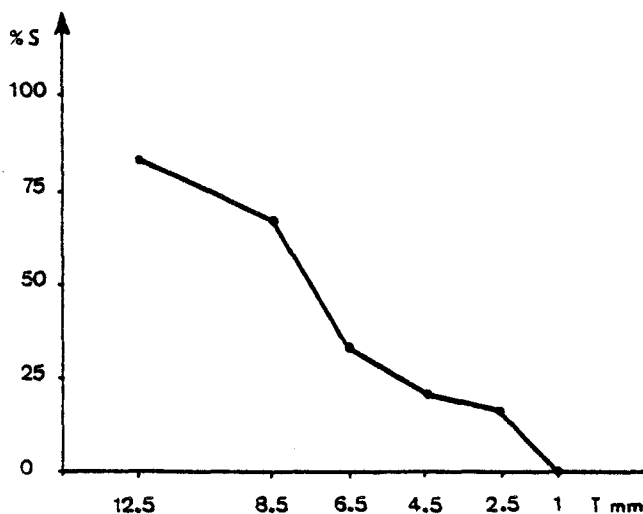


Fig. I.47 : Influence de la taille de l'explantat (T en mm) sur le pourcentage de survivants après 75 jours de culture (% S) (cv 24114).

Comme nous disposons d'un stock de bourgeons assez important, nous avons donc essayé de définir de nouvelles conditions de culture dans le but d'une part, de permettre le développement des explantats mais encore d'obtenir la néoformation de protocormes.

Pour cela, les études suivantes ont été réalisées :

- influence de la composition minérale du milieu de culture; quatre milieux différents ont été utilisés, ce sont les formulations de WHITE (1943), de THOMALE (1954), de MURASHIGE et SKOOG (1962) et de FONNESBECH (1972 a) additionnées de 5.10^{-6} M/l de BAP;
- influence des variations des concentrations en N, P et K en utilisant comme milieu de base, le milieu de FONNESBECH modifié comme nous l'avons précédemment indiqué, et additionné de 5.10^{-6} M/l de BAP.
- influence des variations des concentrations en BAP (5.10^{-6} , 10^{-6} M/l) associée à l'acide gibbéréllique (10^{-6} , 10^{-7} ou 0 M/l) en milieu liquide agité;
- influence de la concentration du saccharose (0, 5, 10, 20 ou 40 g/l) en milieu liquide agité additionné de BAP;
- enfin, nous avons comparé deux milieux gélosés différents, l'un contenant 5.10^{-6} M/l de BAP et l'autre démunie de régulateurs de croissance et additionné de 75 g/l de banane verte fraîche et de 2 g/l de charbon activé.

Lorsque le milieu de culture comprend les macroéléments de FONNESBECH (1972 a), les microéléments de LESCURE (1969), le fer selon MURASHIGE et SKOOG (1962) dilué au quart, les vitamines de KOCH (1974 a), 2 mg/l de glycocolle, 50 mg/l d'inositol, 500 mg/l de peptone, 500 mg/l de tryptone, 10 g/l de glucose, 5 g/l de saccharose, 75 g/l de banane verte, 2 g/l de charbon activé et 8,5 g/l d'agar-agar, les bourgeons dont la taille est de l'ordre de 5 mm, se développent activement en pousses feuillées qui s'enracinent après 15 à 30 jours de culture. D'autre part, dans quatre cas sur 24, des protocormes sont apparus.

Dans tous les autres cas étudiés, qu'il s'agisse de cultures en milieu gélosé ou liquide agité, en présence de fortes ou de faibles concentrations en N, P et K et quelle que soit la concentration et la nature des régulateurs de croissance utilisés, nous n'avons pas observé plus de 5 %

d'explantats survivants en fin de culture ni d'apparition de bourgeons ou la néoformation de protocormes. Une à deux semaines après le repiquage, un halo noir apparaît autour de l'explantat dans le milieu de culture puis 3 à 4 semaines après l'ensemencement, les explantats brunissent et meurent.

En considérant que la mort rapide des explantats pouvait provenir d'une exaltation de la synthèse des polyphénols en présence de BAP, nous avons transplanté un lot de bourgeons sur milieu neuf tous les quinze jours afin d'éviter l'action toxique des phénols. Mais l'application de cette technique n'a pas permis d'améliorer nos résultats.

Nous avons également repiqué sur le milieu de base gélosé démuné de régulateurs de croissance, de banane verte et de charbon actif, des plantules mères présentant des bourgeons de petite taille (2 à 3 mm) obtenues par culture de fragments de tige sur un milieu enrichi en potassium et en phosphore additionné de 5.10^{-6} M/l de BAP. Après 75 jours de culture, on constate que les bourgeons de moins de 5 mm présents sur les plantules mères ne se développent pas mais demeurent vivants (Table I.28).

Organes	Nombre d'organes par plantule mère	
	début de culture	fin de culture
Feuilles	3,00	4,44
Racines	0,11	1,44
bourgeons T 5 mm	1,44	1,33
bourgeons T 5 mm	0,11	0,22

Table I.28 : Evolution du nombre des feuilles, des racines et des bourgeons présents par plantule mère après 75 jours de culture.

Il faut donc en conclure qu'après leur formation sur des fragments de tige cultivés en présence de BAP et de fortes teneurs en potassium et en phosphore, la majeure partie des

bourgeons entrent dans une phase de latence qui ne peut être levée qu'en additionnant au milieu de culture, de la banane verte et du charbon actif. Toutefois, nous ne pouvons déterminer si cette levée d'inhibition est due à l'un ou à l'autre de ces deux composés ou des deux à la fois.

b.1.5 Culture et multiplication des protocormes.

Nous avons cherché à préciser d'une part l'analogie de structure entre les protocormes que nous avons obtenus par culture de bourgeons et les protocormes de semis et à définir quelques conditions de culture aptes à assurer une multiplication rapide des protocormes de néoformation.

b.1.5.1 Structure anatomique des protocormes de néoformation.

Les observations microscopiques de coupes fines de protocormes néoformés sur des bourgeons montrent de la périphérie vers le centre, les tissus suivants :

- un épiderme à stomates;
- un parenchyme assimilateur très restreint;
- un parenchyme de réserve important à cellules volumineuses contenant des grains d'amidon;
- un parenchyme à petites cellules d'apparence proche de celle d'un tissu méristématique;
- un faisceau conducteur central unique de structure uniquement primaire qui peut être entouré de quelques cellules légèrement sclérifiées (Photo I.10).

L'examen de coupes réalisées sur des protocormes issus du développement d'embryons séminaux a montré les mêmes structures que chez le protocorme de néoformation (Photo I.11). Les protocormes de semis et de néoformation sont donc anatomiquement analogues.

b.1.5.2 Influence du mode de dissection sur la multiplication des protocormes.

Le mode de dissection des protocormes est déterminant pour se multiplier ultérieurement. En effet, les protocormes de

Phalaenopsis ne peuvent être manipulés comme les protocormes de Cymbidium.

Lorsque l'on sectionne les protocormes de Phalaenopsis en plusieurs fragments selon la technique utilisée avec les protocormes de Cymbidium, on constate que peu de temps après leur ensemencement sur un milieu nutritif, les fragments se décolorent et meurent alors que lorsque les protocormes sont uniquement isolés les uns des autres, en évitant toute blessure excessive, les protocormes se multiplient rapidement.

Cette différence de comportement entre les protocormes de Phalaenopsis et ceux de Cymbidium est vraisemblablement due à leurs particularités anatomiques.

Nous avons vu que le tissu de type méristématique qui engendre les néoformations est périphérique et sous jacent à l'épiderme chez le Cymbidium (MOREL, 1965) alors que ce type de tissu est limitrophe du faisceau conducteur chez le protocorme de Phalaenopsis et donc qu'une fragmentation telle qu'elle est pratiquée chez le Cymbidium endommagerait trop gravement ce tissu chez le Phalaenopsis.

b.1.5.3 Influence de la concentration en régulateurs de croissance et de la présence de charbon actif.

Des protocormes néoformés sur des bourgeons de moins de 5 mm (cv 24114) cultivés sur le milieu de base additionné de $5 \cdot 10^{-6}$ M/l de BAP, ont été repiqués isolément en tubes contenant 18 ml de milieu de culture composé des solutions minérales et vitaminiques de FOMNESBECH (1972 a), de 2 mg/l de glycocolle, 50 mg/l d'inositol, 20 mg/l d'adénine, 1 g/l d'hydrolysate de caséine, 5 g/l de saccharose, 10 g/l de glucose et de 7,5 g/l d'agar-agar. Le milieu était en outre additionné de BAP à raison de 10^{-7} ou $5 \cdot 10^{-6}$ M/l ou d'AIA à 10^{-6} M/l ou encore de charbon actif à 2 g/l (Table I.29).

Les cultures ont été placées à 25° et éclairées 16 h par jour sous une intensité approximative de 500 Lux fournie par des tubes fluorescents de type Sylvania Gro Lux.

Conditions	% S	% Ex→Pl	F/Pl	R/Pl	Pl/Ex	Pr/Ex
Témoin	85	59	1,50	0,80	0,59	1,88
AIA 10^{-6} M/l	86	52	1,76	0,80	0,52	1,74
charbon 2 g/l	88	31	1,25	0,25	0,38	2,23
BAP 10^{-7} M/l	90	44	1,75	0,63	0,50	2,10
BAP 5.10^{-6} M/l	82	22	1,00	0,33	0,29	2,44

Table I.29 : Influence de la BAP, de l'AIA et du charbon sur le développement de protocormes (cv 24114) après 30 jours de culture.

% S : pourcentage d'explantats survivants en fin de culture.

% Ex→Pl : pourcentage d'explantats se développant uniquement en plantules.

F/Pl : nombre de feuilles par plantule.

R/Pl : nombre de racines par plantule.

Pl/Ex : nombre de plantules par explantat.

Pr/Ex : nombre de protocormes par explantat.

On constate que l'addition d'AIA au milieu de culture n'a pas d'influence sur la néoformation des protocormes ni sur la différenciation des plantules.

Par contre, la BAP stimule la multiplication des protocormes à 10^{-7} M/l et retarde nettement la différenciation des plantules. Lorsque la BAP est présente à 5.10^{-6} M/l, les protocormes sont de petite taille et mal individualisés ce qui les rend impropres à toute subculture.

Enfin la présence de charbon dans le milieu de culture stimule la néoformation des protocormes mais retarde la différenciation des plantules.

Lors des cultures ultérieures nous avons donc utilisé des milieux de culture additionnés de 10^{-7} M/l de BAP.

b.1.5.4 Influence de la composition minérale, de la concentration en ANA et des composés organiques complexes sur la multiplication des protocormes.

Des protocormes néoformés (cv 24121) ont été repiqués sur le milieu décrit précédemment, additionné de 10^{-7} M/l de BAP et de 276 mg/l de phosphate monosodique et en augmentant la concentration en phosphate monopotassique de 250 à 418 mg/l. Au milieu a également été additionné trois doses différentes d'ANA : 10^{-8} , 10^{-7} et 10^{-6} M/l.

L'acide naphtylacétique associé à 10^{-7} M/l de BAP, favorise la différenciation des plantules, la concentration optimale en ANA étant de 10^{-7} M/l. Mais on constate également une diminution du nombre de protocormes néoformés par explantat quand la concentration en ANA augmente (Table I.30).

	ANA			
	0	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}
Plantules	0,50	0,73	1,00	0,50
Protocormes	4,00	2,10	2,40	1,92

Table I.30 : Influence de la concentration en ANA sur le nombre de plantules et de protocormes formés par explantat après 30 jours de culture en présence de 10^{-7} M/l de BAP.

Nous avons aussi remarqué que les protocormes cultivés sur le milieu modifié sont de taille plus petite mais surtout leur coloration est nettement différente, ils sont d'un vert sombre, ce qui pourrait être provoqué par l'augmentation de la concentration en phosphore du milieu de culture.

Les protocormes néoformés sur le milieu précédent démuné d'ANA ont été isolés et repiqués sur différents milieux minéraux additionnés des mêmes composants organiques et de 10^{-7} M/l de BAP (Table I.31).

Composants mg/l	Milieux de culture				
	P	Q	R	S	T
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	400	400	400	400	360
(NH ₄) ₂ SO ₄	300	300	300	100	500
KH ₂ PO ₄	250	418	418	418	250
K ₂ HPO ₄	212	212	212	212	0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	250	250	250	250	250
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	0	0	276	276	0
KNO ₃	0	0	0	0	550
Résultats					
% Survivants	54	71	38	46	79
plantule / explant.	0,31	0,18	0,00	0,00	0,21
protocorme / explant.	1,00	1,29	1,78	1,27	1,16

Table I.31 : Influence de la composition minérale du milieu de culture sur le nombre de plantules et de protocormes néoformés par explantat après 30 jours de culture.

On constate après 30 jours de culture que quel que soit le milieu minéral utilisé, le taux de multiplication et le pourcentage d'explantats survivants sont peu importants même quand les protocormes sont cultivés sur le milieu de base non modifié. Nous avons également constaté que les subcultures de protocormes issus des milieux R et S, sur le milieu de base n'ont donné aucun résultat.

Les protocormes du milieu P ont été isolés et repiqués sur le milieu Q additionné de 10^{-7} M/l de BAP et de 1000 mg/l d'hydrolysate de caséine ou de 500 mg/l de tryptone et 500 mg/l de peptone (Table I.32).

Le mélange de peptone et de tryptone dans le milieu de culture est préférable à l'utilisation de l'hydrolysate de caséine. Toutefois, le 3^e repiquage du clone 24121 confirme la diminution des capacités de néoformation et de la vitesse de différenciation des plantules.

	Durée de culture			
	30 J		60 J	
	HC	P + T	HC	P + T
plantules / explant.	0,14	0,50	1,00	1,45
protocormes / explant.	0,86	1,79	0,33	3,89
% de survivants	33	67	14	50

Table I.32 : Influence de l'addition de composés organiques complexes (HC : hydrolysat de caséine; P + T : mélange de peptone et de tryptone) sur le nombre de plantules et de protocormes néoformés par explantat et sur le pourcentage d'explantats survivants après 30 ou 60 jours de culture.

L'utilisation de milieux de culture à concentration élevée en phosphates, provoque un ralentissement important de la croissance des protocormes de Phalaenopsis qui ne s'exprime que lors des repiquages ultérieurs. L'inhibition partielle de la croissance ne peut d'ailleurs plus être levée par la suite en modifiant la composition minérale du milieu de culture et l'on assiste à une dégénérescence progressive du clone avec le temps. Les effets des concentrations élevées en PO_4^{3-} sur les protocormes sont similaires à ceux observés sur les cultures de fragments de tige et de bourgeons.

b.2 Culture de plantules de semis au stade 2 feuilles.

En étudiant l'influence de la concentration en NO_3^- , P, K, Mg et Ca des milieux de culture sur le bourgeonnement de fragments de tige, nous avons réalisé deux cultures successives dans les mêmes conditions. Lors du premier passage, de jeunes plantules au stade deux feuilles (cv 23721) avaient été repiquées.

Or nous avons remarqué pendant ce premier passage la néoformation de protocormes sur les feuilles (Photo I.12).

L'apparition des protocormes est toujours accompagnée par la mort des plantules, elle est également liée aux conditions de croissance et de bourgeonnement limités et à l'observation d'un taux de mortalité important (Table I.33).

