Exclu du Prêt
50376
1987
395

N° d'ordre : 1421

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE 3ème CYCLE

par

Caty CZECHOWIAK

CULTURE *IN VITRO* DE MERISTEMES DE *PELARGONIUM*

Soutenue le **1987 devant la Commission d'Examen**

M. R. BOURIQUET	Président
M. B. LEGRAND	Rapporteur
M. M. DEVYS	Examinateur
M. J. DUBOIS	Examinateur

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé à l'Université des Sciences et Tehniques de Lille-Flandres Artois. Je remercie Monsieur le Professeur BOURIQUET de son accueil, d'avoir permis la réalisation de cette étude et d'être le Président du Jury.

Je remercie les Ets Philiomel pour m'avoir permis d'effectuer ce travail et en particulier Monsieur DEVYS pour avoir accepté de juger ce mémoire.

Je suis reconnaissante à Monsieur LEGRAND d'avoir bien voulu être rapporteur et à Monsieur DUBOIS d'avoir accepté d'examiner ce travail.

J'adresse également mes remerciements à Madame JOVENIN pour avoir dactylographié ce manuscrit, à Monsieur et Madame DUBOIS pour avoir réalisé quelques photos, ainsi qu'aux autres personnes du laboratoire qui de près ou de loin m'ont aidé au cours de cette étude.

Enfin je tiens tout particulièrement à exprimer ma reconnaissance à Hervé VALLIN pour son assistance technique.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 2

I - NOTIONS DE BOTANIQUE 3

A - Description 3

1) Appareil végétatif 3

2) Appareil reproducteur 3

B - Origine géographique 3

C - Origine de la classification 4

D - Introduction du *Pelargonium* en Europe 4

E - Les créations originales 4

F - Classification des "formes modernes" du *Pelargonium* 5

II - LA STRUCTURE DU MERISTEME 6

III - CULTURE *IN VITRO* 9

A - Néoformation à partir d'organes différents des méristèmes 9

1) Utilisation d'entre-noeuds, de pédoncules floraux de pétioles 9

2) Utilisation d'anthères 10

B - Néoformation à partir de méristèmes 10

C - Obtention de plantes directement à partir de méristèmes sans passer par le stade cal 12

1) La culture 12

2) Les conditions de culture 14

3) Les repiquages 14

4) L'enracinement 15

5) Le problème des plantes non conformes 15

6) L'indexage après la culture *in vitro*..... 15

MATERIEL ET METHODES..... 16

I - MATERIEL VEGETAL..... 17

II - ASEPSIE..... 17

III - PRELEVEMENT DES MERISTEMES..... 17

IV - DIFFERENTS TYPES DE MERISTEMES..... 18

V - LES MILIEUX DE CULTURE..... 19

A - Les éléments minéraux et organiques..... 19

B - Les régulateurs de croissance..... 20

VI - DEROULEMENT DES CULTURES..... 20

VII - LA SALLE DE CULTURE..... 21

VIII - EVALUATION DES RESULTATS..... 21

RESULTATS..... 22

I - LES MERISTEMES..... 23

A - Influence du flaconnage..... 23

B - Méristèmes apicaux et axillaires..... 24

C - La forme du méristème..... 25

II - CONDITIONNEMENT..... 27

A - Capacité du tube de culture..... 27

B - Influence du pied mère..... 28

C - Conditionnement du milieu..... 29

D - Conséquences d'un passage de durée déterminée sur un milieu sans hormone à l'ensemencement..... 30

III - LE MILIEU MINERAL..... 33

A - Choix du milieu minéral..... 33

B - Choix d'un milieu minéral après une phase de repos

chez les *P. x hederaefolium*..... 34

C - Rôle de l'azote..... 34

1) Rôle de l'azote sur la croissance..... 35

2) Rôle de l'azote sur le rendement en plantes..... 36

3) Interprétation..... 37

D - Rôle du potassium..... 38

E - Effets de l'azote et du potassium en période défavorable 39

F - Le fer..... 40

IV - LES GLUCIDES..... 42

A - La concentration en saccharose..... 42

B - La nature du sucre..... 43

V - ROLE DU CHARBON ACTIF SUR L'ALLONGEMENT DES MERISTEMES..... 44

VI - LES HORMONES..... 45

A - Les cytokinines..... 45

1) La nature des cytokinines..... 45

2) Influence de l'emploi immédiat ou différé de zéatine chez le *P. x hortorum*..... 46

3) Utilisation d'un précurseur de cytokinines : l'adénine 47

B - L'auxine..... 48

C - Les gibbérellines..... 49

1) Action de la concentration en gibbérelline..... 49

2) Influence de la nature des gibbérellines..... 50

3) Action d'un précurseur de la synthèse des gibbérellines..... 50

VII - VARIATIONS SAISONNIERES..... 51

A - Emploi de BA dès l'ensemencement..... 51

B - Emploi de zéatine dès l'encemencement..... 52

C - Emploi différé de zéatine..... 52

1) Première phase de culture sans charbon actif..... 52

2) Première phase de culture avec charbon actif..... 52

D - Emploi de zéatine et de charbon actif en première phase de culture..... 53

E - Conclusion..... 53

VIII _ ESSAIS DE REVEIL PHYSIOLOGIQUE DES MERISTEMES 55

A - Par les hormones..... 55

1) Les cytokinines..... 55

a) Influence de la saison sur la concentration optimale en cytokinine..... 55

b) Influence de la nature de la cytokinine en période favorable..... 56

2) L'auxine..... 57

a) Rôle de l'auxine en période défavorable, comparaison avec la zéatine..... 57

b) Rôle de l'auxine en période favorable..... 59

3) Association de l'AG3 à une cytokinine en période défavorable..... 60

B - Par un traitement au froid..... 61

IX - LA VITRIFICATION DU *PELARGONIUM* EN CULTURE *IN VITRO*..... 62

A) Le milieu liquide..... 62

B) Le charbon actif..... 62

C) La qualité de l'agar et la variété..... 62

D) La fermeture des tubes..... 63

E) Les hormones..... 63

1) Les cytokinines..... 63

2) L'auxine..... 63

F) Les sels minéraux..... 64

G) Nature du sucre..... 64

X - APPLICATION ET TENTATIVE DE GENERALISATION DE NOS PREMIERS RESULTATS AUX VARIETES DE LA COLLECTION PHILIOMEL..... 65

XI - CULTURE *IN VITRO* DES MICROPLANTES..... 68

A) Action du charbon actif..... 68

B) Multiplication par développement des bourgeons axillaires 69

1) Le développement spontanné..... 69

2) Rôle de la BA dans la multiplication induite..... 69

C) Enracinement 70

D) Acclimatation 71

DISCUSSION..... 72

I - PRELEVEMENT DES MERISTEMES..... 73

II - ENSEMENCEMENT..... 73

III - MILIEU MINERAL..... 74

IV - VITAMINES ET SUCRES..... 75

V - CYTOKININES ET AUXINES..... 76

VI - VARIATIONS SAISONNIERES 76

VII - ESSAIS DE LEVEE DE DORMANCE..... 77

VII - PROBLEMES DE VITROSITE..... 78

IX - PROBLEMES DE CONFORMITE..... 79

X - CONTROLE SANITAIRE..... 80

RESUME..... 81

BIBLIOGRAPHIE 85

ABREVIATIONS

A.B.A. : acide abscissique

C.A. : charbon actif

cv : cultivar

M.B. : milieu de base

M. S. : MURASHIGE et SKOOG, 1962

P. : *Pelargonium*

var. : variété

Z. : zéatine

INTRODUCTION

Dès les premiers travaux sur les cultures de racines isolées, WHITE (1934) démontre que des extrémités de racines de Tomates virosées mises en culture redonnent des racines saines. Quant à MOREL et al. (1952-55) ils réussissent à éliminer les viroses de Dahlia et de Pommes de terre en régénérant des plantes à partir des méristèmes caulinaires.

L'éradication des virus par culture de méristèmes vient du fait que les cellules méristématiques sont pratiquement dépourvues de virus.

D'autre part, la culture de méristèmes caulinaires permet de par leur aptitude à la régénération, l'obtention de copies conformes.

Avant les travaux de MOREL, la thermothérapie était le moyen de lutter contre les virus ; en effet, la chaleur peut favoriser la multiplication cellulaire et freiner le développement viral.

On peut d'ailleurs associer les deux méthodes quand les explants sont trop gros pour garantir l'absence de virus.

Nous avons essayé de mettre au point la culture de méristèmes de *Pélargonium* sans utiliser la thermothérapie que ces derniers supportent mal.

Les variétés utilisées sont celles de la collection des Ets Philiomel.

Cette mise au point a souligné les exigences métaboliques différentes des méristèmes selon la période de leur prélèvement ; leur capacité de croissance et de régénération étant plus réduite en hiver.

REVUE

BIBLIOGRAPHIQUE

I - NOTIONS DE BOTANIQUE

A - Description

1) Appareil végétatif

Le *Pelargonium* est une plante à feuilles persistantes, héliophile et xérophyte.