Concentration mM/l	élément variant				
	NO ₃ ⁻	P	K	Mg	Ca
0,10	10	0	0	0	0
0,25	18	9	0	10	0
0,50	0	0	8	0	0
1,00	0	0	9	0	0
2,50	0	0	0	8	16
5,00	0	0	0	0	18
10	0	22	0	0	0
20	0	9	0	0	0

Table I.33 : Influence de la concentration en NO₃⁻, P, K, Mg et Ca sur le pourcentage de plantules présentant des protocormes sur les feuilles après 75 jours de culture en présence de 5.10⁻⁶ M/l de BAP.

Nous n'avons pas réussi à établir de cultures de ces protocormes.

b.3 Culture de feuilles.

Quels que soient le sens de repiquage, la provenance du fragment de feuille (partie apicale, médiane ou basale) et les concentrations en auxine ou en cytokinine du milieu de culture, nous n'avons observé aucun développement. Les explantats survivent plusieurs mois en culture puis jaunissent et meurent. Nous avons également reproduit les expériences de PIEPER et ZIMMER (1976) et ZIMMER et PIEPER (1977, 1978, 1979) mais sans succès.

b.4 Culture de racines.

Seuls les explantats munis d'un méristème se développent quelques temps dans le milieu de culture. Le fragment de racine continue sa croissance puis s'arrête et meurt. Les explantats démunis de méristèmes ne montrent aucun signe de développement.

b.5 Culture de méristèmes.

Des méristèmes axillaires et des apex de tige ont été prélevés sur des plantules de diverses origines: des plantules cultivées in vitro en présence de 5.10^{-6} M/l de BAP ou en absence de régulateurs de croissance ou des plantules cultivées en serre, âgées d'un an et demi.

Les explantats ont été repiqués en tubes contenant 18 ml de milieu de culture liquide composé des macroéléments de FONNESBECH (1972 a), des microéléments de LESCURE (1969), du fer selon MURASHIGE et SKOOG dilué au quart, des vitamines de KOCH (1974 a), de 500 mg/l de tryptone et de 500 mg/l de peptone et additionnés de différentes doses de saccharose (5, 10, 20 et 40 g/l), de BAP (10^{-6} et 5.10^{-6} M/l), d' AG_3 (5.10^{-7} M/l) et d'ANA (10^{-7} , 10^{-6} et 5.10^{-6} M/l). Les tubes de culture ont été placés sur un agitateur rotatif ou en position statique en pièce climatisée dont la température est maintenue à 21° et éclairés par des tubes luminescents 12 h par jour en plus de l'apport de lumière du jour.

Trois ensembles de facteurs influencent la durée de survie des explantats : l'origine des plantules, les conditions de culture et la position des méristèmes sur la tige (Table I.34).

- Les méristèmes prélevés sur des plantules préalablement cultivées in vitro en présence de 5.10^{-6} M/l de BAP meurent rapidement et il en est de même des méristèmes prélevés sur des plantes de serre.
- L'agitation du milieu favorise la survie des méristèmes et la concentration optimale en saccharose est comprise entre 10 et 20 g/l.
- Les apex de tige et les méristèmes axillaires situés le plus bas sur la tige ont montré des signes de développement alors que les méristèmes axillaires supérieurs meurent rapidement.

Conditions de culture								Position du méristème			
Or.	Ag.	BAP	AG ₃	ANA	SAC	Pré	N	A.T	I	M	S
I.V	+	5.10 ⁻⁶	0	0	5	+	6	0	0	0	0
"	+	"	0	0	10	+	6	0	0	1	0
"	+	"	0	0	20	+	6	0	0	0	0
"	+	"	0	0	40	+	6	0	0	0	0
"	+	"	0	0	5	0	6	0	1	0	1
"	+	"	0	0	10	0	6	4	2	0	0
"	+	"	0	0	20	0	18	4	8	1	0
"	+	"	0	0	40	0	6	1	1	0	0
"	0	"	0	0	5	0	4	0	0	0	0
"	0	"	0	0	10	0	4	0	0	0	0
"	0	"	0	0	20	0	4	0	0	0	0
S	+	0	0	0	20	0	4	0	0	0	0
"	+	10 ⁻⁶	0	0	20	0	4	0	1	0	0
"	+	5.10 ⁻⁶	0	0	20	0	4	0	0	0	0
"	+	10 ⁻⁶	5.10 ⁻⁷	0	20	0	4	0	0	0	0
"	+	5.10 ⁻⁶	5.10 ⁻⁷	0	20	0	4	0	0	0	0
"	+	10 ⁻⁶	0	10 ⁻⁷	20	0	4	0	0	0	0
"	+	10 ⁻⁶	0	10 ⁻⁶	20	0	4	0	0	0	0
"	+	5.10 ⁻⁶	0	10 ⁻⁷	20	0	4	1	0	0	0
"	+	5.10 ⁻⁶	0	10 ⁻⁶	20	0	4	0	0	0	0
"	+	10 ⁻⁶	0	5.10 ⁻⁶	20	0	4	0	0	0	0

Table I.34 : Influence de l'origine des méristèmes, de leur position (I : méristème axillaire inférieur, M : médian, S : supérieur, A.T : apex de tige) et des conditions de culture sur le nombre d'explantats survivants après 80 jours de culture. Or. : origine; I.V. : plantules cultivées in vitro; S : plantules cultivées en serre.

Ag. : agitation des milieux de culture.

SAC : concentration en saccharose (en g/l).

Préc. : 0 : plantules cultivées en absence de BAP; + : plantules cultivées en présence de BAP (5.10⁻⁶ M/l).

N : nombre d'explantats par catégorie de méristèmes.



Dans les limites de nos observations qui ont eu lieu après 80 jours de culture, les apex de tige se sont développés en pousses feuillées alors que les méristèmes axillaires se développent en masses globuleuses indifférenciées qui au moment de nos observations ne montraient aucun signe de formation de protocormes, ni de différenciation de plantules.

-----oOo-----

2) Culture de fragments de hampes florales.

a) Obtention des plantules primaires.

a.1 Matériel et méthodes.

a.1.1 Origine du matériel végétal.

Les hampes florales de Phalaenopsis des variétés suivantes :

Cabrillo Star Capitola	Jerry Van de Weghe PP 2291 M 625
Cinnamon Candy	Redfan
Petit Prince 2475	Henriette Lecoufle 23392
Scaramouche	Ondine 1792
Ravel	Vivaldi
Lady Ruby B 962	Opaline 2490
Francine Jeanne D'Arc	Courchevel
Golden Sands Canary GCA	Romance 22713
Golden Sands Miami Shore GSA	Cataracte

nous ont été aimablement fournies par les Ets Vacherot et Lecoufle à Boissy St Léger.

a.1.2 Préparation des explantats et mise en culture.

Les hampes sont préalablement nettoyées avec un coton imbibé d'alcool puis fractionnées en tronçons de 5 cm, chaque tronçon comportant un bourgeon latéral. Les bractées qui recouvrent les bourgeons sont délicatement arrachées en ayant soin de ne pas blesser le méristème sous jacent. Les fragments de hampes florales sont ensuite stérilisés par trempage dans une solution d'hypochlorite de calcium (70 g/l) additionnée de quelques gouttes de Tween 80, pendant 20 à 25 mn puis rincées 3 fois à l'eau distillée stérile pendant 5 mn. Les extrémités des fragments blanchies par l'hypochlorite de calcium sont sectionnées et les fragments de hampe sont repiqués verticalement en milieu de culture gélosé de telle sorte que le bourgeon latéral soit légèrement au dessus de la surface du milieu de culture. Nous avons également repiqué des bourgeons isolés. Dans ce cas, les bourgeons sont excisés à l'aide d'un scalpel à lame fine en effectuant une incision conique.

Les bourgeons excisés sont repiqués à plat, la surface de section étant en contact avec le milieu de culture.

a.1.3 Conditions de culture.

Les explantats sont cultivés sur un milieu gélosé contenant la solution minérale préconisée par FONNESBECH (1972 a), les vitamines du même auteur, 100 mg/l d'inositol, 2 g/l d'hydrolysate de caséine, 2 mg/l de glycocolle, 20 g/l de saccharose et 2 mg/l de BAP. Les cultures sont éclairées 12 h par jour et maintenues à 25°.

a.2 Résultats.

Le type de développement observé dépend de l'explantat utilisé (Table I.35).

Quand l'explantat est un fragment de hampe florale, on peut observer un des trois phénomènes suivants :

- le bourgeon latéral se développe en formant une pousse feuillée (développement végétatif) (Fig. I.48 C);
- le bourgeon latéral se développe en formant une nouvelle inflorescence (développement reproductif) (Fig. I.48 B);
- le bourgeon demeure inhibé puis meurt (Fig. I.48 A).

(Photos I.13 et I.14).

Quand l'explantat est un bourgeon excisé, nous n'observons pas de développement de type reproductif.

Nous avons également utilisé comme explantat, des fragments de nouvelles inflorescences formées in vitro, dans ce cas, nous n'observons pas non plus de développement reproductif, mais le nombre de bourgeons qui demeurent inhibés est plus important.

b) Multiplication végétative des plantules issues de cultures
.....
de bourgeons latéraux de hampes florales.
.....

Après 3 à 5 mois de culture, les pousses feuillées sont séparées des fragments de hampe initiaux et ont été repiquées en flacons de 250 ml contenant 60 ml de milieu gélosé comprenant les éléments minéraux, les vitamines et les additifs de

Explantat	Mode de développement		
	végétatif	reproductif	dormant
Fragment de hampe florale	38,6 %	52,3 %	9,1 %
Fragment d'inflorescence formée in vitro	76,7 %	0,0 %	23,3 %
Bourgeon excisé	62,4 %	0,0 %	37,6 %

Table I.35 : Influence du type de l'explantat sur le développement de bourgeons latéraux de hampes florales de Phalaenopsis.

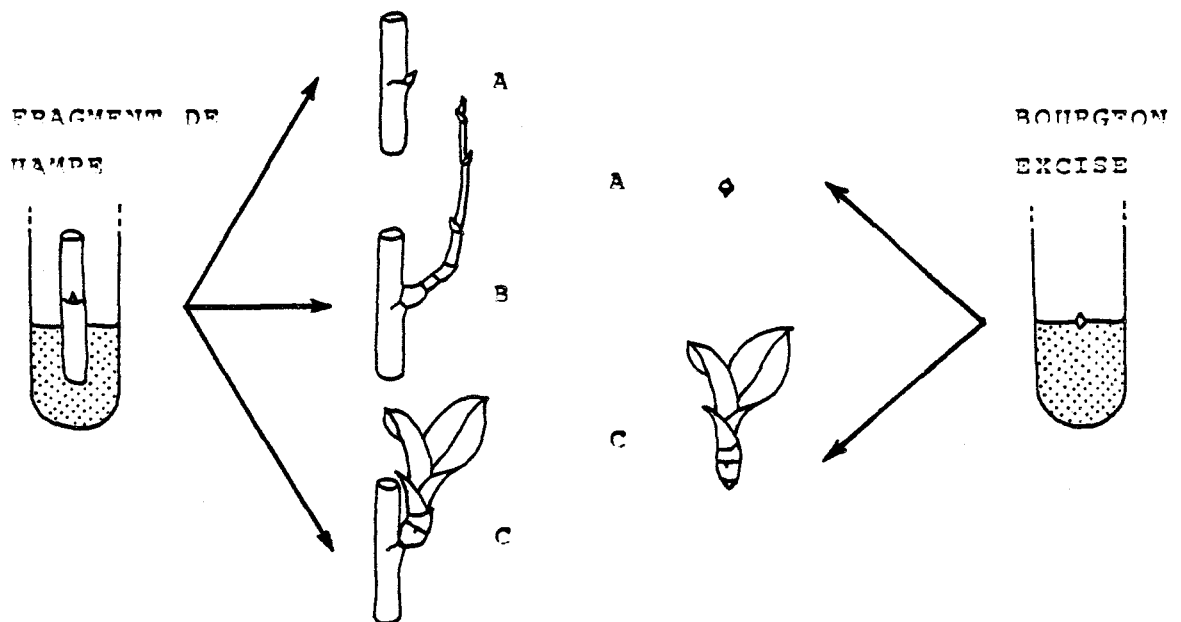


Fig. I.48 : Différents modes de développement des fragments de hampes florales et des bourgeons latéraux excisés en culture in vitro, A : bourgeon dormant, B : développement reproductif, C : développement végétatif.

FONNESBECH (1972 a et b), 20 g/l de saccharose, 5.10^{-6} M/l de BAP et 10^{-8} M/l d'AIA, à raison de 5 explantats par flacon.

Cette première culture pour tenter de multiplier les plantules végétatives s'est rapidement soldée par un échec. En effet nous avons constaté un noircissement extrêmement rapide et important des milieux de culture, du au relargage de polyphénols par les pousses feuillées, accompagné d'un début de nécroses.

Après 3 semaines, nous avons donc transféré les pousses feuillées sur le même milieu dépourvu de BAP et additionné de 2 g/l de charbon pulvérulent, dans le but de réduire les polyphénols. Après avoir été maintenues deux mois sur ce milieu, les pousses feuillées ont été prélevées aseptiquement, les feuilles externes ont été éliminées afin de ne laisser que les deux feuilles terminales et les explantats ont été repiqués en tubes contenant 18 ml de milieu gélosé comprenant les macroéléments de FONNESBECH (1972 a), les microéléments de LESCURE (1969), le fer de MURASHIGE et SKOOG (1962) dilué au quart, les vitamines de KOCH (1974 a), 50 mg/l d'inositol, 20 mg/l d'adénine, 2 mg/l de glycocolle, 500 mg/l de peptone, 500 mg/l de tryptone, 10 g/l de glucose, 5 g/l de saccharose, 5.10^{-6} M/l de BAP et 10^{-8} M/l d'AIA.

Lors de cette seconde culture en présence de BAP, nous avons constaté un moindre noircissement du milieu de culture, peut être du à la cicatrisation des blessures provoquées lors de l'élimination des fragments de hampes florales et nous n'avons pas observé de nécroses. 75 jours après le repiquage, nous avons dénombré les organes présents par explantat (Table I.36).

Dans l'ensemble, le nombre de bourgeons formés par plantule mère est relativement faible mais on constate de très fortes différences de comportement des explantats selon le cultivar.

Toutefois, il faut souligner l'apparition de bourgeons en nombre élevé chez les cultivars 22822 et Cataracte et surtout la néoformation de protocormes sur deux des trois explantats

du cultivar Golden Sands Canary, plante très intéressante commercialement puisqu'il s'agit d'un cultivar de Phalaenopsis à fleurs jaunes.

Cultivars	Nombre d'explantats	Nombre de feuilles	Nombre de racines	Nombre de bourgeon
Cabrillo Star Capitola	49	1,49	0,18	0,35
Cinnamon Candy	15	1,46	0,40	0,73
Petit Prince	10	1,70	0,80	0,40
23097	5	1,60	0,00	0,60
Scaramouche	4	2,75	0,25	0,50
Ravel	4	2,25	0,00	0,50
22822	4	2,00	0,06	2,25
Redfan	4	1,75	0,25	1,00
Courchevel	4	1,50	0,25	0,00
Golden Sands Canary GCA	3	1,33	0,00	4,00
Lady Ruby	2	2,00	0,00	1,00
Jerry Van de Weghe	2	1,50	0,50	0,00
Vivaldi	2	1,50	0,00	1,00
Cataracte	2	0,00	0,00	4,00
Francine Jeanne d'Arc	1	2,00	0,00	0,00
Ondine	1	1,00	0,00	0,00
Opaline	1	2,00	0,00	0,00
Romance	1	3,00	0,00	0,00

Table I.36 : Nombre de feuilles, de racines et de bourgeons par pousses feuillées de différents cultivars après 75 jours de culture en présence de BAP.