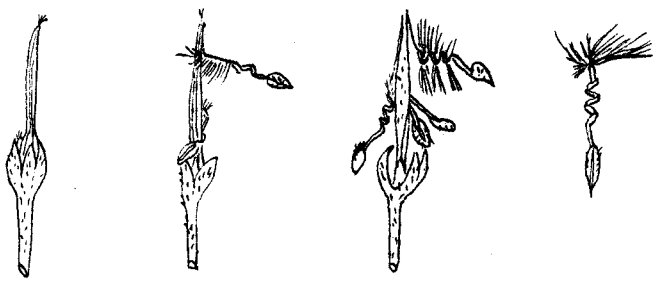
Les feuilles sont alternes avec un limbe souvent orbiculaire, réniforme, parfois digité, lacinié ou penné. La nervation est palmée.

La lutte de la plante contre la sécheresse se manifeste par des tiges charnues, des feuilles souvent épaissies, tomenteuses ainsi qu'un appareil racinaire développé.

2) Appareil reproducteur

Les fleurs donnent des inflorescences disposées en ombelle. Le nombre de fleurs varie de 5 à 40 et la longueur des pédoncules floraux de 10 à 30 mm

La fleur 5-mère à pétales et sépales libres est légèrement zygomorphe. Le sépale postérieur se termine par un éperon concrescent avec l'axe. L'ovaire syncarpique donne 5 méricarpes (fruit schizocarpique) dont la coque est surmontée du style persistant. Celui-ci s'enroule en tire-bouchon au moment de la déhiscence. Sous l'influence des variations de l'humidité atmosphérique le style effectue des mouvements qui, peu à peu enterrent le méricarpe tombé sur le sol.



Stades de maturation des méricarpes d'après DIGAT et al., (1982).

B - Origine géographique

90 % des espèces proviennent d'Afrique du Sud (province du Cap) les autres trouvent leur origine en Amérique du Nord, Asie Mineure, Australie ou en région méditerranéenne.

Dans la province du Cap l'altitude varie entre 500 et 1200 m. Le sol est de nature granitique et gréseuse pour les chaînes et formé de conglomérats argileux schisteux au niveau des vallées.

Le climat est de type méditerranéen avec surtout des pluies en saison froide (de mai à septembre) et une température variant de 10 à 20° C.

C - Origine de la classification

Les 20 premières espèces de *Pelargonium* introduites en Europe furent décrites par LINNE (1707-1778) sous le nom générique de *Geranium* (du grec geranos = grue), le fruit rappelant en effet la forme du bec de grue.

A la même époque BURMAN (1706-1779) propose un nouveau nom générique : *Pelargonium* (du grec Pelargos = cigogne) de façon à distinguer les *Géranium* zygomorphes des *Pelargonium* actinomorphes.

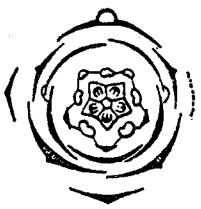


Diagramme floral de *Pelargonium zonale* EMBERGER 1960)

Diagramme floral de *Geranium pratense* (EMBERGER 1960)

Le nom fut définitivement reconnu depuis le botaniste l'HERITIER DE BRUTELLE (1746-1800).

D - Introduction du *Pelargonium* en Europe

Le premier *P. peltatum* est introduit en Hollande en 1700, mais seulement en 1774 en Angleterre.

Les premiers *P. zonale* sont rapportés par un Gouverneur Hollandais en 1709 aux Pays bas et en 1710 en Angleterre.

C'est en 1714 que le plus important des *Pelargonium* modernes : le *P. inquinans* est importé en Angleterre.

L'introduction la plus importante se situe de 1790 à 1820, période à laquelle l'Angleterre reprend sa colonie aux Hollandais. De 1820 à 1850, les Anglais ont l'exclusivité de la production et de la création des *Pelargonium* . En 1890, on peut dénombrer plus de 3000 variétés.

E - Les créations originales

HENDERSON (1863) crée la première plante à feuillage panaché 'Mistress Pollock'.

Les *Pelargonium* à fleurs doubles apparaissent plus tard : le premier *P. x hederaefolium* à fleurs doubles baptisé 'Abel carrière' est crée par BRUANT en 1884. Quant au premier *P. x hortorum* à fleurs doubles et semi-doubles 'A. Ricard' il est créé en 1894.

F - Classification des "formes modernes" du *Pelargonium*

Le genre *Pelargonium* est constitué de 3OO espèces mais toutes les variétés actuellement commercialisées sont des hybrides issus de nombreux croisements entre diverses espèces botaniques. On peut ainsi définir les différents hybrides vendus sur le marché :

Hybride	caractéristiques	dénomination courante	ancêtres géniteurs
P. x hortorum	Fleurs simples ou doubles 4 n - 2 n feuilles plus tomenteuses	- zonale - Géranium - Pelargonium des jardins	- *P. inquinans* - *P. zonale* - *P. hybriderum* - *P. frutetorum* - *P. scandens* - *P. Steropetalum* - *P. acetosum*
P. x hederaefolium	rappelle le port du lierre feuilles plus glabres	- P. peltatum - Géranium lierre	- *P. peltatum* de différentes origines géographiques - *P. lateripes*
P. x domesticum	proche des *Pelargonium* à essence 4 n grandes fleurs	- Pélargonium - P. regal ou grandiflorum - P. des fleuristes - Show Geranium	- *P. cucullatum* - *P. superbum* - *P. grandiflorum* - *P. acérifolium*
P. x peltato-zonale		- Lierre -zonale	- *P. peltatum* - *P. x hortorum*
Pelargonium à essence	feuilles odorantes 2 n à x n		- *P. graveolens* - *P. quercifolium* - *P. odoratissimum* - *P. tomentosum* - *P. crispum*

Les noms d'espèces soulignés sont ceux qui interviennent le plus souvent dans les hybridations.

Tableau des différents *Pelargonium* : leur appellation courante et leur appellation botanique.

II - LA STRUCTURE DU MERISTEME

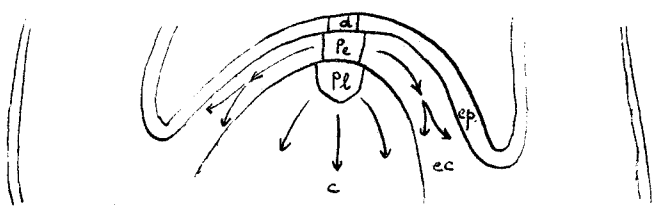
Les premiers travaux précis sur la structure du méristème sont ceux de NAEGELI (1845) et de HOFMEISTER (1851).

Apex de Filicales aves cellules apicales
(NAEGELI, 1845 et HOFMEISTER, 1851)

Ces auteurs ont démontré l'existence d'une initiale tétraédrique dans les sommets d'apex de Filicales engendrant toutes les cellules de la tige feuillée.

Mais les résultats ne peuvent s'étendre à l'ensemble, et HANSTEIN (1868-187O) établit une théorie reposant sur la présence de 3 feuillets dans les sommets de tiges. Les 3 feuillets ou histogènes naissent chacun d'une initiale apicale distincte et possèdent un rôle différent :

- l'histogène supérieur ou dermatogène produit l'épiderme et les feuilles
- l'histogène moyen ou périblème produit l'écorce
- l'histogène inférieur ou phlérome produit le cylindre central.



d : dermatogène
pe : periblème
pl : plérome
ep : épiderme
ec : écorce
c : cylindre central

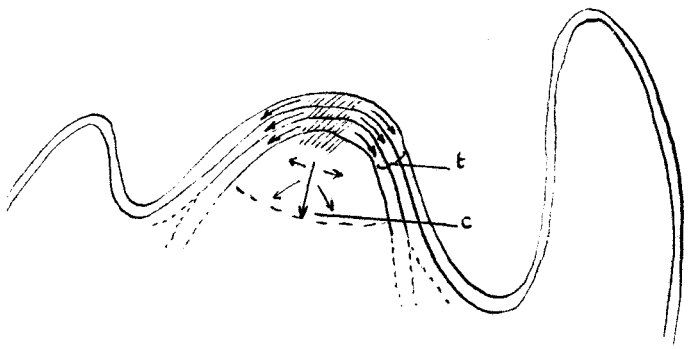
Point végétatif selon les conceptions de HANSTEIN (187O)

KOCH en 1891 observe chez les Gymnospermes 2 zones cytologiquement distinctes : le corps central et le capuchon.

Le corps central est constitué de grandes cellules avec des vacuoles développées, contrairement au capuchon formé de petites cellules avec des petites vacuoles.

Le corps central serait à l'origine de la moëlle et le capuchon engendrerait le reste de la tige feuillée

Ces théories sont reprises, par SCHMIDT (1924) qui les applique aux Angiospermes. Le corps central devient alors le corpus et le capuchon : la tunica. Le corpus est défini par la présence de cellules à disposition irrrégulière où les mitoses n'ont pas d'orientation définie. Il est recouvert de la tunica à mitoses anticlines au sommet, et périclines à la base. Les mitoses périclines sont à l'origine des feuilles .

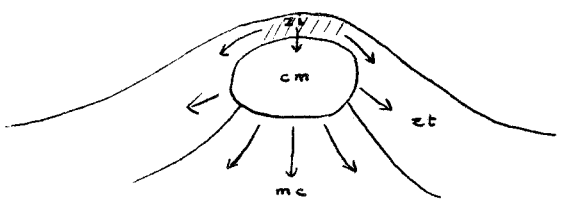


Point végétatif d'Angiospermes selon les conceptions de SCHMIDT (1924)

Le concept corpus tunica reste satisfaisant pour les Angiospermes et de nombreux auteurs ont essayé de classer ce groupe selon le nombre d'assises de la tunica. Plus de 50 % de Dicotylédones possèdent deux assises (il peut y en avoir jusqu'à 4 ou 5) mais chez les Monocotylédones il est courant de n'en rencontrer qu'une ou deux (GIFFORD, 1954).