Mais par suite d'un incident technique qui nous a fait perdre la totalité des cultivars, nous n'avons pu poursuivre le cycle de multiplication par culture de bourgeons.

II) LA MULTIPLICATION VEGETATIVE DU PAPHIOPEDILUM.

A) MULTIPLICATION VEGETATIVE IN VITRO.

1) Matériel et methodes.

a) Provenance du matériel végétal.
.....

Les plantes sur lesquelles nous avons travaillé nous ont été fournies par les Ets Vacherot et Lecoufle à Doissy St Léger. Il s'agit de plantules de semis âgées de 11 mois cultivées aseptiquement sur un milieu synthétique inconnu de nous et issus des croisements suivants:

N° d'ordre	Croisement
36192	(P. Goultenianum album X P. Maudiae magnificum) = P. cv Onyx
36184	P. cv Marval X P. cv Banchory
36249	P. Chamberlainianum X P. cv Gitana
36339	P. cv Fort Laramie X P. cv Asmar

Les plantes issues du croisement 36192 sont à feuillage tessellé (feuilles à damiers blanc et vert) alors que les plantes issues des croisements 36184, 36249 et 36339 sont à feuillage vert uni.

Des prélèvements de méristèmes ont également été réalisées sur des plantes cultivées en serre issues des croisements suivants:

- P. cv Palestrina X P. cv Martinique (feuillage vert uni)
- P. cv Mme Martinet X P. cv Mme Martinet (feuillage tessellé)

b) Mise en culture.
.....

b.1 Culture d'explantats prélevés sur plantules aseptiques_
au stade 4 feuilles.

La technique que nous avons précédemment décrite pour le Phalaenopsis est également appliquée aux plantules de Paphiopedilum.

Les feuilles externes à l'exception des deux feuilles supérieures sont arrachées pour mettre à nu les méristèmes axillaires. Les racines sont sectionnées au plus court ainsi que les deux feuilles terminales un demi centimètre au dessus du méristème terminal.

Les explantats ainsi préparés sont repiqués verticalement, la base légèrement enfoncée dans le milieu gélosé. Les explantats sont cultivés en tubes de 160 x 22 mm contenant 18 ml de milieu de culture, obturés au coton hydrophile et capuchonnés avec une feuille d'étain.

b.2 Culture de méristèmes.

Les méristèmes sont prélevés sur des plantes au stade 7-9 feuilles, cultivées en serre. Les plantes sont dépotées et soigneusement nettoyées à l'eau courante après que les feuilles aient été sectionnées à 1 cm de la tige. Les plantes sont stérilisées à l'hypochlorite de calcium à la concentration de 40 g/l additionné de quelques gouttes de Tween 80 ou au chlorure mercurique à 1°/oo pendant 15 minutes. Les feuilles sont ensuite arachées une à une afin de dégager les méristèmes axillaires mais avant chaque excision, la tige est à nouveau stérilisée pendant 10 minutes et rincée trois fois à l'eau distillée pendant 5 minutes. Les méristèmes sont prélevés avec un scalpel à lame fine par excision conique sous loupe binoculaire et repiqués en tube de 160 x 22 mm contenant 18 ml de milieu de culture.

c) Les milieux de culture.

c.1 Culture de fragments de tige.

Quatre milieux de culture additionnés de différentes concentrations en BAP ont été utilisés:

A : milieu de FONNESBECH (1972)

B : milieu de THOMALE (1954) modifié par PARISOT (communication personnelle)

C : milieu de MURASHIGE & SKOOG (1962)

D : milieu de KNUDSON (1922) modifié par CAHUZAC (1979)

(Table II.1)

Table II.1 : Milieux de culture pour fragments de tige et
méristèmes de Paphiopedilum.

	A	B	C	D	E	
(NH ₄) ₂ SO ₄	300	60	1900	500	375	mg/l
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	400	125		2000		"
NH ₄ NO ₃		370	1650			"
KNO ₃		400				"
KH ₂ PO ₄	250	300	170	250	375	"
K ₂ HPO ₄	212					"
KCl					375	"
Mg(NO ₃) ₂ · 2H ₂ O		110				"
MgSO ₄ · 7H ₂ O	250		370	250	375	"
CaCl ₂			440			"
FeSO ₄ · 7H ₂ O	28	11	28	25	11	"
Na ₂ EDTA	38	14	38		14	"
MnSO ₄ · 4H ₂ O	25	2,5	22	17	80	"
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	10	0,1		9	0,1	"
ZnCl ₂			4			"
H ₃ BO ₃	10	0,1	6		0,1	"
KI		0,001	1	0,8	0,001	"
AlCl ₃		0,003			0,003	"
NiCl ₂ · 6H ₂ O		0,003			0,003	"
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025	0,003	0,025	0,025	0,003	"
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25		0,25	0,25		"
CoCl ₂ · 6H ₂ O			0,025	0,025		"
inositol	100		100	100		"
glycocolle	2			2		"
vitamine B ₁	0,5					"
vitamine B ₆	0,5					"
ac. nicotinique	1,0					"
extrait de levure					250	"
urée					500	"
hydrolysate de caséine 2000						"
saccharose	g/l · 20		20	20	20	
glucose	g/l ·	7,5				
fructose	g/l ·	7,5				
agar-agar	g/l · 7	7	7	7		



c.2 Culture de méristèmes.

Les méristèmes ont été repiqués sur les milieux B et E (E : milieu de FEHLAND (PIEPER & ZIMMER, 1974, b)) liquides agités (Table II.1) et additionnés de différentes concentrations de BAP et benzyl 9-(2-tetrahydropyranyl)adenine (PBA).

d) Conditions expérimentales.

Les cultures sont placées dans une pièce conditionnée à $21^{\circ} \pm 1^{\circ}$ située à l'est et reçoivent en plus de la lumière du jour, un éclairage d'appoint fourni 12h/24 par des tubes fluorescents du type Cool White de Luxe. L'intensité de l'éclairage est d'environ 500 Lux.

Pour les cultures en milieu liquide agité, les tubes sont placés, inclinés à 45° , sur un agitateur rotatif BIOLAFITTE tournant à 70 t.mn^{-1} .

2) Résultats.

a) Culture de tige.

a.1 Séquence de développement.

Après quelques semaines de culture, on observe la reprise d'activité du méristème terminal qui se traduit par l'apparition de nouvelles feuilles ainsi que de nouvelles racines apparaissent. Lorsque les conditions de milieu de culture le permettent (présence de BAP), on peut observer l'apparition de plantules filles à la base de l'explantat, généralement dans le milieu de culture. Ces plantules filles dont le nombre varie entre 1 et 4 par explantat, sont issues du développement des méristèmes axillaires puisque celles ci sont toujours situées dans le même plan que les feuilles de la plantule mère.

Ces plantules filles peuvent par la suite être repiquées séparément sur un milieu sans régulateur de croissance où elles se développent normalement alors qu'on ne constate pas d'enracinement si les plantules filles restent attachées à la plante mère.

a.2 Influence de la BAP.

La BAP est indispensable au développement des méristèmes axillaires en plantules filles, la concentration optimale étant située entre 10^{-6} et 10^{-5} M. Parallèlement au développement des bourgeons, on constate une diminution de la croissance de la plantule mère qui se traduit par un nombre de feuille moindre en fin de culture. Enfin, à 10^{-5} M, la BAP inhibe totalement la rhizogénèse (Fig. II.1).

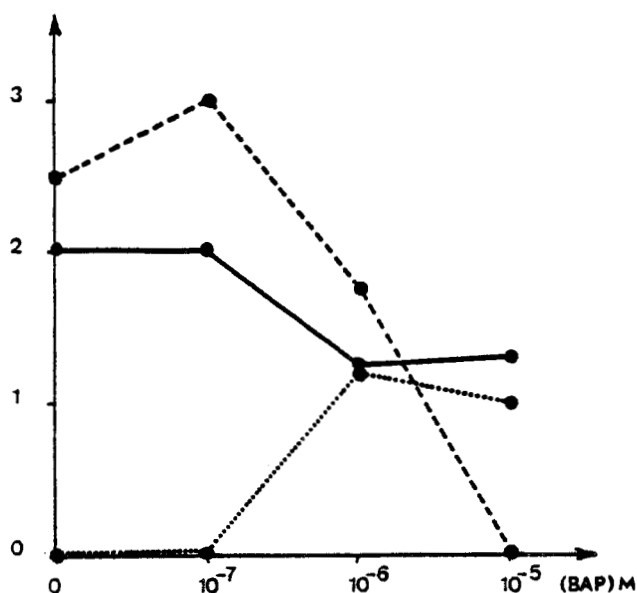


Fig. II.1 : Evolution du nombre de feuilles (—), de racines (---) et de bourgeons (···) selon la concentration en BAP (M/l) du milieu de culture après 120 jours de culture.

a.3 Influence du milieu de culture.

Aucun des milieux que nous avons utilisés n'est correctement adapté à la culture de fragments de tiges de Paphiopedilum. Alors que le milieu de MURASHIGE & SKOOG permet une croissance vigoureuse des plantes mères, celles ci sont atteinte d'une chlorose importante, il en est de même du milieu de FONNESBECH. Le milieu de THOMALE est intéressant pour le nombre de plantules filles apparues, mais la croissance des plantes mères est lente et le milieu de KNUDSON B donne des résultats inverses (Fig. II.2).

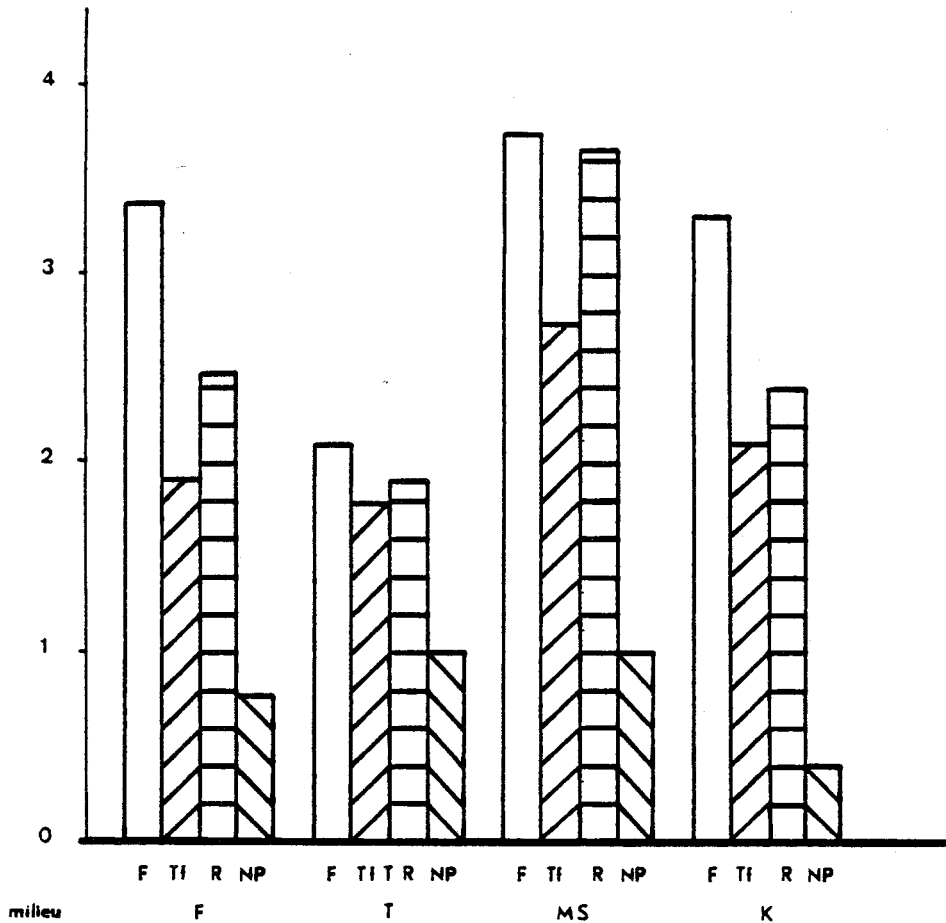


Fig. II.2 : Influence de différents milieux de culture : FONNESBECH (F), THOMALE (T), MURASHIGE & SKOOG (MS) et KNUDSON (K) additionnés de 10^{-6} M de BAP sur le nombre de feuilles (F), la taille de la plus grande feuille (Tf) en cm, le nombre de racines (R) et de plantules filles (NP) par plantule mère après 296 jours de culture.

a.4 Influence de la variété.

Les résultats évoqués ci dessus ont été obtenus avec le Paphiopedilum cv Onyx (36192). Les mêmes cultures réalisées avec les cultivars à feuillage vert uni (36184-36249-36339) n'ont montré aucun développement des méristèmes axillaires.

b) Cultures de méristèmes.

Nous n'avons observé aucun développement de méristèmes terminaux ou axillaires quelles qu'aient été les conditions de milieu et de variété.

Toutefois les seuls résultats acquis concernent les techniques de stérilisation. Le taux de cultures contaminées dépend de la position du méristème, le méristème terminal étant mieux protégé des contaminations extérieures que les méristèmes axillaires, ainsi que de l'agent stérilisant utilisé, la stérilisation au chlorure mercurique procurant une meilleure asepsie (Table II.2).

Agent stérilisant	Taux de contaminations
Hg	23 %
Cl	81 %
Place du méristème	
terminal	20 %
axillaire	63 %

Table II.2 : Influence de l'agent stérilisant et de la place du méristème sur le taux de contaminations des cultures.

B) LA MULTIPLICATION VEGETATIVE IN VIVO.

1) Matériel et méthodes.

a) Origine du matériel végétal.
.....

Les plantes âgées de deux ans et encore à l'état d'une seule pousse par pot, sont issues des croisements:

- P. cv Palestrina X P. cv Martinique (feuillage vert uni)
- P. cv Mme Martinet X P. Mme Martinet (feuillage tessellé)

b) Préparation des plantes.
.....

Chaque feuille est fendue en deux parties égales par une incision au scalpel de la nervure centrale. Les deux moitiés de limbe sont écartées l'une de l'autre et arrachées de la base de la tige afin de mettre à nu le méristème axillaire, cette opération est répétée plusieurs fois jusqu'à ce qu'il ne reste plus que les deux feuilles terminales. Une pâte obtenue par dissolution à chaud de 3 grammes de BAP pour 100 ml de lanoline est

appliquée après refroidissement sur les méristèmes axillaires. Toutes ces opérations sont réalisées sans dépotage de la plante afin de ne pas provoquer d'arrêt de croissance momentané.

2) Résultats.

On observe après quelques semaines, le développement des méristèmes axillaires en nouvelles pousses feuillées. Chez les plantes à feuillage tessellé, tous les bourgeons se sont développés avec parfois l'apparition de malformations caractérisées par un gaufrage longitudinal des feuilles externes des pousses nouvelles. Chez la plante traitée à feuillage vert uni, 3 méristèmes se sont développés mais la croissance de deux pousses s'est arrêtée lorsque celles ci ont atteint une taille de 2 cm environ (Table II.3, Photos II.1 à 4).