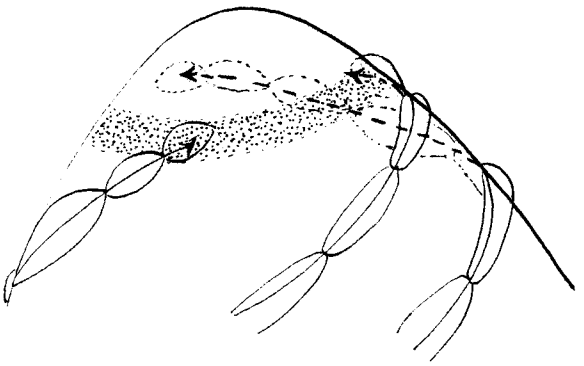
Cependant pour les Préphanérogames et les Gymnospermes on ne peut appliquer ces théories puisque dans la tunica on note souvent la présence de divisions périclines sans rapport avec l'initiation foliaire (KORODY, 1937).

FOSTER (1938) établit l'existence de 4 zones non franchement délimitées chez les *Cycadales* , le *Ginkyo* et certaines Gymnospermes. Les initiales apicales fournissent les cellules latérales et en dessous, les cellules mères centrales. Ces dernières produisent des cellules latérales et le méristème central. FOSTER (1938) note également que le taux de mitoses est plus important dans la zone périphérique



Apex de *Dion edule* d'après les conceptions de FOSTER (1938)

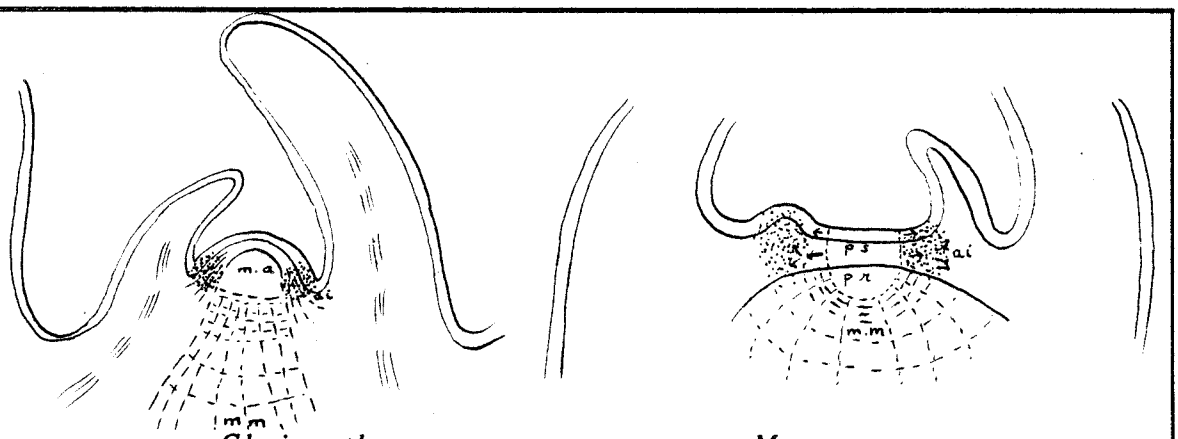
Jusqu'en 1946, on considère que les feuilles naissent sur une spirale génératrice unique. Mais PLANTEFOL montre que cette spirale génératrice est dépourvue de toute réalité ontogénique puisque en fait, les feuilles sont insérées sur la tige le long de plusieurs hélices foliaires. Ces hélices foliaires aboutissent aux derniers initiums et primordiums formés, donc aux endroits où la prolifération est la plus intense. L'initiation des méristèmes foliaires est périodique : c'est l'initiation plastochronique; le plastochrone correspondant au temps séparant l'initiation de 2 feuilles successives.



Point végétatif d'Angiospermes selon la théorie des hélices foliaires multiples et de la contiguité (PLANTEFOL, 1946).

La confirmation des travaux de PLANTEFOL (1946) est apportée par BUVAT (1952-1955) qui démontre que les zones de l'apex ayant les caractères les plus méristématiques correspondent respectivement à l'anneau initial et au méristème médullaire. L'anneau initial donne naissance aux feuilles (potentialité organogène) et à la région corticale des entre-noeuds, au centre le méristème médullaire engendre les cellules de la moëlle (potentialité histogène) ; BUVAT constate donc une relative inertie des cellules du sommet (tunica et corpus) et des cellules de la base. Cette observation est confortée par les expériences de microchirurgie suivantes :

- la suppression des cellules apicales n'empêche pas le développement qui continue à partir des cellules sous-jacentes. Ces dernières vont à nouveau plus ou moins vite se coiffer d'un "chapeau" de cellules apicales.
- l'ontogenèse de la tige feuillée est modifiée si l'anneau initial est entamé (SNOW, 1947 ; LOISEAU, 1954). Cependant la partie axiale (prométistème sporogène et réceptaculaire) pourrait sous certaines conditions se mettre en activité et prendre le relai de l'anneau initial, notamment dans les conditions de mise à fleur.



Cheiranthus *Myosurus*

Points végétatifs montrant le méristème d'attente (BUVAT, 1952)
ps : prométistème sporogène ; pr : prométistème réceptaculaire;
ma: méristème d'attente ; mm : méristème médullaire ; ai : anneau initial

III - CULTURE *IN VITRO*

A - Néoformation à partir d'organes différents des méristèmes

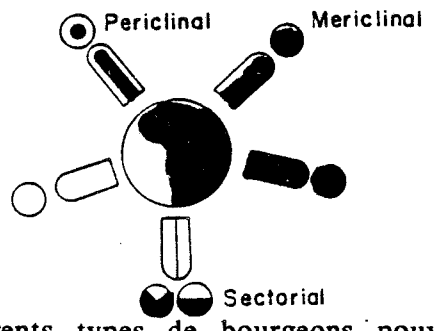
1) Utilisation d'entre-noeuds, de pédoncules floraux et de pétioles.

En 1967, CHEN et al., parviennent à obtenir la régénération de plantes à partir de cal de moëlle de *P. x hortorum* induit sur le milieu minéral de WHITE (1943) additionné d'AIA (0,875 $mg.l^{-1}$) et de BA (0,22 $mg.l^{-1}$). Le transfert sur du milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962) en présence des mêmes concentrations hormonales permet la formation des bourgeons qui s'enracinent après suppression des substances de croissance.

L'ensemencement de pétioles et d'entre-noeuds de 11 cultivars de *P. x hortorum* sur du milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962) et d'un mélange hormonal plus riche en cytokinines (ANA : 0,1 $mg.l^{-1}$ et Kin : 10 $mg.l^{-1}$) fournit du cal qui a pour origine les cellules cambiales (PILLAI et al., 1968), et des bourgeons qui s'enracinent si l'on inverse l'équilibre AIA : 10 $mg.l^{-1}$ - Kin : 0,04 $mg.l^{-1}$.

Il existe parmi les cultivars des *Pelargonium* cultivés de nombreuses chimères polyploïdes pouvant poser de multiples problèmes lors de la néoformation des bourgeons. En effet l'initiation de cal en présence de substances de croissance (adénine : 40 $mg.l^{-1}$ - Kin : 5 $mg.l^{-1}$ - ANA : 1 $mg.l^{-1}$) à partir de fragments de racines, de tige ou de pétiole de différents cultivars (10 cvs de *P. x hortorum*, 2 cvs de *P. graveolens*, 1 cv de P. x *domesticum*, 1 cv de *P. domesticum* x *denticulatum*, 1 cv de *P. capitatum*, 1 cv de P. x *adcifolium*, 1 cv de *P. crispum*) ont régénéré (tous, excepté les cvs de *P. x hortorum*) des plantes dont le phénotype diffère de celui des plantes d'origine.

Chez le *P. graveolens* il existe des chimères constituées de tissus de ploïdie différente mise en évidence par la régénération de plantes aux feuilles différentes de celle des pieds sur lesquels les explants (2n ou 4n) avaient été prélevés (SKIRVIN et al., 1976). Le type de chimère rencontré chez ce *Pelargonium* est de type péricline, il peut donc engendrer 5 phénotypes différents comme l'indique le schéma ci-dessous.



Différents types de bourgeons pouvant dériver d'une chimère péricline (SKIRVIN et al. 1976) par néoformation

Ce type de structure permet donc la dispersion des caractères phénotypiques lors de la régénération de bourgeons à partir du cal. Parmi les *Pelargonium* , les variétés panachées peuvent être le résultat d'une chimère ou de viroses. L'ensemencement de pétiole de variétés panachées sur du milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962) additionné de zéatine : 1 mg.l^{-1}) peut donc donner des résultats différents. En effet les variétés dont le panachage est dû à une chimère ('Mrs Salleron' ; 'Mr Wren') ne redonnent pas le phénotype initial contrairement aux variétés ('Rouletta', 'Crocodile') panachées par un virus (CASSELS et al., 1980). (voir schéma p 13)

La régénération des plantes est aussi fonction de l'âge du pied-mère sur lequel est prélevé l'explant (HAMMERSCHLAG et al., 1981). Plus celui-ci est jeune et meilleure est la régénération des fragments de tige (milieu d'induction MS + ANA : 2 mg.l^{-1} et Kin 2 mg.l^{-1}).

Mais les potentialités organogènes varient également d'un cultivar à un autre. En effet GRUNEWALD (1981) obtient selon le cultivar, de meilleurs résultats soit à partir de pétiole, soit à partir des pédoncules floraux.

2) Utilisation d'anthères

Les premiers travaux à partir d'anthères ont été réalisés par ABO EL NIL et al., (1971) sur 8 cvs de *P. x hortorum.* Les anthères ensemencées sur du milieu de WHITE (1943) modifié additionné de lait de coco (150 mg.l^{-1}) et d'hormones (ANA : 2,5 à 2 mg. l^{-1} et Kin : 2,5 mg.l^{-1}) régénèrent des plantes apparemment saines et présentant une bonne vigueur.

Chez le *Pelargonium* le nombre chromosomique des suspensions cellulaires ou des cals est peu stable, et BENNICI (1974) constate que souvent une population de cellules haploïdes double ou quadruple ses chromosomes.

L'âge des pieds mères où est effectué le prélèvement des anthères est importante (HAMMERSCHLAG et al., 1981) puisque des anthères provenant d'un pied mère de 2 mois fournissent plus de cal que des pieds mères âgés de 2 ans ; elles ne régénèrent toutefois pas de plantes.

B - Néoformation à partir de méristèmes

Les méristèmes de *pelargonium* en culture donnent beaucoup plus facilement du cal, qu'ils ne se développent en jeune plante. Certains auteurs vont tirer parti de ce phénomène en provoquant le bourgeonnement des cals, ce qui permet d'accroître le nombre des plantes obtenues.

Dans tous les cas le milieu utilisé est le milieu minéral de MURASHIGE et SKOOG (1962) plus ou moins modifié.

PILLAI et al. (1968) induisent des plantes (6 cvs) à partir de sommets de tige (3 mm) ensemencés sur des milieux renfermant un mélange hormonal riche soit en auxines, soit en cytokinines (AIA : 10 mg.l^{-1} et Kin : 0,04 mg.l^{-1} ou AIA : 0,1 mg.l^{-1} et Kin : 10 mg.l^{-1}). Les plantes obtenues sont vigoureuses, conformes et indemnes de virus.

En 1975, REUTHER avec des apex plus petits (1-1,5 mm) de différents cultivars (4 cvs *P. x hortorum*, 2 cv s *P. x hederaefolium* , *1 P. x peltato-zonale)* en modifiant le rapport hormonal (AIA : 1 $mg.l^{-1}$ et Kin : 1 $mg.l^{-1}$) obtient également des plantes dont il ne signale toutefois pas de problèmes de conformité.

HAMDORF (1976) élargit le champ d'investigation à un nombre de cultivars beaucoup plus important. Pour les *P. x domesticum* (19 cvs) il enrichit son milieu de NaH_2PO_4, H_2O, d'adénine (50 $mg.l^{-1}$) et d'AG_3 ($1mg.l^{-1}$), par contre il dilue le milieu pour les autres variétés (22 cvs *P. x hortorum*, 4 cvs *P. x hederaefolium*, 1 cv *P. x peltato-zonale*). L'induction du cal à partir d'apex (1-1,5 mm) et la néoformation de bourgeons a été réalisée à partir d'un équilibre hormonal se rapprochant pour les *P. x domesticum* de celui de REUTHER (1975) (AIA : 2 $mg.l^{-1}$, Kin : 2 $mg.l^{-1}$) ; les autres variétés ont été initiées en présence de : Kin : 10 $mg.l^{-1}$, ANA : 0,1 $mg.l^{-1}$ et AIA : 2 $mg.l^{-1}$). Le taux de régénération est nul pour les *P x hederaefolium* et faible pour les autres variétés après un temps de culture de 4 à 7 mois, mais les plantes obtenues présentent de rares problèmes de conformité et sont apparemment saines avec un gain de vigueur.

HORST et al. (1976) associent au traitement par thermothérapie des pieds mères (4 semaines 38° C jour et 35° C nuit) le prélèvement d'apex plus petits (0,5 - 1 mm) pour tenter de guérir un lot de plantes (40 cvs de *P. x hortorum* et 11 cvs de *P. x hederaefolium)* virosées à 95 %. L'ensemencement réalisé sur un milieu dilué aux 3/4 comporte un antioxydant (cystéine : 2 $mg.l^{-1}$), du lait de Coco , un équilibre hormonal plus riche en auxine, notamment pour les cultivars peu réactifs et les *P. x hederafolium* (jusqu'à 6 - 10 $mg.l^{-1}$ d'AIB) mais pauvre en cytokinines (Kin : 0,04 $mg.l^{-1}$ - 0,0125 $mg.l^{-1}$). 5 % des plantes régénérées demeurent contaminées et l'enracinement est facilité après thermothérapie.

Le protocole expérimental de REUTHER (1975) est repris par GRAIFENBERG et al. (1978) qui obtiennent toutefois un assez faible rendement sur les mêmes types d'hybrides (*P. x hortorum*, P. x *hederaefolium*, *P. x peltato-zonale)*. En fait le comportement très variable des différents cultivars vis à vis des substances de croissance conduit REUTHER en 1983 à réviser son équilibre hormonal et à mettre au point 26 milieux pour 31 variétés. Les combinaisons hormonales utilisées varient de 0,6 à 1 $mg.l^{-1}$ d'AIA pour 0,25 à 0,5 mg l^{-1} de 2 iP et de 0,05 à 0,20 $mg.l^{-1}$ de BA pour 0,1 mg d'AIA. Le taux de régénération varie de 30 à 200 % mais le potentiel organogène des cultures diminue au cours du temps et le fait d'utiliser des apex assez petits (1 à 1,5 mm) n'exclue pas la présence des bactéries dans les cultures puisque 38 % des plantes obtenues sont contaminées.

CASSELS et al. (1983) constatent la très grande variabilité dans l'aptitude des différentes variétés à régénérer des plantes

- 20-70 % pour 19 cvs *P. x hortorum*,
- 20-30 % pour 6 cvs *P. x hederaefolium*,
- 50 % pour 1 cv à feuilles odorantes
- et 53 % pour 1 cv *P. x peltato zonale*)
- et notamment pour les P. x *domesticum* (2-50 % pour 6 cvs).

Les problèmes de conformité 4-13 % pour 3 cvs n'ont pas affecté la floraison. Les auteurs précisent également l'importance d'un séjour des pieds mères en jours courts (1 à 4 semaines) ou à des basses températures (10° C, 1 à 4 semaines) sur l'augmentation du nombre de bourgeons. La mise en place des méristèmes à l'obscurité (1 à 4 semaines) est également bénéfique au développement.

C - Obtention de plantes directement à partir de méristèmes sans passer par le stade cal.

1) La culture

Il est possible de détecter rapidement et simplement les méristèmes contaminés par des bactéries en ajoutant dans le milieu d'ensemencement des substances qui favorisent la prolifération bactérienne (hydrolysat de caséine : 250 $mg.l^{-1}$ et extrait de levure : 250 $mg.l^{-1}$) (BEAUCHESNE et al., 1977). Le milieu d'ensemencement des méristèmes (0,2 à 0,5 mm) utilisé par BEAUCHESNE et al., est également pourvu en glucose (30 g l^{-1}), AG_3 (1 $mg.l^{-1}$) adénine (2 $mg.l^{-1}$) et en hormones dont les concentrations varient selon les variétés (AIA : 0,01 à 0,25 $mg.l^{-1}$ et 2 iP : 0,1 à 0,5 $mg.l^{-1}$). Les *P. x hederaefolium* donnent plus facilement du cal, ce qui empêche l'évolution du méristème en plante.

La reprise des méristèmes semble capricieuse, mais elle est en fait tributaire de la saison. Il esiste en effet une période favorable (DALLOT, 1981 ; CASSELS et al., 1983 ; HAMMERSCHLAG, 1978 ; BEAUCHESNE et al., 1977) à la croissance des méristèmes et une période défavorable correspondant à l'entrée en dormance.

De plus, les nécroses qui se produisent au cours des repiquages contribuent à diminuer les rendements ; celles-ci seraient dues à la trop forte hygrométrie des tubes. (FEUTRY, 1976).

DEBERGH et al. (1977) ainsi que THEILER (1977) appliquent le même principe que BEAUCHESNE (1977) pour éliminer les bactéries des apex dans la première phase de culture. DEBERGH et al. (1977) utilisent un mélange hormonal plus riche en cytokinines (AIA : 0,5 $mg.l^{-1}$ ou ANA 0,05 $mg.l^{-1}$, et Kin : 10 $mg.l^{-1}$), mais l'originalité de leur protocole expérimental consiste à ne les introduire qu'une semaine après l'ensemencement pour éviter la toxicité des phénols secrétés dans le milieu par le méristème. Signalons cependant que l'équilibre des substances de croissance employées (pour 2 cvs de *P. x hortorum*) rappelle celui de PILAI et al. (1968) pour obtenir des bourgeons à partir des cals et explique sans doute les bons résultats obtenus avec des explants de 0,5 mm (80 - 90 %), mais pas des dômes méristématiques (8 - 10 %) employés uniquement dans le but d'éliminer les viroses.