Variété et N° d'essai	Plantes traitées			Plantes témoins		
	NPf	FPM	FPL	NPf	FPM	FPL
Mme Martinet						
essai 1	3	5	4-3	2	8	3
essai 2	6	3	5-4-3 3-3	2	9	3
Palestrina X Martinique						
essai 1	4	4	* * 4-2-2	1	5	-

Table II.3 : Influence du traitement des méristèmes à la BAP sur le nombre de pousses feuillées par plante (NPf), sur le nombre de feuilles de la pousse mère (FPM) et sur le nombre de feuilles des pousses latérales (FPL) après 350 jours de culture.

* : pousses latérales à croissance inhibée.

C) CONCLUSION.

Le Paphiopedilum se multiplie végétativement in vitro par culture de fragments de tiges mais ce résultat doit être tempéré du fait que, d'une part toutes les variétés ne se prêtent pas à cette technique, seules les plantules à feuillage tessellé

issues du croisement P. Goultenianum album X P. Maudiae magnificum ont répondu positivement à la propagation végétative in vitro et que d'autre part les plantules utilisées proviennent de semis et sont donc de valeur inconnue.

Il faudrait donc renouveler les expériences avec un matériel végétal dont la valeur florale soit connue or nos tentatives de multiplication végétative par culture de méristèmes ont toutes échoué. D'autres recherches sont donc à mener dans ce sens.

De même qu'il est possible de provoquer le développement des méristèmes axillaires de plantules cultivées in vitro sur un milieu pourvu de BAP, nous avons forcé le développement des méristèmes axillaires de plantes adultes cultivées en serre par application directe sur les bourgeons d'une pâte additionnée de BAP mais avec des différences variétales atténuées par rapport à la culture in vitro.

III) CULTURE IN VITRO DE PROTOCORMES DE CYMBIDIUM.

A) MATERIEL ET METHODES.

1) Origine du matériel végétal.

Les protocormes de Cymbidium cv Peleas Merah nous ont été fournis par les Ets Vacherot et Lecoufle à Boissy St Léger en novembre 1978 et le clône est depuis lors entretenu au laboratoire.

2) Mise en culture.

Les techniques de culture sont celles préconisées par MOREL (1963). Lorsqu'apparaissent les premières feuilles, les protocormes sont prélevés aseptiquement et fragmentés de telle sorte que chaque explantat possède toujours son épiderme. Les fragments sont ensuite repris à la spatule et déposés à la surface d'un milieu gélosé. Les protocormes sont cultivés en erlenmeyers de 500 ml contenant 120 ml de milieu de culture, clos par un bouchon caoutchouc percé d'un trou obturé par une mèche de coton cardé.

3) Milieu de culture.

Les protocormes sont cultivés sur un milieu contenant les macroéléments de la solution minérale de FONNESECH (1972, a), les microéléments de VAJRHABAYA & VAJRHABAYA (1970), les vitamines de KOCH (1974, a), le fer complexé de MURASHIGE & SKOOG (1962) dilué au quart, un complexe organique constitué de peptone de viande (Merck), de tryptone (Difco), de banane verte du commerce et d'inositol plus 1% de saccharose et 1% de glucose. Lorsque les expériences ne comportent pas l'emploi de substances de croissance, il est également additionné 2 g/l de charbon activé (Merck) (Table III.1).

Les milieux sont stérilisés à l'autoclave (110° pendant 25 minutes). Après sortie de l'autoclave, les flacons sont énergiquement agités pour répartir convenablement le charbon et déposés

horizontalement de telle sorte que la surface du milieu affleure le col du flacon.

4) Conditions de culture.

Les cultures sur milieu solide sont entreposées en pièce climatisée à $25^{\circ} \pm 1^{\circ}$ et éclairées 16 heures par jour à l'aide de tubes fluorescents Sylvania Gro Lux sous une intensité approximative de 500 lux.

Les cultures en milieu liquide agité sont placées sur un agitateur horizontal rotatif à raison de 50 tr/mn. Les cultures sont éclairées en permanence à l'aide de tubes fluorescents Cool White de Luxe sous une intensité de 500 lux, la température étant réglée à $25^{\circ} \pm 1^{\circ}$.

B) RESULTATS.

Compte tenu que la méthode de culture des protocormes de Cymbidium n'offre pas de difficultés à priori, notre étude a porté sur le rôle que joue la densité de protocormes au sein d'un flacon sur la croissance du matériel végétal, c'est l'étude de l'effet de masse et d'autre part sur l'influence de la benzyl-aminopurine (BAP), sur la croissance, la multiplication des protocormes et leur différenciation.

1) L'effet de masse.

a) Courbe de croissance d'une culture.
.....

Afin de déterminer la durée optimale d'une culture, nous avons établi la courbe de croissance exprimée en gain de poids de matière fraîche d'un clone de protocormes de Cymbidium (Fig. III.1).

Après une phase de latence d'environ deux semaines, la culture entre en phase active de croissance, celle ci ne commençant à fléchir qu'après la 6^e semaine. Toutefois jusqu'à 7 semaines, on ne peut observer de phase stationnaire de croissance. Il n'est pas possible, en effet, d'apprécier uniquement l'accroissement de poids des protocormes puisqu'à partir de la 6^e semaine

Table III.1 : Composition du milieu de culture des protocormes.

Composants	Quantité par litre de milieu	Concentration de la solu- tion mère	Volume de solution mère / l	Remarques
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	400 mg	40 g/l	10 ml	
(NH ₄) ₂ SO ₄	300 mg	30 g/l	10 ml	
KH ₂ PO ₄	250 mg	25 g/l	10 ml	
K ₂ HPO ₄	212 mg	21,2 g/l	10 ml	
MgSO ₄ 7H ₂ O	250 mg	25 g/l	10 ml	
Na ₂ EDTA	9,5 mg	0,95 g/l	10 ml	
FeSO ₄ 7H ₂ O	7,0 mg	0,70 g/l	10 ml	
H ₃ BO ₃	1 mg	1 g/l] 1 ml	une seule solution
MnCl ₂ 4H ₂ O	2 mg	2 g/l		
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,1 mg	0,1 g/l		
CoCl ₂ 5H ₂ O	0,02 mg	0,02 g/l		
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,02 mg	0,02 g/l		
CuCl ₂ 2H ₂ O	0,01 mg	0,01 g/l		
glycocolle	0,5 mg	50 mg/100 ml] 1 ml	une seule solution ethanol 95%
pantothénate de Ca	0,5 mg	50 mg/100 ml		
acide nicotinique	0,2 mg	20 mg/100 ml		
thiamine	0,2 mg	20 mg/100 ml		
pyridoxine	0,2 mg	20 mg/100 ml		
peptone	500 mg	-	-	
inositol	50 mg	-	-	
charbon actif	2 g	-	-	
banane verte	75 g	-	-	
tryptone	500 mg	-	-	
saccharose	10 g	-	-	
glucose	10 g	-	-	
eau distillée Q.S.P.	1000 ml			
agar-agar	8,5 g	-	-	



pH ajusté à 6,5 avant autoclavage.

Lorsque les protocormes sont cultivés en milieu liquide, la banane verte est supprimée, celle ci opacifiant le milieu de culture.

apparaissent les premières feuilles.

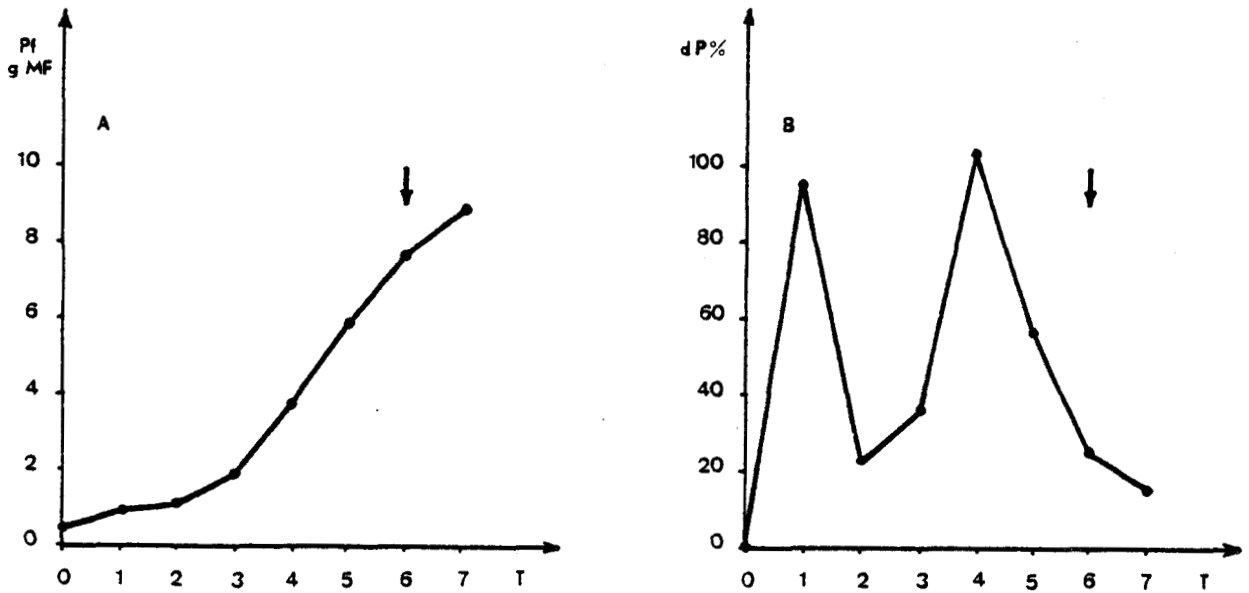


Fig. III.1 : A : Courbe de croissance d'une culture de protocormes exprimée en accroissement du poids de matière fraîche (PF en grammes de matière fraîche) en fonction du temps exprimé en semaines (T). B : Représentation graphique des variations hebdomadaires du taux de croissance (dP %).

Le calcul des variations hebdomadaires du taux de croissance selon la formule
$$\frac{P(\text{sem} + 1) - P(\text{sem})}{P(\text{sem})} \times 100$$
 montre un accroissement pondéral relatif important la première semaine. Ce pic est vraisemblablement dû à une pénétration importante d'eau dans les tissus par suite du fractionnement des protocormes au moment du repiquage et à la mise à nu des tissus préalablement protégés par un épiderme fortement cutinisé.

Un deuxième pic apparaît à la quatrième semaine et correspond à la phase de croissance la plus active des protocormes. On assiste ensuite à une diminution du gain de poids relatif.

Les cultures seront donc ultérieurement repiquées à 5 semaines (35 j), période où la croissance est encore intense

Les cultures seront donc ultérieurement repiquées à 5 semaines (35 j), période où la croissance est encore intense

mais avant l'apparition des pousses feuillées.

b) L'effet de masse.

La croissance des protocormes est influencée par la densité de population des cultures en milieu gélosé (Fig. III.2).

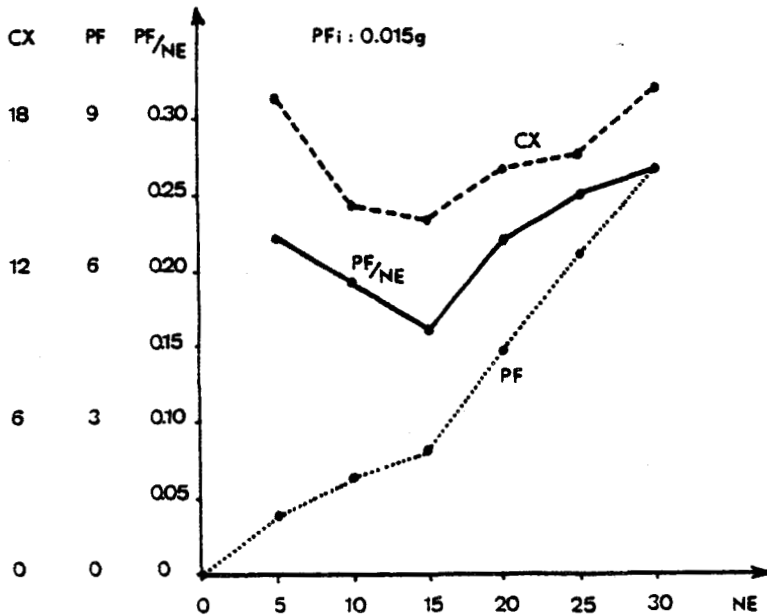


Fig. III.2 : Influence du nombre d'explantats (NE) par flacon sur le coefficient de multiplication (CX), le poids total de la culture (PF) et le poids d'un amas de protocormes (PF/NE) exprimés en gramme de matière fraîche. PFi = poids initial d'un fragment de protocorme.

On constate que l'augmentation du nombre de protocormes par flacon induit aux faibles densités (entre 5 et 15 explantats) un ralentissement de la croissance pondérale des protocormes alors que l'effet observé est inverse aux densités supérieures (à partir de 15 explantats).

Afin d'essayer d'expliquer ce phénomène, deux autres expériences ont été réalisées. Dans un premier essai, nous avons élargi la gamme des conditions (de 5 à 60 explantats), la quantité de milieu étant fixe et égale à 100 ml (Fig. III.3, A). Dans le deuxième essai, le nombre d'explantat par flacon est également étendu mais la quantité de milieu de culture par

flacon est variable et égale à 3,3 ml par fragment repiqué (Fig. III.3, B).

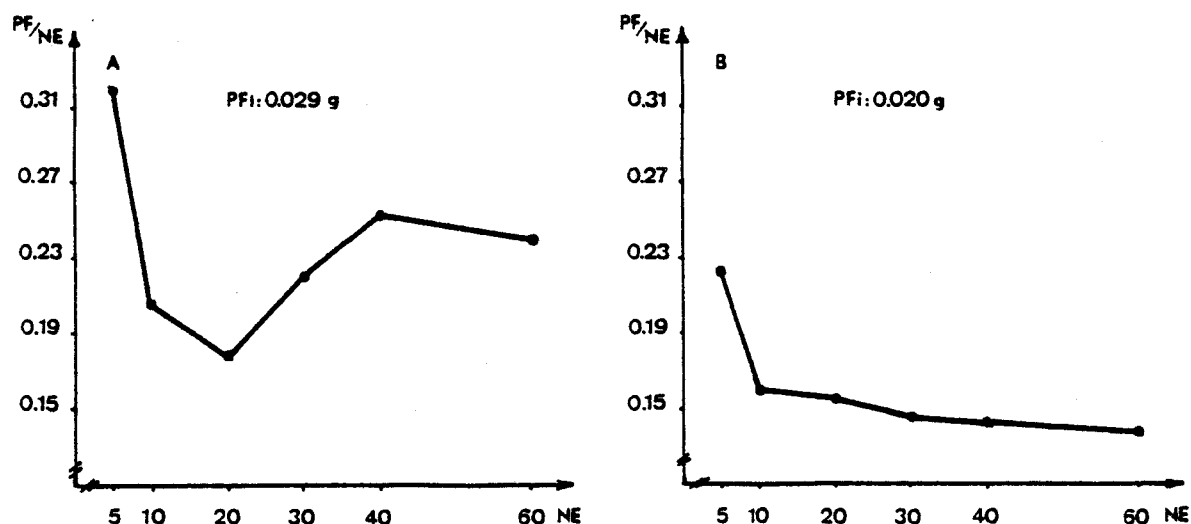


Fig. III.3 : A : Variation en gramme de poids frais par explantat (PF/NE) en fonction du nombre d'explantats repiqués (NE) pour 100 ml de milieu de culture. B : variation en gramme de poids frais par explantat (PF/NE) en fonction du nombre d'explantats repiqués (NE) pour 3,3 ml de milieu de culture par explantat après 35 jours de culture.