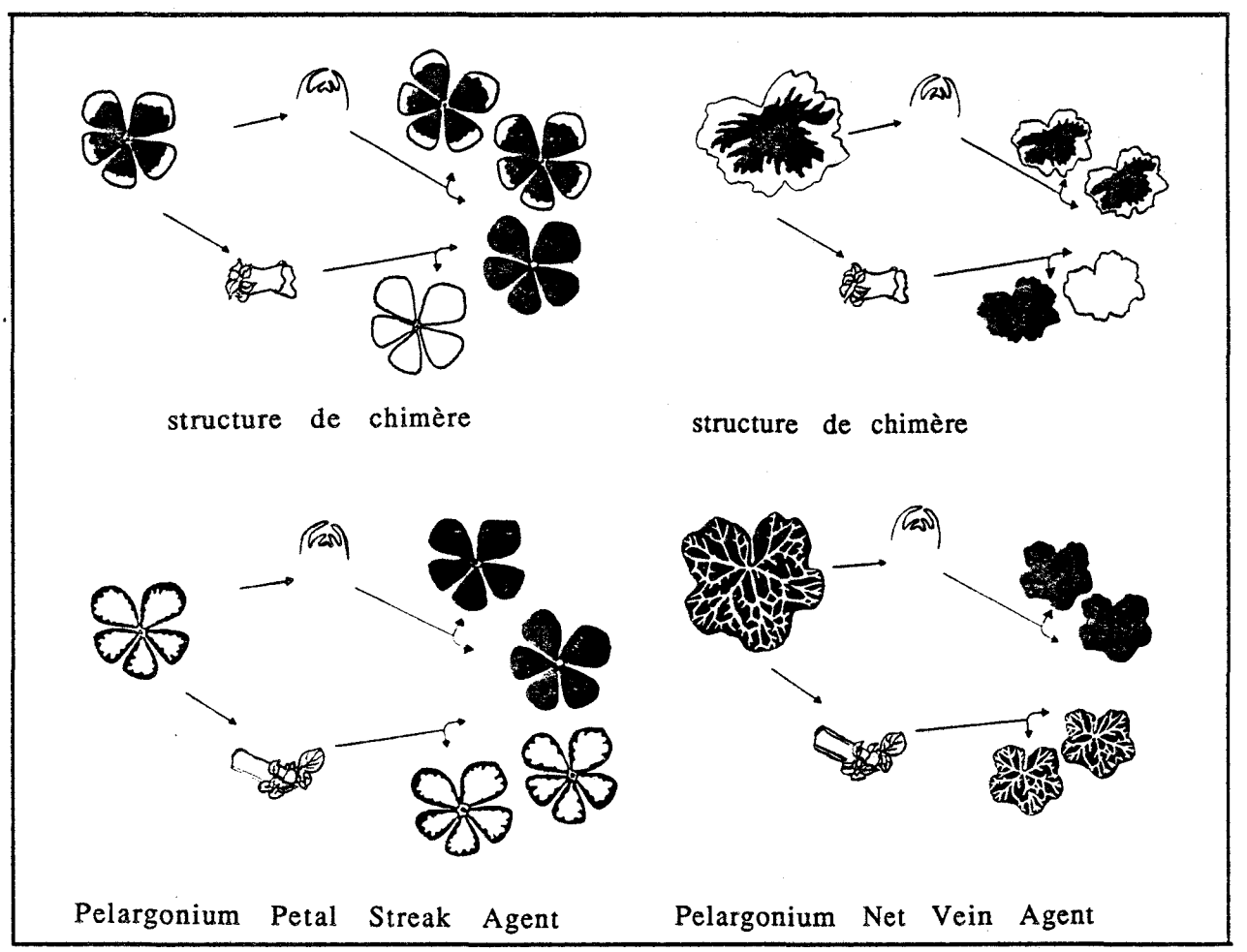
Comme DEBERGH et al. (1977), THEILER (1977) utilise les macroéléments de MURASHIGE et SKOOG (1962), mais il préfère favoriser la dominance de l'auxine (AIB : 1 $mg.l^{-1}$, BAP : 0,2 $mg.l^{-1}$). Ses essais se déroulent à partir d'apex (1 - 1,5 mm) de 3 cvs de *P. x hortorum*, 6 cvs de *P. x hedereafolium* et 1 cv de *P. x peltato -zonale*. Il constate également que les *P. x hederaefolium* produisent plus de cal et il obtient des plantes en 2 à 6 mois.

MONCOUSIN, en 1978, obtient la régénération de plantes sur des apex constitués d'un dôme et de 2 ébauches foliaires, en présence d'un équilibre hormonal encore différent (ANA : 0,1 $mg.l^{-1}$ et Kin : 1 $mg.l^{-1}$). Signalons que ces substances sont ajoutées aux macroéléments de MURASHIGE et SKOOG (1962), dilués au demi et aux microéléments de NITSCH (1970). La quantité d'hormones employée n'est pas aussi importante que celle de DEBERGH et al. (1977) mais MONCOUSIN (1978) observe des variations au niveau des feuilles et la reprise des apex issus de plantes virosées n'est que de 5 %. Le milieu minéral utilisé par HAKKAERT et al. (1979) est un milieu de

MURASHIGE et SKOOG (1962) modifié dilué aux 3/4 mais enrichi en KNO_3. 0,5 $mg.l^{-1}$ et AG_3 : 0,1 $mg.l^{-1}$. L'élimination du virus dépend du cultivar et se manifeste par un gain de vigueur et de floraison.

La réponse des nombreux hybrides de *Pelargonium* aux hormones est assez variable, aussi en 1980 BEAUCHESNE met au point de nouveaux équilibres en jouant surtout sur l'auxine. (2 iP ou BA ou Kin : 0,1 $mg.l^{-1}$; AIA : 0,1 $mg.l^{-1}$ à 0,5 $mg.l^{-1}$ et AG_3 : 1 $mg.l^{-1}$) et en augmentant la dose d'adénine (20 $mg.l^{-1}$).

La culture de méristèmes pose à nouveau le problème des cultivars panachés par la présence d'un virus. En effet les cultivars panachés au niveau des feuilles par le P.N.V.A. (Pelargonium Net Vein Agent) ou au niveau des fleurs par le P.P.S.A. (Pelargonium Petal Streak Agent) ne redonnent pas le phénotype initial après culture d'apex munis des 1ères ébauches sur le milieu d'HAMDORF (1976) réduit en NH_4NO_3 pourvu d'hormones (AIA : 2 $mg.l^{-1}$; Kin : 4 $mg.l^{-1}$; AG3 : 1 $mg.l^{-1}$) . Cependant les cultivars qui doivent leur panachure à une structure de chimère restent panachés (CASSELS et al., 1980).



(CASSELS et al., 1980).

DALLOT (1981) augmente la quantité d'azote incorporée dans le milieu tout en constatant des besoins différents selon les cultivars. Il fournit donc aux *P. x hortorum* plus de NH4NO3 et aux *P. x peltato-zonale* plus de KNO3, mais observe que la saison intervient sur le rendement. Le milieu de base employé est celui de BEAUCHESNE (1977) plus riche en auxines qu'en cytokinines (AIA : O,4 $mg.l^{-1}$; BA : O,1 $mg.l^{-1}$). MAMET et al. (1983) renforcent l'idée de DALLOT (1981) en précisant 3 conditions d'azote pour chaque type d'hybride (*P. x hortorum, P. x hederaefolium, P. x peltato-zonale*) en fonction de la saison et en présence à chaque fois d'AIA (O,O1 $mg.l^{-1}$) et de BA (O,1 $mg.l^{-1}$). Le printemps et l'été se révèlent être les saisons les plus favorables ; l'hiver plus défavorable correspond à des besoins plus élevés en azote. En fait le *P. x hortorum* réclame plus d'azote que le *P. x peltato-zonale* qui en demande lui même davantage que le *P. x hederaefolium.* Cependant la quantité d'azote supplémentaire doit être réduite dans les repiquages suivants et ne constitue pas un apport suffisant pour permettre de combattre "l'effet hiver" défavorable.

MENARD et al. (1985) allient la technique de BEAUCHESNE (1977) pour l'élimination des bactéries à celle de DEBERGH et al. (1977) en plaçant les méristèmes (O,25 à O,5 mm) sur un milieu sans hormone pendant 2 semaines. Le taux de contamination au prélèvement est inférieur ou égal à 1O %. La technique de MENARD et al. (1983) préconise en plus l'emploi de substances peu employées précédemment :

- la zéatine (utilisée par THEILER (1977))
- le P.V.P.
- le T.I.BA. (CASSELS, 1979)

Le P.V.P. est utilisé pour combattre l'oxydation des phénols, le TIBA pour limiter la dominance apicale sur les bourgeons axillaires dans le milieu de multiplication et la zéatine non associée à une auxine (2 $mg.l^{-1}$ à l'ensemencement et O,2 $mg.l^{-1}$ pour la multiplication). Les plantes sont obtenues après 3 ou 4 mois et sont issues de méristémes prélevés entre mars et août.

Les auteurs ne donnent pas les pourcentages obtenus mais donnent un tableau théorique où au cours des différentes phases de culture un méristème serait à même de donner 15 plantes.

En 1986, MAMET et al. précisent à nouveau l'influence de la saison mais aussi de l'année sur le prélèvement des méristèmes. Cette influence persiste même sur des pieds mères maintenus en conditions estivales pendant l'hiver.

2) Les conditions de culture

De façon générale, les auteurs travaillent sur le méristème de *Pelargonium* avec une photopériode de 16 heures de lumière (3OO à 5OO Lux) pour 8 heures d'obscurité à une température de l'ordre de 20° C. Toutefois DEBERGH et al. (1977) font exception puisqu'ils utilisent dans les 2 premières phases de culture une lumière continue de faible intensité (5OO lux) suivie d'une phase d'enracinement où la photopériode est de 17 h de jour (l'intensité lumineuse forte 4OOO lux) pour 7 h de nuit. L'on constate également que les conditions de culture sont assez variables lorsque les auteurs passent par une phase cal.

3) Les repiquages

La plupart des auteurs emploie pour les repiquages successifs le même milieu qu'à l'ensemencement jusqu'à l'obtention d'une plante. D'autres rajoutent une phase de multiplication si celle-ci ne survient pas naturellement ou n'est pas estimée suffisante sur le milieu d'ensemencement. Il suffit généralement de supprimer ou de diminuer la dose d'auxine, et éventuellement d'augmenter le taux de cytokinines

(BEAUCHESNE, 1977; milieu de base + 2 iP : O,5 $mg.l^{-1}$),(DALLOT (1981) ; milieu de base + AIA : O,1 $mg.l^{-1}$ et BA : O,3 $mg.l^{-1}$).

4) L'enracinement

Pour enraciner les jeunes plantes de *Pelargonium* il suffit d'ôter toutes les hormones (BEAUCHESNE, 1977 ; DEBERGH et al., 1977) ou de laisser les auxines en les augmentant éventuellement (HAKKAERT et al., 1979 : AIA : O,5 $mg.l^{-1}$; CASSELS et al., 198O : AIA : O,1 $mg.l^{-1}$). Cependant certains auteurs obtiennent l'enracinement sur le même milieu que celui d'ensemencement (MONCOUSIN, 1978 ; BEAUCHESNE, 198O), DALLOT, 1981).

5) Le problème des plantes non conformes

Généralement les auteurs observent après la culture des méristèmes une meilleure floraison et un gain de vigueur. Mais parfois le protocole expérimental fait apparaître des variants non conformes au phénotype initial. MAMET et al., (1983) remarquent que des milieux trop riches en azote favorisent les malformations.

Pour d'autres auteurs les malformations sont dues à la quantité excessive d'hormone qui favorise la production de cal et la formation de bourgeons non conformes. MONCOUSIN (1978) en utilisant de l'ANA : (O,7 $mg.l^{-1}$) constate des modifications du feuillage, rencontrées également par CASSELS et al. (198O) (15 % des malformations en présence de AIA : 2 $mg.l^{-1}$; Kin : 4 $mg.l^{-1}$; AG_3 : 1 $mg.l^{-1}$). Elles pourraient être dues en partie à l'origine chimérique de nombreux cultivars (tissus de ploïdies différentes : SKIRVIN (1976) ou à l'instabilité du nombre chromosomique (BENICCI, 1974).

6) L'indexage après la culture *in vitro*

Les plantes obtenues sont souvent indemnes de bactéries (BEAUCHESNE et al. (1977), THEILER (1977), DALLOT (1981)) mais MONCOUSIN (1978), qui part d'un lot de plantes infectées, n'obtient que 5 % d'apex survivants qui restent contaminés alors que l'apex prélevé n'est constitué que d'un dôme et 2 ébauches.

Les viroses sont plus difficiles à éliminer puisqu'on ne peut les dépister dans le première phase de culture comme les bactéries. De plus cette élimination dépend du cultivar. (HAKKAERT et al., 1979). DEBERGH et al. (1977) obtiennent des plantes indemnes en prélevant le dôme seul mais BEAUCHESNE et al. (1977) en utilisant des plantes de O,2 à O5 mm récupèrent encore 7 % de viroses.

MATERIEL

ET

METHODES

I - MATERIEL VEGETAL

L'essentiel de notre travail a porté sur un lot de 10 variétés de *Pelargonium* constitué par 5 *P. x hederaefolium* :

- 'Améthyst'
- 'Balcon Imperial'
- 'Roulette'
- 'Super Rose'
- 'Tavira'

et par 5 *P. x hortorum* :

- 'Palais'
- 'Rigler'
- 'Rubin'
- 'Silipen'
- 'Topscore'

Nous l'avons approfondi principalement avec 2 variétés :

1 *P. x hortorum* : 'Topscore' et 1 *P. x hederaefolium* : 'Super Rose'.

Mais nous avons vérifié nos résultats et éprouvé les potentialités de notre milieu standard sur un ensemble de 65 variétés de *Pelargonium* .

Nous avons prélevé les méristèmes sur des rameaux provenant :

- soit de pieds mères maintenus en conditions estivales au laboratoire (16 h-8h ; 20° C) et renouvelés toutes les quinzaines par les Etablissements Philiomel de Lillers ;
- soit de pieds mères cultivés à Salses. Les boutures étaient récoltées la veille et expédiées le lendemain matin par avion à Lille. Dans ce cas les méristèmes étaient ensemencés dès réception des rameaux.

Les pieds mères sont cultivés aux Ets Philiomel, en serre maintenue l'hiver aux environs de 15°C. Il n'y a pas de lumière d'appoint et les plantes subissent les variations de la photopériode extérieure.

II - ASEPSIE

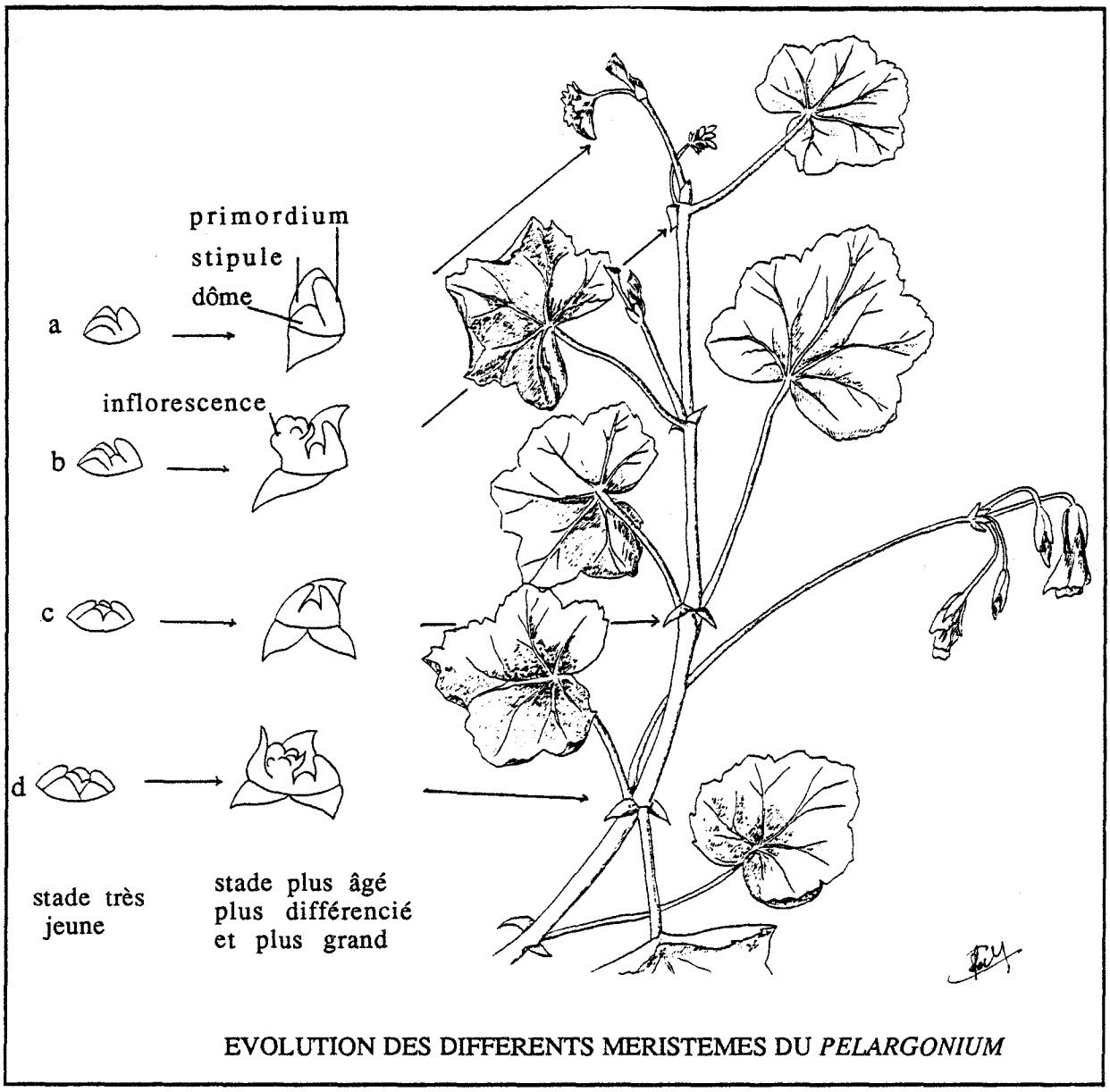
Les rameaux (de 10 à 15 cm de long) sont effeuillés et plongés rapidement dans de l'alcool à 97° dont l'excès est ensuite éliminé. Puis ils sont déposés dans une hotte à flux laminaire où se trouve une loupe binoculaire orientable (B.B.T. Krauss) munie d'un zoom permettant un grossissement de (12,5 x 1,3) à (12,5 x 3,2).