Lorsque la quantité de milieu est égale à 100 ml, on constate à nouveau qu'aux faibles densités (entre 5 et 20 explantats), l'augmentation du nombre d'explantats ralentit la croissance de ceux-ci, par contre cet effet est inversé entre 20 et 40 explantats puis on aboutit à une phase stationnaire au delà.

Lorsque la quantité de milieu de culture est fixe par rapport au nombre de fragments repiqués, on observe qu'hormis le cas où 5 fragments sont présents par flacon, la croissance pondérale des protocormes est sensiblement équivalente quelle que soit la condition de culture.

On peut donc vraisemblablement en déduire qu'une substance synthétisée par les protocormes stimule la croissance à partir d'un certain niveau de concentration (20 fragments/100 ml).

D'autre part, cette substance doit migrer dans le milieu de culture puisque lorsque la quantité de milieu de culture disponible par explantat est fixe, donc lorsque cette substance est en concentration identique quelle que soit la condition, la croissance des protocormes est sensiblement équivalente quelque soit le nombre de fragments repiqués. Par contre dans le deuxième essai, nous ne pouvons expliquer la présence d'un pic lorsque 5 fragments seulement sont repiqués.

2) Influence de la BAP sur les protocormes de *Cymbidium*.

a) Influence de la BAP sur la croissance et la multiplication des protocormes.

Aux faibles concentrations, la BAP a peu d'effets sur la croissance pondérale des protocormes cultivés en milieu liquide agité. Par contre aux concentrations supérieures à $5 \cdot 10^{-7}$ M, la croissance est partiellement inhibée (Fig. III.4).

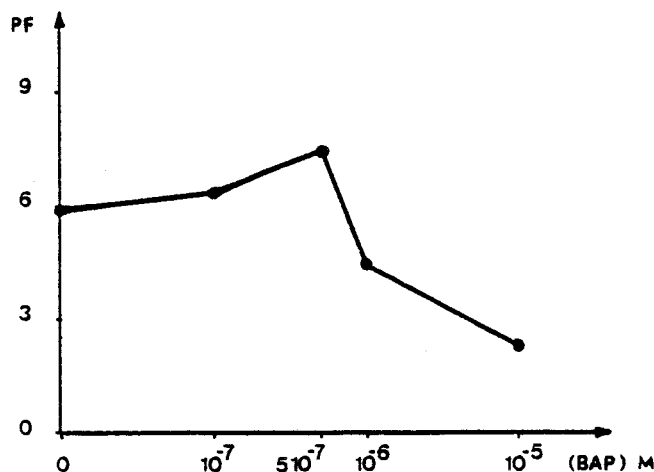


Fig. III.4 : Influence de la BAP sur la croissance des protocormes exprimée en gramme de matière fraîche (PF) après 35 jours de culture (inoculum: 30 fragments par flacon).

La BAP stimule fortement la croissance numérale des cultures de protocormes en milieu liquide agité. L'augmentation du nombre de protocormes néoformés par flacon suit l'augmentation de la concentration en BAP du milieu de culture jusqu'à 10^{-5} M (Fig. III.5). On observe donc parallèlement une diminution très

importante de la taille des protocormes.

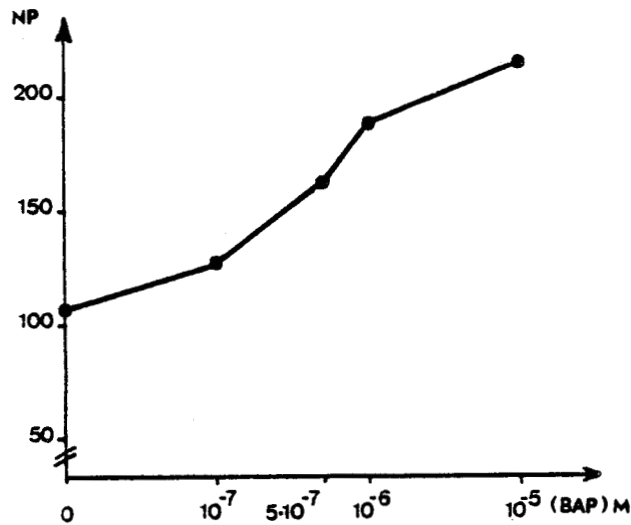


Fig. III.5 : Influence de la BAP sur la multiplication de protocormes de Cymbidium exprimée en nombre de protocormes néoformés par flacon après 35 jours de culture (inoculum : 30 explantats par flacon).

b) Influence de la BAP sur la différenciation des plantules.
.....

Des protocormes sont cultivés sur milieu gélosé ou en milieu liquide agité en présence de différentes concentrations de BAP à raison de 30 explantats par flacon (PFI = 0,025 g par explantat). Après 90 jours de culture, le poids de matière fraîche, le pourcentage de survivants, le nombre de pousses feuillées et le nombre de racines sont déterminés.

b.1 Culture sur milieu gélosé.

La BAP retarde la différenciation des plantules, ce retard est d'autant plus important que la concentration en BAP est élevée, le développement étant totalement inhibé à 10^{-5} M par suite de la toxicité de la BAP à cette concentration. Parallèlement, on constate une diminution du taux de survivants et du poids de matière fraîche en fin de culture (Table III.3).

BAP	PF	%S	NP	NR
0	9,4	96	99	62
10^{-8}	7,3	87	82	46
10^{-7}	7,6	89	75	47
5.10^{-7}	3,5	71	19	5
10^{-6}	3,3	72	20	9
5.10^{-6}	3,2	61	5	0
10^{-5}	0	0	0	0

Table III.3 : Influence de la concentration en BAP (en M/l) sur le poids de matière fraîche en grammes (PF), le pourcentage d'explantats survivants (%S), le nombre de pousses feuillées (NP) et le nombre de racines (NR) après 90 jours de culture sur milieu gélosé (inoculum : 30 explantats par flacon).

b.2 Culture en milieu liquide agité.

En milieu liquide agité, les effets de la BAP sur la différenciation sont similaires à ceux observés sur milieu gélosé (Table III.4).

BAP	PF	%S	NP	NR
0	17,5	97	24	5
10^{-8}	17,5	100	30	7
10^{-7}	12,9	99	13	0
5.10^{-7}	12,3	98	13	0
10^{-6}	11,0	96	7	0
5.10^{-6}	5,0	22	0	0
10^{-5}	2,1	3	0	0

Table III.4 : Influence de la concentration en BAP (M/l) sur le poids de matière fraîche en grammes (PF), le pourcentage d'explantats survivants (%S), le nombre de pousses feuillées (NP) et le nombre de racines (NR) après 90 jours de culture en milieu liquide agité (inoculum : 30 explantats par flacon).

b.3 Influence de la BAP en préculture sur la différenciation des plantules.

Des protocormes ont été cultivés en présence de différentes concentrations de BAP en milieu liquide agité. Après 35 jours de culture, 5 amas de protocormes sont prélevés aseptiquement par condition et repiqués sur un milieu de culture gélosé additionné de charbon pulvérulent. 90 jours après ce repiquage, le nombre de plantules et la taille de la plus longue feuille de chacune d'elles sont déterminés (Fig. III.6).

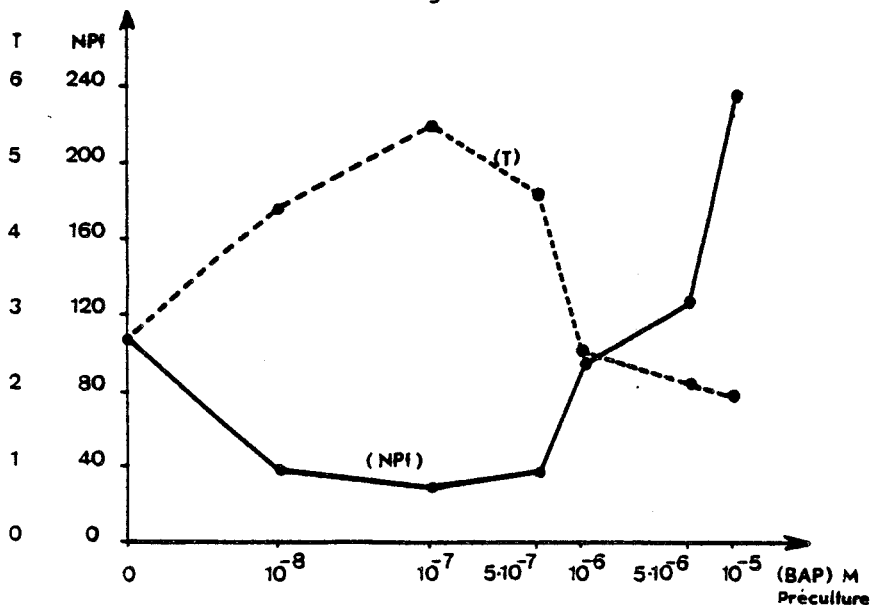


Fig. III.6 : Influence de la concentration en BAP du milieu de multiplication (BAP préculture) sur la différenciation: nombre de pousses feuillées (NPI) et taille des pousses (T) en cm de 5 amas de protocormes cultivés en absence de BAP pendant 90 jours.

On constate que les faibles concentrations de BAP (10^{-8} , 10^{-7} et $5 \cdot 10^{-7}$) présentes dans le milieu de multiplication ne permettent le développement que d'un nombre restreint de plantules qui croissent rapidement alors que les concentrations élevées ($5 \cdot 10^{-6}$ et 10^{-5}) favorisent l'apparition d'un nombre très important de points végétatifs qui ont donné naissance à

de nombreuses plantules à croissance lente.

3) Conclusion.

Il est évident que les protocormes synthétisent une substance capable de stimuler la croissance, cette substance migrant dans le milieu de culture. La croissance des protocormes est optimale lorsque 40 explantats sont placés sur 100 ml de milieu soit environ 125 ml de milieu par gramme d'explantat.

Il est à remarquer que le même phénomène est présenté par les cultures de cellules isolées qui nécessitent une quantité minimale d'inoculum pour croître.

Il serait donc intéressant d'isoler cette substance qui pourrait être d'un emploi fort utile pour la multiplication végétative du *Cymbidium*.

Par contre, l'emploi de la benzylaminopurine n'a pas donné les résultats attendus. Bien que celle ci se révèle être bénéfique à la formation d'un nombre important de plantules en un minimum de repiquages (nous avons obtenu 240 plantes en deux repiquages à partir de 5 explantats soit un peu plus d'un protocorme pour initier la culture), la BAP se révèle rapidement toxique. Compte tenu des délais nécessaires à la floraison des plantes, il n'a pas encore été possible d'observer la normalité des floraisons des plantes cultivées en présence de fortes concentrations de BAP.

IV) CONCLUSIONS GENERALES.

A) LE PHALAEOPSIS.

Chez le Phalaenopsis, l'unique méthode de multiplication végétative in vitro réellement maîtrisée est la culture de fragments de hampes florales munis d'un bourgeon latéral. Depuis la découverte de cette technique par ROTOR en 1949, les procédés de stérilisation des explantats ont été améliorés (SAGAWA, 1962; INTUWONG, KUNISAKI et SAGAWA, 1972) mais aussi nous connaissons les conditions extrinsèques et intrinsèques du milieu de culture prépondérantes, que sont la température et la concentration en benzylaminopurine (KOCH, 1974 a; TANAKA et SAKANISHI, 1978).

Cependant comme les bourgeons latéraux se développent en formant généralement une seule plantule, ce mode de propagation végétative reste limité au nombre de bourgeons latéraux dont dispose l'expérimentateur bien que quelques auteurs aient signalé la formation de protocormes (TSE, SMITH et HACKETT, 1970, KOCH, 1974 a; PIEPER et ZIMMER, 1977, 1978, 1979) mais les fréquences d'apparition des protocormes semblent assez aléatoires.

Notre but était donc d'essayer de mettre au point une technique de multiplication dont les rendements seraient supérieurs à ceux obtenus par la culture de fragments de hampes florales tout en conservant une bonne fiabilité, mais aussi de s'affranchir du matériel végétal primaire pour ne plus être tributaire du petit nombre de bourgeons latéraux disponibles car il ne faut pas oublier que le prélèvement des fragments de hampes florales supprime la possibilité de commercialiser les plantes donneuses.

Nous avons donc utilisé comme matériel végétal primaire, des pousses feuillées obtenues par culture de fragments de hampes florales ou de bourgeons latéraux excisés. Les pousses

feuillées ont été ensuite multipliées végétativement in vitro par les techniques que nous avons mises au point sur des plantules de semis car nous ne disposions pas d'un stock de matériel végétal végétatif suffisamment important.

Nous avons remarqué que certaines cytokinines : la benzylaminopurine, la benzyl-tétrahydropranyl-adénine et dans une moindre mesure l'isopentényladénine, provoquent, lorsqu'elles sont additionnées au milieu de culture à des concentrations voisines de 5.10^{-6} M/l, le développement des méristèmes axillaires des pousses feuillées mises en culture.

Les méristèmes axillaires se développent en nouvelles pousses feuillées (plantules filles) qui, isolées et repiquées sur le même milieu additionné de BAP, développent à leur tour des bourgeons. Les plantules mères démunies de leurs bourgeons peuvent aussi à nouveau être utilisées comme explantats primaires.

Nous avons donc cherché à déterminer les conditions de culture optimales pour la formation de bourgeons. Ainsi l'association d'une faible quantité d'auxine (10^{-8} M/l d'AIA ou 10^{-7} M/l d'ANA) à la BAP en concentration optimale (5.10^{-6} M/l), stimule le bourgeonnement.

L'acide trans-cinnamique, la benzoyladénine, la diphenylurée et l'éthylène associés à la BAP n'ont pas d'action sur le bourgeonnement ou sont toxiques.

L'association d'une autre cytokinine (PBA ou IPA) à la BAP ne favorise le bourgeonnement que si la BAP est elle même à une concentration inférieure à l'optimum quand elle est employée seule. Par contre, si la concentration en BAP est optimale, l'addition d'IPA ou de PBA lève partiellement l'inhibition de la rhizogénèse mais diminue le nombre de bourgeons.

Des résultats sensiblement équivalents sont obtenus par association d'adénine à la BAP. A faible dose (jusqu'à 20 mg/l), l'adénine a une action synergique sur le bourgeonnement tandis qu'au delà, elle lève l'inhibition de la rhizogénèse mais n'inhibe que partiellement le bourgeonnement. Ainsi les

explantats cultivés en présence de 100 mg/l d'adénine et de 5.10^{-6} M/l de BAP présentent un nombre de racines sensiblement équivalent à ceux cultivés en absence de cytokinine, mais il y a quand même formation de bourgeons (Table 4).

Conditions	Bourgeonnement	Enracinement
- témoin	0	+++
- BAP 5.10^{-6} M/l	++	0/+
- BAP 5.10^{-6} M/l adénine 20 mg/l	+++	0/+
- BAP 5.10^{-6} M/l adénine 100 mg/l	+	++

Table 4 : Influence de la BAP et de l'adénine sur le bourgeonnement et l'enracinement de fragments de tige.