III - PRELEVEMENT DES MERISTEMES

A l'aide de simples scalpels (munis de lame n° 11) nous prélevons (sous la loupe binoculaire) tous les méristèmes se trouvant sur les rameaux ; les stipules et les premières ébauches foliaires sont éliminées avec un 1er scalpel, les primordiums suivants sont sectionnés par un 2ème scalpel et enfin un 3ème scalpel sert à exciser le méristème et à le déposer à la surface du milieu de culture. Le méristème mesure entre 0,2 et 0,5 mm selon la variété et le stade de développement.

IV - DIFFERENTS TYPES DE MERISTEMES

Chez le *Pelargonium* on peut distinguer 4 types de méristèmes dont l'évolution sera différente (cf **PLANCHE I**) :



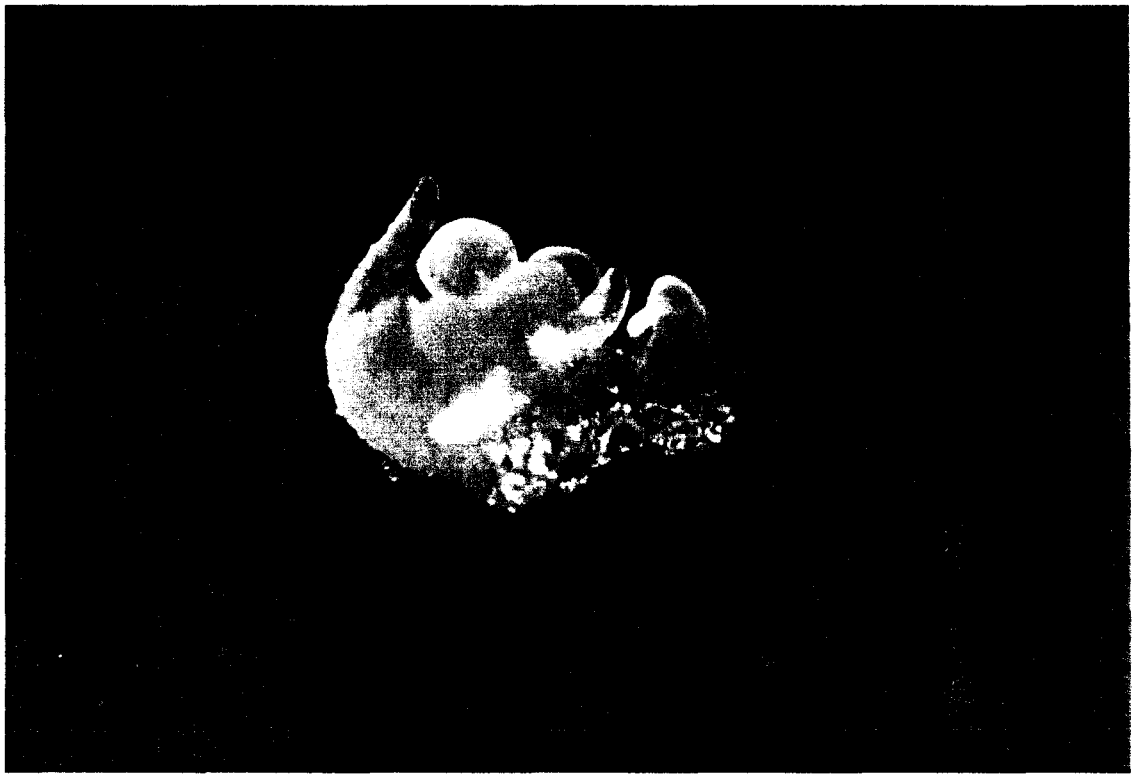
EVOLUTION DES DIFFERENTS MERISTEMES DU *PELARGONIUM*

- 1 feuille et 2 stipules : avec fleur b
  : sans fleur a

ou

- 2 feuilles et 3 stipules : avec fleur d
  : sans fleur c

La taille des méristèmes n'est pas fonction du nombre d'ébauches mais du stade de différenciation. Aussi à un stade très jeune il n'est pas possible de séparer le dôme des stipules sans le léser, mais à un stade plus âgé il est facile de prélever uniquement le dôme entouré d'un ou de 2 primordiums foliaires.



Méristème inflorescentiel et végétatif

Méristème végétatif

PLANCHE I - STRUCTURE DES MERISTEMES DE *PELARGONIUM*

V - LES MILIEUX DE CULTURE

A - Les éléments minéraux et organiques

Les différents éléments que nous avons utilisé sont rassemblés dans les tableaux suivants:

	BEAUCHESNE (1980.)	MURASHIGE et SKOOG (1962)	Macrolabo FEUTRY (1976)	GAMBORG (1968.)	WHITE (1951.)	HELLER (1953.)	Milieu E	Milieu H
(NH4)2SO4	-	-	-	134	-	-	-	-
NH4NO3	800	1650	480	-	-	-	228	113,6
NaNO3	-	-	-	-	-	600	-	-
Na2SO4	-	-	-	-	200	-	-	-
KNO3	1010	1900	600	2500	80	-	361	413,9
Ca(NO3)2,7H2O	944	-	1416	150	300	-	99	531,3
CaCl2,2H2O	-	440	-	-	-	75	-	-
MgSO4,7H2O	492,6	370	492	250	720	250	157	86,3
KH2PO4	272	170	544	-	-	-	118	155
NaH2PO4	-	-	-	150	16,5	125	-	-
KCl	37,2	-	37	-	65	750	-	-

TABLEAU DES MACROELEMENTS UTILISES EN mg.l-1

	BEAUCHESNE (1980.)	MURASHIGE et SKOOG (1962.)	MOREL (1952.)
Mésoinositol	100	100	100
Hydrolysat de caseïne	-	1000	-
Glycocolle	-	2	2
Acide nicotinique	1	0,5	0,5
Pyridoxine HCl	1	0,5	0,5
Thiamine	1	0,1	0,1
Pantothénate de calcium	1	-	-
biotine	0,01	-	-
Glutamine	200	-	-
Adénine	20	-	-

SUBSTANCES ORGANIQUES UTILISEES EN mg.l-1

	MURASHIGE et SKOOG (1962.)
H3BO3	6,2
MnSO4,H2O	16,9
ZnSO4,7H2O	8,6
Ki	0,83
Na2MoO4,2H2O	0,25
CuSO4,5H2O	0,025
CoCl2,6H2O	0,025
FeSO4,7H2O	28
Na2,E.D.T.A,2H2O	37

MICROELEMENTS UTILISES en mg.l-1

MILIEU DE BASE UTILISE (M.B)
Macroéléments MURASHIGE et SKOOG (1962)
Microéléments MURASHIGE et SKOOG (1962)
Vitamines MOREL (1952)
Saccharose 30 g.l-1
pH 5,6
Agar-agar 6 -7 g.l-1

Le milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962) est à l'origine du milieu de base qui a servi à la plupart de nos expériences mais nous avons préféré utiliser le complexe vitaminique de MOREL (1952).

B - Les régulateurs de croissance

Les hormones utilisées au cours de ce travail sont :

- auxines : AIA : acide ß-indolylacétique
  : ANA : acide naphtyl-1-acétique
  : AIB : acide ß-indolylbutyrique

- cytokinines : BA : 6-benzylaminopurine
  : Kin ; Kinétine : 6-furfuryl-aminopurine
  : 2 iP : 2isopentényl adénine
  : Zéatine : 6- (4-hydroxy-3 -méthylbut-2-enyl amino) purine (mixed isomers)

- gibbérellines : GA3 : acide gibbérellique (100 %)
  : GA4 + GA7 : produit regulex gibbérellines A4 et A7
  : GA3 et GA : 80 % acide gibbérellique et 20 % gibbérelline A.

Le matériel est autoclavé pendant 20 minutes à 110 °C.

VI - DEROULEMENT DES CULTURES

Il comprend 3 phases :

- 1 phase de développement :
  (Il s'agit de la technique la plus souvent utilisée dans nos travaux)
  * ensemencement des méristèmes en boîte de Pétri (5 cm) pour les variétés nécessitant une phase de repos d'une semaine sur un milieu sans hormone.
  * repiquage des variétés précédentes ou ensemencement des autres dans les mêmes microtubes (capacité de 2 ml) contenant 1 ml de milieu enrichi en hormone.
  * repiquage en tube à hémolyse (12 x 75 mm) contenant 2 ml de milieu avec hormone.
  * repiquage en petit tube de culture (17 x100 mm) contenant 4 ml de milieu avec hormone.
  * repiquage en tube de culture normal (25 x 150 mm) contenant environ 15 ml de milieu avec hormone.

-1 phase d'enracinement :

  * repiquage en tube de culture normal sur un milieu sans hormone pour favoriser la rhizogenèse.

-1 phase d' acclimatation :

  * La sortie de l'*in vitro* est réalisée en miniserre aux Etablissements Philiomel de Lillers.

Pour chaque condition 15 à 2O méristèmes sont ensemencés.

La durée moyenne de passage dans un tube de dimension donnée est de 2O jours.