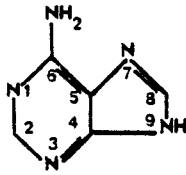
L'adénine entre donc en compétition avec la BAP et à forte dose annule l'action de la BAP sur la rhizogénèse et réduit ses effets sur le bourgeonnement.

Parmi les molécules à noyau adénine que nous avons introduit dans le milieu de culture, 4 d'entre elles ont une action positive sur le bourgeonnement : ce sont la benzylaminopurine, la benzyl-tétrahydropyranil-adénine, l'isopentényladénine et l'adénine et deux n'ont pas d'action : la kinétine et la benzoyladénine (Fig. 7).

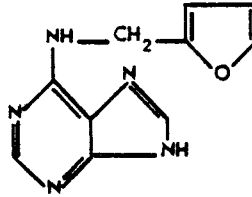
Le bourgeonnement des pousses feuillées est également sous la dépendance du génotype comme l'ont également montré URATA et IWANAGA (1965) et ZIMMER et PIEPER (1978) sur le développement des bourgeons latéraux de hampes florales.

Les pousses feuillées réagissent également à la densité de population. Nous avons remarqué que lorsque les pousses feuillées sont cultivées en flacons, l'augmentation du nombre de pousses feuillées par fiole de culture favorise la croissance et le bourgeonnement des explantats mais apparaissent parallèlement certaines difficultés de culture dues à l'augmentation

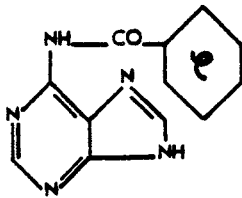
adénine



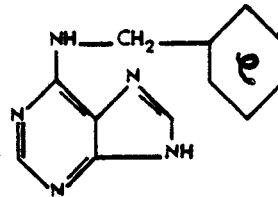
N⁶ furfuryladénine (kinétine)



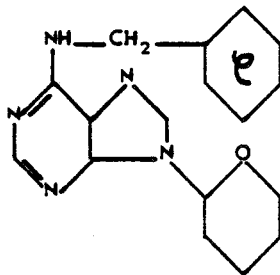
benzoyladénine



N⁶ benzyladénine



benzyl-9-(2-tétrahydropyranyl)-adénine



isopentényladénine

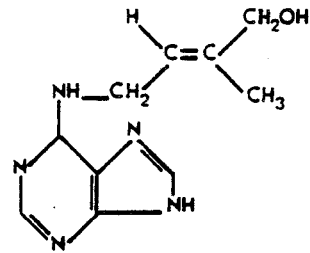


Fig. 7 : Configurations planes de cytokinines et apparentés.

de la concentration dans le milieu de culture, de substances toxiques synthétisées par les pousses feuillées que sont les polyphénols mais ces difficultés pourraient être surmontées par des repiquages fréquents.

Comme l'ont montré TANAKA et SAKANISHI (1978) sur le développement des bourgeons latéraux de hampes florales, le développement végétatif des méristèmes axillaires est favorisé par des températures élevées. La lumière est également un facteur qui contrôle le comportement des pousses feuillées, ainsi des photopériodes longues et de faibles intensités favorisent le bourgeonnement. Il est d'ailleurs à remarquer que les conditions favorables au développement végétatif *in vitro* sont également favorables à la croissance végétative des plantes cultivées en serre.

Enfin, pour le bourgeonnement et la croissance des pousses feuillées, le pH optimum du milieu de culture est de 5,6 après stérilisation.

La composition du milieu de culture modifie le comportement des explantats. Si le sucre utilisé est du saccharose, la concentration optimale pour le bourgeonnement est de 10 g/l et 20 g/l s'il s'agit de glucose. Bien que stimulant la croissance, l'inositol ne semble pas nécessaire au développement des méristèmes axillaires. Enfin certains composés organiques complexes tels que la banane verte, la peptone, la tryptone et l'hydrolysate de caséine favorisent la croissance et le bourgeonnement des pousses feuillées.

Nous avons aussi étudié l'influence de la composition minérale du milieu de culture. Après comparaison avec d'autres solutions de microéléments, nous avons retenu la formulation de LESCURE (1969). Nous avons également constaté que les concentrations en fer chélaté par l'EDTA telles qu'elles sont préconisées par MURASHIGE et SKOOG (1962) sont inadaptées à la culture *in vitro* du Phalaenopsis. D'une part, la concentration en fer est par elle-même légèrement trop importante, mais

surtout l'EDTA se révèle rapidement toxique. Nous préconisons donc d'utiliser la solution de fer de MURASHIGE et SKOOG diluée au quart.

Alors que les éléments minéraux tels que le calcium et le magnésium ont peu d'influence sur le bourgeonnement, l'augmentation de la teneur en phosphore et en potassium et la diminution de la teneur en azote ammoniacal par rapport au milieu de FONNESBECH (1972 a) que nous avons utilisé comme milieu de base, provoquent plusieurs phénomènes:

- le bourgeonnement est fortement stimulé;
- la croissance des bourgeons est réduite;
- mais surtout l'utilisation de concentrations élevées en phosphore et en potassium entraîne l'apparition de bourgeons surnuméraires de petite taille ne provenant pas du développement des méristèmes axillaires.

Ces observations nous ont semblé de prime abord extrêmement intéressantes. En effet lors d'essais précédents, nous avons obtenus la néoformation de protocormes par culture de bourgeons isolés de petite taille. La petite taille et donc la juvénilité des bourgeons sont indispensables à la régénération des protocormes, également favorisée par l'effet de masse.

Or lorsque les bourgeons obtenus par culture de pousses feuillées sur le milieu de base enrichi en P et K, sont repiqués dans les conditions optimales à la néoformation de protocormes, nous n'avons observé pratiquement aucun développement.

L'augmentation de la teneur en P et K du milieu, bien que favorisant la formation d'un grand nombre de bourgeons inhibe leur développement. Seule la présence dans le milieu de culture de banane verte et de charbon actif a permis de lever cette inhibition, mais dans ce cas le bourgeonnement des explantats et le nombre des explantats présentant une néoformation de protocormes sont faibles.

Le phénomène d'inhibition de la croissance après un passage sur un milieu à fortes teneurs en phosphore a été également constaté lorsque les explantats sont des pousses feuillées (plantules mères), des plantules filles ou des

protocormes.

Nous avons également étudié l'action de certaines substances sur la prolifération de clones de protocormes de Phalaenopsis obtenus par culture de bourgeons. Ainsi l'addition de BAP à raison de 10^{-7} M/l favorise la multiplication des protocormes et retarde la différenciation des plantules mais un passage sur un milieu à forte teneur en P et K a provoqué la dégénérescence des clones puis leur perte.

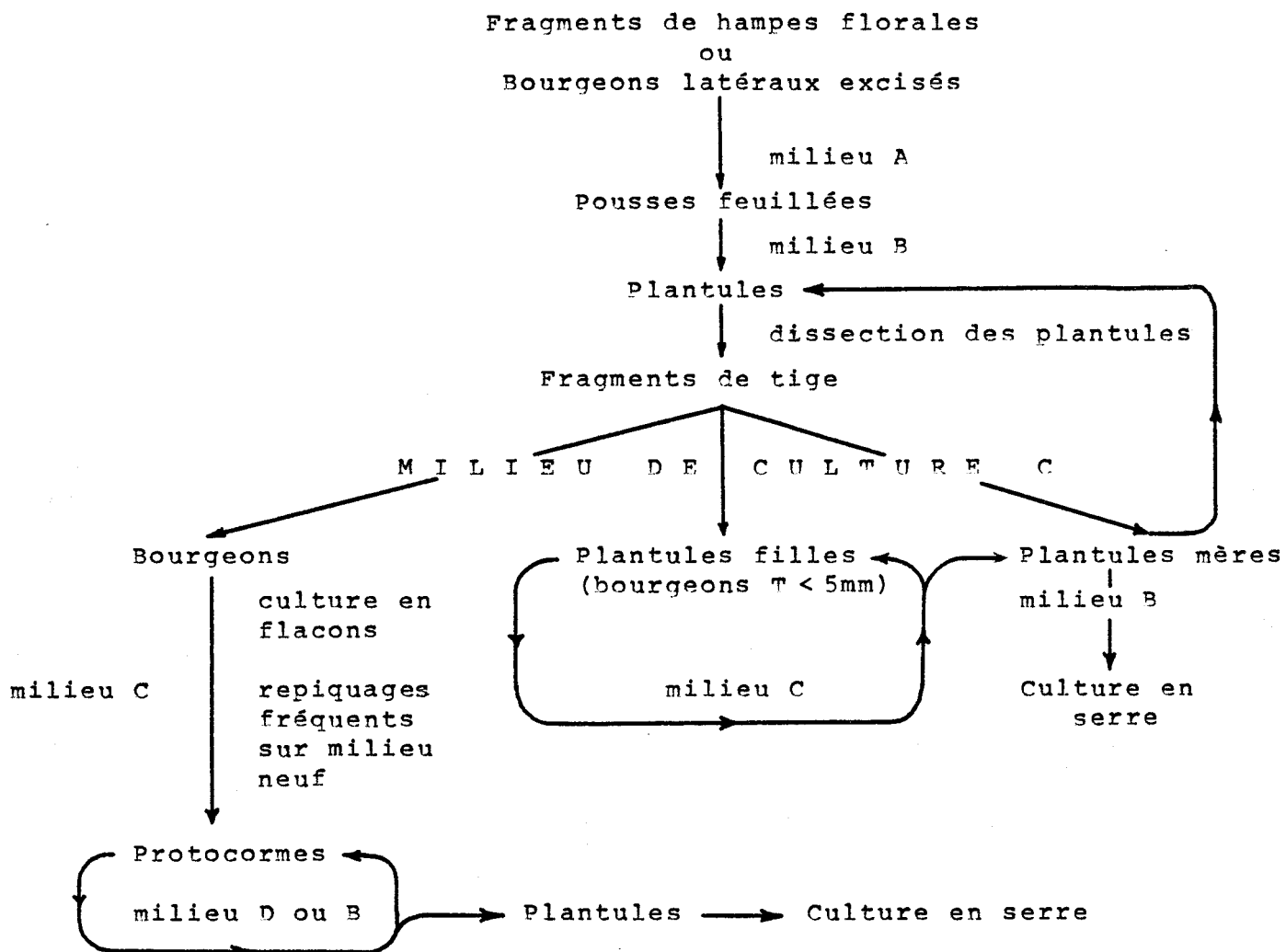
Nous avons par la suite cherché à appliquer nos résultats aux plantules végétatives obtenues par culture de fragments de hampes florales. Le bourgeonnement des pousses feuillées a été observé mais avec des résultats forts différents selon les cultivars.

Quelques réserves et remarques doivent être émises quant à l'application des techniques précédentes sur un matériel obtenu par voie végétative :

- les plantules obtenues par culture de fragments de hampes sont physiologiquement différentes des plantules de semis même à taille égale. En effet, nous avons constaté, sans toutefois avoir pu le démontrer que les plantules issues de bourgeons latéraux ont un comportement "plus agé" que les plantules de semis et à stade morphologique égal, leur état de juvénilité est différent. Ainsi des plantules issues de bourgeons latéraux sont capables de fleurir en 1 an, alors que les plantules de semis nécessitent 2 1/2 ans à 3 ans de culture pour fleurir.
- les pousses feuillées obtenues par culture de fragments de hampes florales ne peuvent entrer immédiatement dans le cycle de multiplication tel que nous l'avons décrit, mais doivent être préalablement cultivées sur un milieu additionné de charbon comme s'il fallait effacer la "mémoire" des cultures antérieures pour leur obtention en présence de BAP.

- Des passages successifs sur un milieu favorisant le bourgeonnement et l'utilisation des plantules filles permettent de rajeunir les pousses feuillées ce qui améliore leurs capacités de réponse à la présence de BAP dans le milieu de culture en formant soit des bourgeons, soit des protocormes, puisque nous avons vu que seuls des explantats juvéniles sont capables de régénérer des protocormes.
- Mais par suite d'un incident technique, il nous a été impossible de poursuivre sur les plantules issues de bourgeons latéraux, le cycle de multiplication tel qu'il a été décrit avec les plantules de semis.

Nous proposons donc le schéma de multiplication suivant :



milieu A : milieu de base additionné de 2 mg/l de BAP

milieu B : milieu de base additionné de 75 g/l de banane verte
+ 2 g/l de charbon actif

milieu C :

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	400 mg/l	ou	400 mg/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	300 "		300 "
KH_2PO_4	418 "		750 "
K_2HPO_4	212 "		0 "
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250 "		250 "

microéléments de LESCURE (1969)

fer de MURASHIGE et SKOOG (1962) dilué au 1/4

vitamines de KOCH (1974 a)

inositol 50 mg/l

adénine 20 mg/l

peptone 500 mg/l

tryptone 500 mg/l

saccharose 5 g/l

glucose 10 g/l

BAP $5 \cdot 10^{-6}$ M/l

AIA 10^{-8} M/l

agar-agar 8,5 g/l

milieu D : milieu de base + BAP 10^{-7} M/l

+ peptone 500 mg/l

+ tryptone 500 mg/l

Conditions de culture : t° : 25 à 28°

lumière : photopériode 16/8

intensité : 500 Lux

spectre : type Sylvania Gro Lux

La multiplication végétative du *Phalaenopsis* in vivo est réalisée par application de BAP sous forme de pâte à la lanoline sur les bourgeons latéraux de hampes florales qui dans certains cas se développent en pousses feuillées.

Bien que nos résultats soient très fragmentaires, il semble que les conditions de température élevée alliée à une photopériode longue favorisent le développement végétatif des bourgeons latéraux mais en outre, le type de développement est sous l'influence du génotype de la plante traitée et de la position du bourgeon sur la hampe.

B) LE PAPHIOPEDILUM.

Le bourgeonnement de fragments de tige obtenus par dissection de plantules de semis de Paphiopedilum a été observé dans les mêmes conditions de culture qu'avec le Phalaenopsis.

Toutefois, il demeure la difficulté essentielle de l'obtention du matériel végétal primaire, nos essais de culture de méristèmes prélevés sur des plantes connues ayant échoué.

L'application de BAP sous forme de pâte à la lanoline provoque également le développement des méristèmes axillaires de plantes cultivées en serre.

C) LE CYMBIDIUM.

L'effet de masse présenté par des cultures de protocormes de *Cymbidium* serait dû à la synthèse par les protocormes d'une substance stimulante qui migre dans le milieu de culture.

L'effet optimum de la densité de population est observé quand 40 explantats sont repiqués, soit environ 1 g de matière fraîche pour 100 ml de milieu de culture.

L'addition de BAP au milieu de culture favorise l'augmentation du nombre de protocormes par culture mais inhibe légèrement l'accroissement pondéral des cultures et réduit fortement le poids de chaque protocorme. La BAP retarde également la différenciation des plantules.

B I B L I O G R A P H I E

ALLENBERG, H., 1976.

Notizen zur Keimung, Meristem-kultur und Regeneration von Erdorchideen.

Die Orchidee, 27, 28-31.

Anonyme. 1885.

Buds out of place.

Garden 's chronicle, Ser. 2, 25, 249.

ARDITTI, J., 1976.

Klonale Vermehrung von Phalaenopsis durch Kultivierung von Blütenstammnodien.

Die Orchidee, 27, 212-217.

ARDITTI, J., 1977.

Orchid Biology : reviews and perspectives.

Cornell University Press, Ithaca, New York.

ARDITTI, J., BALL, E.A., REISINGER, D.M., 1975.

Cultivo de yemas del escapo floral : un metodo para la propagacion vegetative de Phalaenopsis.

Orquidea (Mexico), 5, 242-254.

X ARDITTI, J., BALL, E.A., REISINGER, D.M., 1977.

Culture of flower stalk buds. A method for vegetative propagation of Phalaenopsis.

Amer. Orchid Soc. Bull., March 1977, 236-240.

ARDITTI, J., MOSICH, S.K., BALL, E.A., 1973.

Dendrobium node cultures : a new means of clonal propagation.

Austr. Orchid Rev., 38, 175-179.

BALL, E.A., ARDITTI, J., 1976.

Node cultures as a means of clonal propagation for Dendrobium.

Proc. 8th World Orchid Conf., 1975.

BERTSCH, W., 1967.

A new frontier : orchid propagation by meristem culture.

Amer. Orchid Soc. Bull., 36, 32-37.

BLOWERS, J.W., 1964.

Meristem propagation and possible effects.

Orchid Rev., 72, 407-408.

A BOURIQUET, R., BROLY, H., LEGRAND, B., 1981.

Clonal propagation of Phalaenopsis (Orchidaceae) by in vitro culture.

In press.

BRAY, M., THORPE, G., 1954.

Analysis of phenolic compounds of interest in metabolism.

In : Glick, D., Ed., Methods of biochemical analysis.

Vol. 1, 27-57. Interscience Publ., New York.

CAHUZAC, Y., 1979.

Multiplication végétative du Phalaenopsis.

Mém. Inst. Sup. Ind. de l'Etat, Gembloux, Belgique.

K CAPESIUS, I., MEYER, Y., 1977.

Isolation of nuclei from protoplasts of orchids.

Cytobiologie, 15(3), 485-490.

CARPENTER, W.J., RODRIGUEZ, R.C., CARLSON, W.H., 1971.

Growth regulator induced branching on non pinched poinsettias.

Hortscience, 6, 457-458.

γ CHAMPAGNAT, M., 1971.

Recherches sur la multiplication végétative de Neottia nidus avis Rich.

Ann. Sci. Nat., Bot. et Biol. Vég., Ser. 12, 12, 209-247.

CHAMPAGNAT, M., MOREL, G., 1969.

Multiplication végétative des Cattleya à partir des bourgeons cultivés in vitro.

Soc. Bot. Fr., Mémoire 116, 111-132.

CHAMPAGNAT, M., MOREL, G., 1972.

La culture in vitro des tubercules d'Ophrys.

C.R. Acad. Sci. Paris, 274, 3379-3380.

CHAMPAGNAT, M., MOREL, G., MOUNETOU, B., 1970.

La multiplication végétative des Cattleya à partir de jeunes feuilles cultivées aseptiquement in vitro.

Ann. Sci. Nat., Bot. et Biol. Vég., Ser. 12, 11, 97-117.

CHEAH, K.T., SAGAWA, Y., 1978.

In vitro propagation of Aranda Wendy Scott and Aranthera James Storei.

Hortscience, 13(6), 661-662.

- CHURCHILL, M.E., ARDITTI, J., BALL, E.A., 1971.
Clonal propagation of orchids from leaf tips.
Amer. Orchid Soc. Bull., 40, 109-113.
- CHURCHILL, M.E., ARDITTI, J., BALL, E.A., 1971.
Clonal propagation of orchids from leaf tips.
Die Orchidee, 22, 147-151.
- CHURCHILL, M.E., ARDITTI, J., BALL, E.A., 1972.
Propagacao clonal de orquideas de apices de folha.
Boll. Soc. Campineira de Orchideas, 2, 23-28.
- CHURCHILL, M.E., ARDITTI, J., BALL, E.A., 1973.
Tissue culture of orchids. I : methods for leaf tips.
New phytol., 72, 161-166.
- CHURCHILL, M.E., BALL, E.A., ARDITTI, J., 1970.
Production of orchid plants from seedlings leaf tips.
Orchid Digest, 271-273.
- CHURCHILL, M.E., BALL, E.A., ARDITTI, J., 1972.
Tissue culture of orchids. II : methods for root tips.
Amer. Orchid Soc. Bull., 41, 726-730.
- CHURCHILL, M.E., FLICK, B.H., BALL, E.A., ARDITTI, J., 1973.
Kultur von Orchidengewebe. II : Methode für Wurzelspitzen.
Die Orchidee, 24, 98-101.
- DALLA ROSA, M., LANERI, U., 1977.
Modification of nutrient solutions for germination and
growth in vitro of some cultivated orchids and for the
vegetative propagation of Cymbidium cultivars.
Amer. Orchid Soc. Bull., 46, 813-820.
- DE BRUIJNE, E., DEBERGHE, P., 1974.
Response of Cymbidium protocorms to major element deficiency
in a culture medium.
Med. Fac. Landbouwwet., Rijksuniv. Gent, 39(1), 210-215.
- DE VRIES, J.T., 1953.
On the flowering of Phalaenopsis schilleriana Rchb. f.
Annales Bogoriensis, 1(2), 61-76.
- ERNST, R., 1976.
Charcoal or glasswool in asymbiotic culture of orchids.
Proc. 8th World Orchid Conf., Frankfurt 1975, 379-383.

FAST, G., 1973.

Die Vermehrung von Oncidium papilio durch Trichspitzen Kultur and Besperchung einiger Nährmedien.
Die Orchidee, 24, 240-246.

FLAMEE, M., BOESMAN, G., 1977.

Clonal propagation of Phalaenopsis hybrids by means of section of the flower stalk.
Med. Fac. Landbouwwet., Rijksuniv. Gent, 42, 1865-1868.

FOLIN, O., CIOCALTEUS, U., 1927.

On tyrosine and tryptophan determination in protein.
J. Biol. Chem., 73, 622-650.

✓ FONNESBECH, M., 1972 a.

Growth hormones and propagation of Cymbidium in vitro.
Physiol. Plant., 27, 310-316.

✕ FONNESBECH, M., 1972 b.

Organic nutrient in the media for propagation of Cymbidium in vitro.
Physiol. Plant., 27, 360-364.

FRESON, R., 1969.

Action du glucose sur des protocormes de Cymbidium cultivés in vitro.
Bull. Soc. Roy. Bot. Belgique, 102, 181.

- FU FAN, M.L., 1978.

Clonal propagation of Aranda, Ascocenda and Cattleya by leaf tissue culture.
Garden 's bulletin, Singapore XXXI, 132-138.

✓ FU FAN, M.L., 1979.

Studies on the tissue culture of orchids. 2 : Clonal propagation of Aranda, Ascocenda and Cattleya by leaf tissue culture.
Orchid Rev., 87(1037), 343-346.

✓ GOH, C.J., 1970.

Tissue culture of Vanda Miss Joaquim.
J. Singapore Nat. Acad. Sci., 2, 31-33.

GOH, C.J., 1973.

Meristem culture of Aranda Deborah.
Malayan Orchid Rev., 11, 10-14.

- GOH, C.J., 1975.
Clonal propagation of Aranda Deborah, a monopodial orchid hybrid.
Amer. Orchid Soc. Bull., 44, 212-215.
- GOH, C.J., LOH, C.S., RAO, A.N., 1975
Clonal propagation of Aranda hybrids through shoot meristem culture.
Communication personnelle.
- HELLER, R., 1953.
Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés in vitro.
Ann. Sci. Nat., Bot. et Biol. Vég., 14, 1-223.
- HELLER, R., 1965.
Some aspects of the inorganic nutrition of plant tissue cultures.
In : Proc. Intern. Conf. Plant Tissue Culture
P.R. White and A.R. Grove Ed., Mc Cutchan, Berkeley.
- HOMES, J., FRESON, R., VERMYLEN, M., 1973.
Développement de protocormes d'orchidées cultivés in vitro en conditions anoxiques.
Bull. Soc. Roy. Bot. Belgique, 106, 123-129.
- HOMES, J., VAN SEVEREN, N., 1972.
Structure des plastes de protocormes d'orchidées cultivés in vitro à diverses concentrations de saccharose.
J. Microscopie, 14, 155 a.
- HOMES, J., VAN SEVEREN, N., 1973 a.
Effets du saccharose et de la lumière sur le développement et la morphologie de protocormes d'orchidées cultivés in vitro.
Bull. Soc. Roy. Bot. Belgique, 106, 99-106.
- HOMES, J., VAN SEVEREN, N., 1973 b.
Quelques formes de plastes induites par le milieu de culture dans des protocormes d'orchidées cultivés in vitro.
Bull. Soc. Roy. Bot. Belgique, 106, 117-121.

HORICH, C., 1966.

Orchideen - Hexeneinmaleins.

(Etwas über vegetative Vermehrung).

Die Orchidee, 17, 216-220.

ICHIHASHI, S., KAKO, S., 1973.

Studies on the clonal propagation of Cattleya through meristem culture methods : I : Factors affecting survival and growth of shoot meristem of Cattleya in vitro.

J. Jap. Soc. Hort. Sci., 42, 364-370.

ICHIHASHI, S., KAKO, S., 1977.

Studies on clonal propagation of Cattleya through meristem culture methods : II : Browning of Cattleya.

J. Jap. Soc. Hort. Sci., 46(3), 325-330.

INTUWONG, J., KUNISAKI, J., SAGAWA, Y., 1972.

Vegetative propagation of Phalaenopsis by flower stem cuttings.

Na Okika O Hawai - Hawai Orchid J., 1, 13-18.

INTUWONG, O., SAGAWA, Y., 1973.

Clonal propagation of Sarcanthine orchids by aseptic culture of inflorescence.

Amer. Orchid Soc. Bull., 42, 209-215.

INTUWONG, O., SAGAWA, Y., 1974 a.

Plantlet formation in Phalaenopsis.

Na Okika O Hawai - Hawai Orchid J., 3, 17-19.

INTUWONG, O., SAGAWA, Y., 1974 b.

Clonal propagation of Phalaenopsis by shoot tip culture.

Amer. Orchid Soc. Bull., 43, 893-895.

INTUWONG, O., SAGAWA, Y., 1975.

Clonal propagation of Dendrobium Golden Wave and other nobile types.

Amer. Orchid Soc. Bull., 44, 319-322.

JIN, G.C., SHIONG, L.C., RAO, A.N., 1976.

Clonal propagation of Aranda hybrids through shoot meristem culture.

Communication personnelle.

KAKO, S., 1973.

Clonal propagation of Cattleya through shoot meristem culture.

Jap. Agric. Res. Quart., 7, 109-115.

- KANO, K., 1965.
Studies on the media for orchid seed germination.
Mem. Fac. Agric. Kagawa Univ., N° 20.
- KIM, K.K., KUNISAKI, J.T., SAGAWA, Y., 1970.
Shoot tip culture of Dendrobium.
Amer. Orchid Soc. Bull., 39, 1077.
- KNUDSON, L., 1946.
A new nutrient solution for germination of orchid seeds.
Amer. Orchid Soc. Bull., 15, 214-217.
- * KOCH, L., 1973.
Vergleich zweier Verfahren zur Vermehrung von Cymbidium
Protokormen.
Gartenbauwissenschaft, 38, 419-426.
- KOCH, L. 1974 a.
Untersuchungen zur vegetativen Vermehrung bei Phalaenopsis.
Dissertation Univ. Tech. Hannover, 1-169.
- KOCH, L., 1974 b.
Erbgleiche Vermehrung von Phalaenopsis in vitro.
Gartenwelt, 74, 482-484.
- KOCH, L., 1974 c.
Ein neues Verfahren der Protokorm Vermehrung bei Cymbidium.
Die Orchidee, 25, 22-24.
- KOCH, L., SCHULTZ, D., 1975.
Über Samen und Samenkeimung der Phalaenopsis Heideperle.
Die Orchidee, 26, 27-30.
- KOTOMORI, S., MURASHIGE, T., 1965.
Some aspect of aseptic propagation of orchids.
Amer. Orchid Soc. Bull., 34, 484-489.
- KUKULCZANKA, K., JASTRZEBSKA-KOŁODYNSKA, A., 1976.
Wpływ mikroelementów i magnezu na polzatkowe fazy
roswojowe storczyków (Cymbidium Sw) w kulturze in vitro.
Prace Instytutu Sadownictwa, Ser. B, T.2, 77-86.
- * KUKULCZANKA, K., PALUCH, B., 1971.
Zastosowanie peptonu Peptobak-Bacutil w hodowli merystema-
tycznej tkanki Cymbidium Sw.
Acta Agrobotanica, 24(1), 53-62.

* KUKULCZANKA, K., PALUCH, B., WOZAKOWSKA, H., 1975.

The effect of casein hydrolysate on the growth of meristematic tissue of Cymbidium in vitro culture. Prace Instytutu Sadownictwa, Ser. B, T.1, 63-70.

* KUSUMOTO, M., 1978.

Effects of combinations of growth regulating substances and of organic matter on the propagation and organogenesis of Cymbidium protocorms cultured in vitro. J. Jap. Soc. Hort. Sci., 47(3), 391-400.

KUSUMOTO, M., 1979.

Effects of combinations of growth regulators and of organic supplements on the proliferation and organogenesis of Cattleya PLB cultured in vitro. J. Jap. Soc. Hort. Sci., 47(4), 502-510.

* KUSUMOTO, M., 1980 a.

Effects of coconut milk, agar and sucrose concentrations and media pH on the proliferation of Cymbidium PLB cultured in vitro. J. Jap. Soc. Hort. Sci., 48(4), 503-509.

* KUSUMOTO, M., 1980 b.

Interform variation of the proliferation, organogenesis and effects of growth regulating substances on Cymbidium protocorms cultured in vitro. J. Jap. Soc. Hort. Sci., 48(4), 510-518.

* KUSUMOTO, M., 1981 a.

Studies on the tissue culture of orchids. 1 : Effects of additional fertilisation of culture solution and growth regulating substances on the growth of Cymbidium plantlets cultured in vitro. Bull. Coll. Agr. & Vet. Med., Nihon Univ., 38, 108-117.

KUSUMOTO, M., 1981 b.

Studies on the tissue culture of orchids. 2 : The primary culture of Epidendrum, Epiphronitis and Miltonia and proliferation, propagation and organogenesis of the formed PLB. Bull. Coll. Agr. & Vet. Med., Nihon Univ., 39, 118-124.

- X KUSUMOTO, M., FURUKAWA, J., 1977.
Effect of organic matter on the growth of Cymbidium
protocorms cultured in vitro.
J.Jap. Soc. Hort. Sci., 45(4), 421-426.
- LEGRAND, B., 1977.
Action de la lumière sur les peroxydases et la teneur
en composés phénoliques de tissus de feuilles de Cichorium
intybus L. cultivés in vitro.
Biologia Plantarum (Prana), 19(1), 27-33.
- LESCURE, A.M., 1969.
Mutagénèse et sélection des cellules d'Acer pseudoplatanus L.
cultivées in vitro.
Physiol. Vég., 7, 237-250.
- LINDEMANN, E.G.P., GUNCKEL, J.E., DAVIDSON, O.W., 1970.
Meristem culture of Cattleya.
Amer. Orchid Soc. Bull., 39, 1002-1004.
- LOAËC, M.H., BIGOT, C., 1976.
Séparation et culture in vitro de cellules de parenchyme
foliaire de Paphiopedilum.
Communication personnelle.
- LOH, C.S., RAO, A.N., GOH, C.J., 1975.
Clonal propagation from leaves in the orchid Aranda.
J. Singapore Nat. Acad. Sci., 4(3), 97-99.
- X MATSUI, T., KAWAI, K., SAMATA, Y., 1970.
Effects of N⁶ benzylaminopurine and naphthalene acetic acid
on the organogenesis of Cymbidium.
Bull. Fac. Agric., Tamagawa Univ., 10, 99-106.
- MITRA, G.C., 1971.
Studies on seeds, shoot tips and stem disc of an orchid
grown in asptic culture.
Indian J. Exp. Biol., 9, 79-85.
- MOREL, G., 1960.
Producing virus free Cymbidium.
Amer. Orchid Soc. Bull., 29, 495-497.
- MOREL, G., 1963.
La culture in vitro du méristème apical de certaines orchidées.
C.H. Acad. Sci. Paris, 256, 4955.

- MOREL, G., 1964 a.
La culture in vitro du méristème apical.
Rev. Cytol. Biol. Veg., 27, 304-314.
- MOREL, G., 1964 b.
Tissue culture : a new means of clonal propagation
of orchids.
Amer. Orchid Soc. Bull., 34, 473-478.
- MOREL, G., 1965 a.
Clonal propagation of orchids by meristem culture.
Cymbidium Soc. News, 20, 3-11.
- ✓ MOREL, G., 1965 b.
Eine neue Methode erbgleicher Vermehrung.
Die Orchidee, 16, 165-167.
- MOREL, G., 1970.
Neues auf dem Gebiet der Meristem Forschung.
Die Orchidee, 16, 165-176.
- MOREL, G., 1971 a.
Les Pleiones. Culture-multiplication.
L'orchidophile, 6, 8-94.
- MOREL, G., 1971 b.
The principles of clonal propagation of orchids.
Proc. 6th World Orchid Conf., Sydney(1969), 101-106.
- MOREL, G., 1972.
Morphogenesis of stem apical meristem cultivated in
vitro : application to clonal multiplication.
Phytomorphology, Sept-Dec. 1972, 265-277.
- ✓ MOREL, G., 1974.
Clonal multiplication of orchids.
In : The Orchids : scientific studies. C.L. Withner Ed.,
Wilay Intersciences, New York. pp 169-222.
- MOSICH, S.K., BALL, E.A., ARDITTI, J., 1973.
Propagacion clonal de Dendrobium por medio del cultivo
de nodos.
Orquidea (Mexico), 3, 244-260.
- MOSICH, S.K., BALL, E.A., ARDITTI, J., 1974.
Clonal propagation of Dendrobium by means of node dulture.
Amer. Orchid Soc. Bull., 43, 1055-1061.

- MOSICH, S.K., BALL, E.A., FLICK, B.H., ARDITTI, J., 1974.
Klonvermehrung von Dendrobium durch die Kultivierung
von Stammnodien.
Die Orchidee, 25, 129-134.
- MULLER, J.F., 1979.
Méthodes modernes de multiplication des orchidées.
Journées d'Inf. sur la Multiplication in vitro.
Inst. Tech. Interprof. de l'Horticulture Ed., Dijon, 6/2/79.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F., 1962.
A revised medium for rapid growth and bioassays with
tobacco tissue cultures.
Physiol. Plant., 15, 472-497.
- NAGL, W., RUCKER, W., 1972.
Beziehungen zwischen Morphogenese und nuklearem DNS -
Gehalt bei aseptischen Kulturen von Cymbidium nach
Wachstoffsbehandlung.
Z. Für Pflanzenphysiologie, 67(2), 120-134.
- OJIMA, K., FUJIWARA, A., 1959.
Studies on the growth promoting substance of the excised
wheat roots. I : Effects of peptone on the growth.
Tohoku J. of Agric. Res., 10, 111-128.
- OJIMA, K., FUJIWARA, A., 1962.
Studies on the growth promoting substance of the excised
wheat root. III : Effects of tryptophane and some related
substances.
Tohoku J. of Agric. Res., 13, 69-98.
- PARUPS, E.V., 1971.
Use of 6-benzylaminopurine and adenine to induce bottom
breaks in greenhouse roses.
Hort Science, 6, 456-457.
- * PIEPER, W., ZIMMER, K., 1974 a.
Blutungssäfte als Zusatz zu Nährmedium für Gewebekulturen.
Gartenwelt, 74, 461-462.
- * PIEPER, W., ZIMMER, K., 1974 b.
Zur Vermehrung von Brassia aus Meristemen.
Die Orchidee, 25, 294-295.

PIEPER, W., ZIMMER, K., 1976 a.

Ein neues System für die Vermehrung von Geweben in vitro.
Gartenbauwissenschaft, 41(5), 221-224.

PIEPER, W., ZIMMER, K., 1976 b.

Clonal propagation of Phalaenopsis in vitro.
Acta Horticulturae, 64, 21-23.

PRASAD, R.N., MITRA, G.C., 1975.

Nutrients requirements for germination of seeds and
development of protocorms and seedlings of Cymbidium
in aseptic cultures.
Indian J. Exp. Biol., 13(2), 123-126.

RAGHAVAN, V., TORREY, J.G., 1964.

Inorganic nitrogen nutrition of the embryos of the
seedlings of the orchids Cattleya.
Amer. J. of Bot., 51(3), 264-274.

REINERT, R.A., MOHR, H.C., 1967.

Propagation of Cattleya by tissue culture of lateral buds
meristems.
Proc. Amer. Soc. Hort. Sci., 91, 664-671.

REISINGER, D.M., BALL, F.A., ARDITTI, J., 1976.

Clonal propagation of Phalaenopsis by means of flower
stalk node culture.
Orchid Rev., 84, 45-52.

x ROTOR, G., 1949.

A method of vegetative propagation of Phalaenopsis stem
cuttings.
Amer. Orchid Soc. Bull., 18, 738-739.

ROTOR, G., 1959.

The photoperiodic and temperature response of orchids.
In : The Orchids : a scientific survey. C.L. Withner Ed.,
Ronald Press Co., New York, pp 397-417.

RÜCKER, W., 1974.

Einfluss von Cytokinin auf Wachstum und Differenzierung
in vitro kultivierter Protokorme von Cymbidium.
Z. Pflanzenphysiol., 72, 348-351.

RÜCKER, W., 1975.

Weikung von Hydroxyharnstoff auf Entwicklung und Differenzierung in vitro kultivierter Protokorme von Cymbidium.

Z. Pflanzenphysiol., 76(3), 229-237.

SAGAWA, Y., 1961.

Vegetative propagation of Phalaenopsis stem cuttings.

Amer. Orchid Soc. Bull., 30, 808-809.

SAGAWA, Y., NIIMOTO, D., 1960.

Vegetative propagation of Phalaenopsis.

Florida Orchidist, 3, 22.

SAGAWA, Y., SEHGAL, O.P., 1967.

Aseptic stem propagation of Vanda Miss Joaquim.

Bull. Pacific Orchid Soc., 25(2).

SAGAWA, Y., SHOJI, T., 1967.

Clonal propagation of Dendrobium through shoot meristem culture.

Amer. Orchid Soc. Bull., 36, 856-860.

SAGAWA, Y., SHOJI, T., SHOJI, T., 1966.

Clonal propagation of Cymbidium through shoot meristem culture.

Amer. Orchid Soc. Bull., 35, 118-122.

SAWA, Y., 1972.

Effect of benzylaminopurine on growth of axillary bud of ornamental plants.

Abst. Autumn Meet. Jap. Soc. Hort. Sci., 232-233.

SAWA, Y., 1977.

Effect of benzylaminopurine and gibberellin on flowering of Phalaenopsis.

Abst. Spring Meet. Jap. Soc. Hort. Sci., 338-339.

SCULLY, R.M., 1965.

Stem propagation of Phalaenopsis.

Bull. Pacific Orchid Soc. Hawai, 23, 13-16.

SCULLY, R.M., 1966.

Stem propagation of Phalaenopsis.

Amer. Orchid Soc. Bull., 35, 40-52.

SCULLY, R.M., 1967.

Aspects of meristem culture in the Cattleya alliance.
Amer. Orchid Soc. Bull., 36, 103-108.

SCULLY, R.M., 1971.

Master growers ' series. February is Phalaenopsis time
in Florida.

Amer. Orchid Soc. Bull., 40, 103-108.

SHARA, L., 1938.

Propagação de Phalaenopsis por meio das velas hastas
floraes.

Orchidea (Brasil), 1, 45-46.

SHARA, L., 1952.

Vegetative propagation of Phalaenopsis.

Orchid J., 1, 372.

SINGH, H., SAGAWA, Y., 1972.

Vegetative propagation of Dendrobium by flower stalk
cuttings.

Na Okika O Hawai - Hawai Orchid J., 1, 19.

STEWART, F.C., MAPES, M.O., 1971.

Morphogenesis in aseptic cell cultures of Cymbidium.

Bot. Gaz., 132, 65-70.

STEWART, J., BUTTON, J., 1975.

Tissue culture studies in Paphiopedilum.

Amer. Orchid Soc. Bull., 44, 591-599

STEWART, J., BUTTON, J., 1976.

Rapid vegetative multiplication of Epidendrum O'brienianum
in vitro and in the greenhouse.

Amer. Orchid Soc. Bull., 45, 922-930.

STEWART, J., BUTTON, J., 1978.

Development of callus and plantlets from Epidendrum
root-tips cultured in vitro.

Amer. Orchid Soc. Bull., 47(7), 607-612.

STOKES, M.J., 1974.

The in vitro propagation of Dactylorhiza fuchsii (Druce)
Vermeuh.

Orchid Rev., 82, 62-65.

- STOKES, M.J., THOMAS, E., HOLDGATE, D.P., 1975.
Notes on the aseptic propagation of members of the tribe
Cypripedieae.
Orchid Rev., (England), 83, 136-137.
- TANAKA, M., HASEGAWA, A., GOI, M., 1975.
Studies on the clonal propagation of monopodial orchids
by tissue culture. I : Formation of PLB from leaf tissue
in Phalaenopsis and Vanda.
J.Jap. Soc. Hort. Sci., 44(1), 47-58.
- TANAKA, M., SAKANISHI, Y., 1977.
Clonal propagation of Phalaenopsis by leaf tissue culture.
Amer. Orchid Soc. Bull., 46, 733-737.
- (TANAKA, M., SAKANISHI, Y., 1978.
Factors affecting the growth of in vitro cultured lateral
buds from Phalaenopsis flower stalk.
Sci. Hort., (Netherlands), 8(2), 169-178.
- TANAKA, M., SENDA, Y., HASEGAWA, A., 1976.
Plantlet formation by root tip culture in Phalaenopsis.
Amer. Orchid Soc. Bull., 45, 1022-1024.
- TEO, C.K.H., KUNISAKI, J.T., SAGAWA, Y., 1973.
Clonal propagation of strap leafed Vanda by shoot tip
culture.
Amer. Orchid Soc. Bull., 42, 402-405.
- o TEO, CK.H., NEUMANN, K.M., 1978 a.
The culture of protoplasts isolated from Penantanda
Rosalind Choek.
Orchid Rev., 86, 156-158.
- z TEO, C.K.H., NEUMANN, K.M., 1978 b.
The isolation and hybridisation of protoplasts from
orchids.
Orchid Rev., 86, 186-189.
- TEWS, G., 1974.
Einfache vegetative Phalaenopsis Vermehrung.
Orchideen (DDR), 3, 14-15.
- THOMALE, H., 1954.
Die Orchidee.
Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.

- TRAN THANH VAN, M., 1974 a.
Methods of acceleration of growth and flowering in a few species of orchids.
Amer. Orchid Soc. Bull., 43, 699-707.
- TRAN THANH VAN, M., 1974 b.
Growth and flowering of Cymbidium buds normally inhibited by apical dominance.
J. Amer. Soc. Hort. Sci., 99(5), 450-453.
- TSE, A.T., SMITH, R.J., HACKETT, W.P., 1971.
Adventitious shoot formation of Phalaenopsis nodes.
Amer. Orchid Soc. Bull., 40, 410-413.
- TSUCHIYA, I., 1954.
Germination of orchid seeds from premature pods.
Na Pua Okika O Hawai Nei, 4, 11-16.
- URATA, U., IWANAGA, E.T., 1965.
The use of Itotype vials for vegetative propagation of Phalaenopsis.
Amer. Orchid Soc. Bull., 34, 410-413.
- VACIN, E.F., WENT, F.W., 1949.
Some pH changes in nutrients solutions.
Bot. Gaz., 110, 605-613.
- VAJRABHAYA, H., VAJRABHAYA, T., 1970.
Tissue culture of Phynchosstylis gigantea, a monopodial orchid.
Amer. Orchid Soc. Bull., 39, 907-910.
- VAN OVERBEEK, J., BLONDEAU, R., HORNE, V., 1954.
Trans cinnamic acid as an anti-auxin.
Amer. J. of Bot., 38, 589-595.
- ✓ VAN SEVEREN, N., 1973.
Effets du sachharose sur le contenu en chlorophylles de protocormes de Cymbidium cultivés in vitro.
Bull. Soc. Roy. Bot. Belgique, 106, 107-115.
- WERCKMEISTER, P., 1970.
Die Steuerung von Vermehrung und Wachstum in der Meristemkultur von Cymbidium und die Verwendung eines Kohle Nährmediums.
Die Orchidee, 21, 126-131.

- WERCKMEISTER, P., 1970 b.
Über die Lichtinduktion der geotropen Orientierung von Luft und Bodenwurzeln in Gewebekulturen von Cymbidium.
Ber. deut. Bot. Ges., 83, 19-26.
- WERCKMEISTER, P., 1971.
Ligth induction of geotropism and the control of proliferation and growth of Cymbidium in tissue culture.
Bot. Gaz., 132(4), 346-350.
- WHITE, P.R., 1943.
A handbook of plant tissue culture.
Ronald Press, New York.
- WILSON, J.K., 1915.
Calcium hypochlorite as a seed sterilizer.
Amer. J. of Bot., 2, 420-427.
- WIMBER, D.E., 1963.
Clonal propagation of Cymbidium through tissue culture of the shoot meristem.
Amer. Orchid Soc. Bull., 32, 105-107.
- WIMBER, D.E., 1965.
Additional observations on clonal multiplication of Cymbidium through culture of shoot meristems.
Cymbidium Soc. News, 20, 7-10.
- ZIMMER, K., PIEPER, W., 1976 a.
Zur Wirkung von Blutungssaft der Weissbirke auf das Wachstum von Geweben in vitro.
Die Orchidee, 27, 267-269.
- ZIMMER, K., PIEPER, W., 1976 b.
Zur Wirkung von Blutungssaft der Birke auf Aussaaten von Barkeria und Phalaenopsis.
Die Orchidee, 27, 270-271.
- ZIMMER, K., PIEPER, W., 1977.
Zur vegetativen Vermehrung von Phalaenopsis in vitro.
Die Orchidee, 28, 118-122.
- WIMBER, D.E., ZIMMER, K., PIEPER, W., 1978.
Clonal propagation of Phalaenopsis by excised buds.
Orchid Rev., 86, 223-227.

ZIMMER, K., PIEPER, W., 1979.

Phalaenopsis. Zur vegetativen Vermehrung.
Gartenwelt, 11, 258-260.

-----oOo-----

PLANCHES

HORS-TEXTE