Le système de conditionnement doit s'adapter au développement du méristème au fur et à mesure que celui-ci grandit.

Notons que les tubes de culture sont fermés hermétiquement pour éviter le dessèchement au cours des repiquages. Les parties nécrosées et les échantillons présentant des signes de "vitrification" sont systématiquement éliminés.

VII - LA SALLE DE CULTURE

Les cultures sont entreposées dans une chambre climatisée où règne une température de 22 ± 2° C le jour et 2O ± 2° C la nuit ainsi qu'une photopériode de 12 h de lumière pour 12 h d'obscurité.

Les tubes de culture sont maintenus un peu à l'écart des tubes fluorescents de type "blanc de luxe" ou "gros lux" pour limiter l'oxydation des phénols. L'intensité lumineuse est donc assez faible (3-4 W/m^2).

VIII - EVALUATION DES RESULTATS

Afin de déterminer les conditions optimales à la culture de méristèmes nous avons retenu et mesuré tous les 2O jours les critères suivants :

- la taille du méristème développé (ne comprenant jamais le cal à la base)
- la présence de cal à la base
- la présence de nécroses partielles ou totales
- la vitrification des méristèmes
- le développement des bourgeons axillaires
- le nombre de méristèmes ayant fourni au moins une plante (et non pas le nombre de plantes obtenues à la fin de l'expérience en fonction de la quantité de méristèmes ensemencés)
- le temps d'obtention d'une plante.

Mais seuls les critères pouvant apporter des éléments de réflexion figureront sur nos graphiques.

RESULTATS

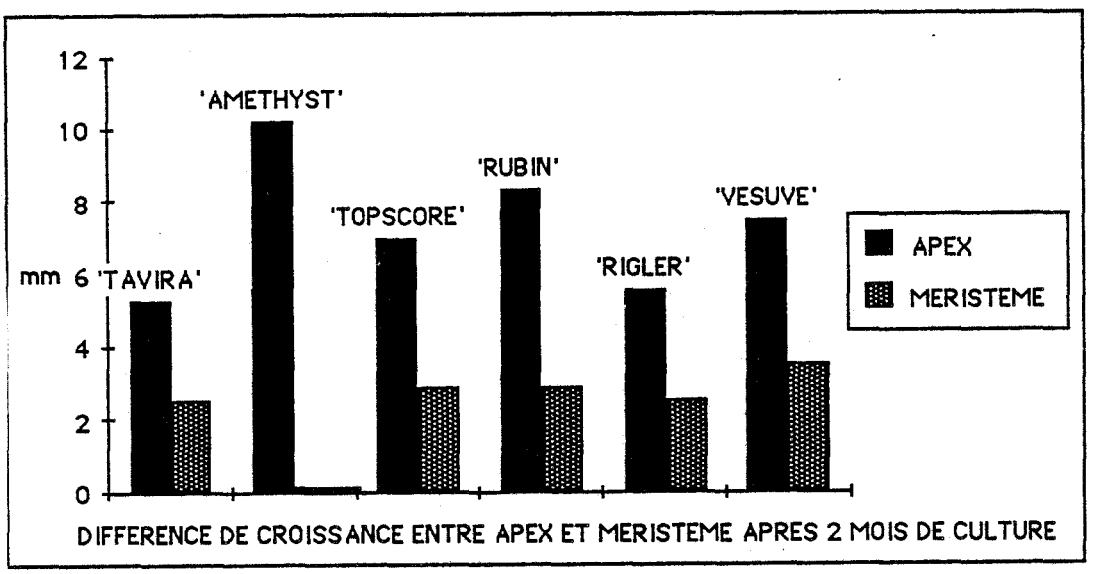
I - LES MERISTEMES

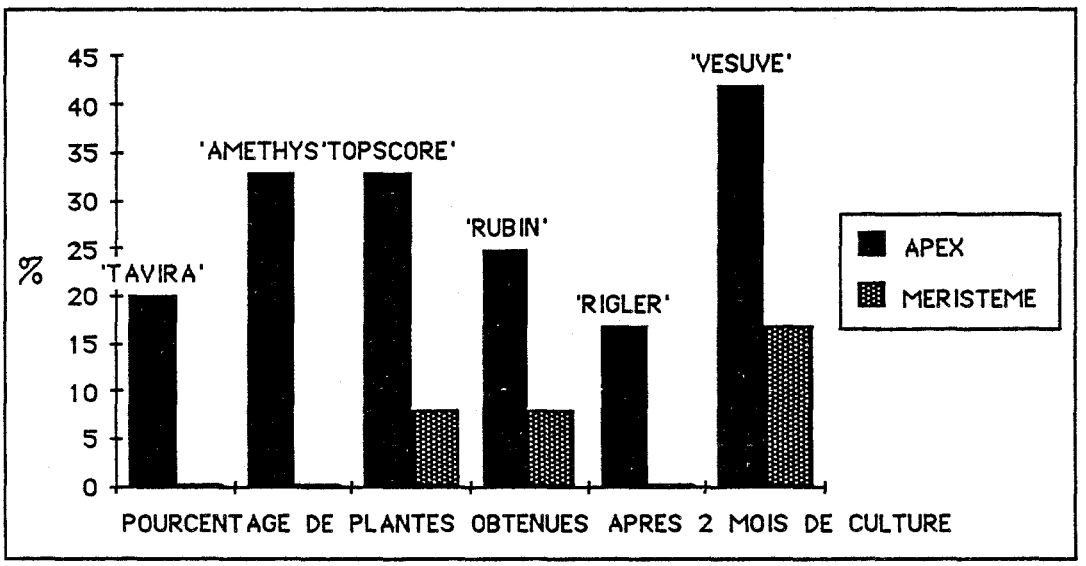
A - La taille de l'explant

Plus les explants mis en culture sont de grande taille, plus les équilibres endogènes sont déterminants et l'influence du milieu de culture limitée. C'est ce que nous avons essayé de vérifier lorsque notre milieu de culture n'était pas encore au point sur des méristèmes de 0,2 - 0,5 mm et des explants plus gros (apex:1mm) de différentes variétés.

Le milieu de culture utilisé pour les *P. x hederaefolium* ('Tavira' - 'Amethyst') est le Macrolabo (FEUTRY, 1976) (AIA : 0,1 mg.l^{-1} ; BA : 0,1 mg.l^{-1}) et le MURASHIGE et SKOOG (1962) (ANA : 0,1 mg.l^{-1} ; 2 iP : 1 mg.l^{-1}) pour les *P. x hortorum* ('Topscore' - 'Rubin' - 'Rigler' - 'Vesuve').

Les résultats sont relevés après 2 mois de culture.





Les résultats obtenus confirment que le développement est fonction de la taille de l'explant. Cependant, les plantes provenant d'explants plus gros manisfestent plus de déformations sans doute parce que l'équilibre hormonal utilisé avait été établi avec des méristèmes dont les besoins étaient différents.

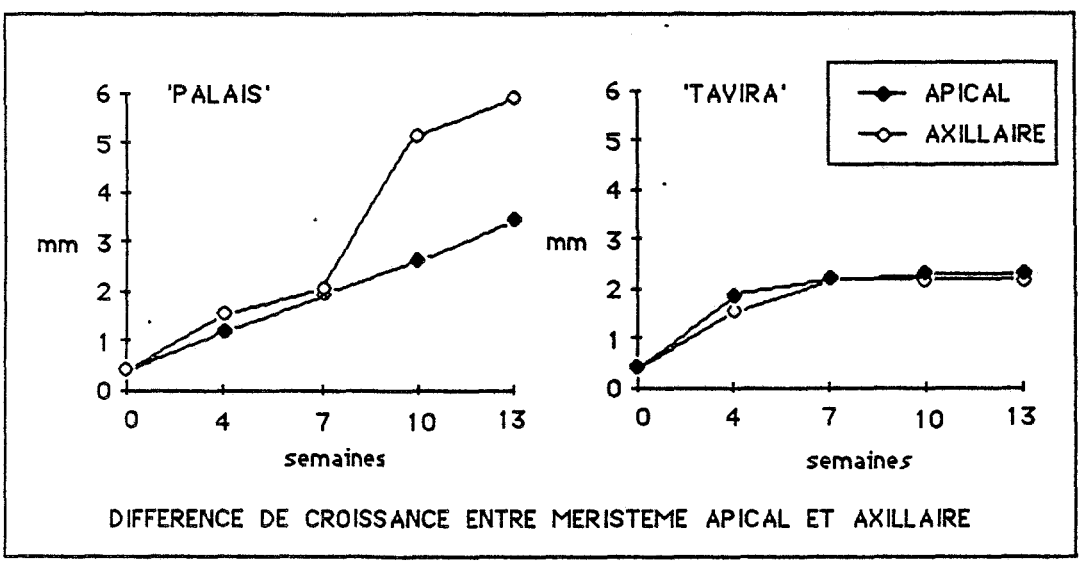
B - Méristèmes apicaux et axillaires

La croissance d'un explant est souvent fonction du lieu de son prélèvement. Or sur les tiges de *Pelargonium* nous observons souvent un phénomène de dominance apicale qui permet au bourgeon apical de se développer en inhibant les bourgeons axillaires. Il est donc possible que les méristèmes prélevés au sommet prolifèrent mieux que ceux prélevés au niveau des bourgeons axillaires.

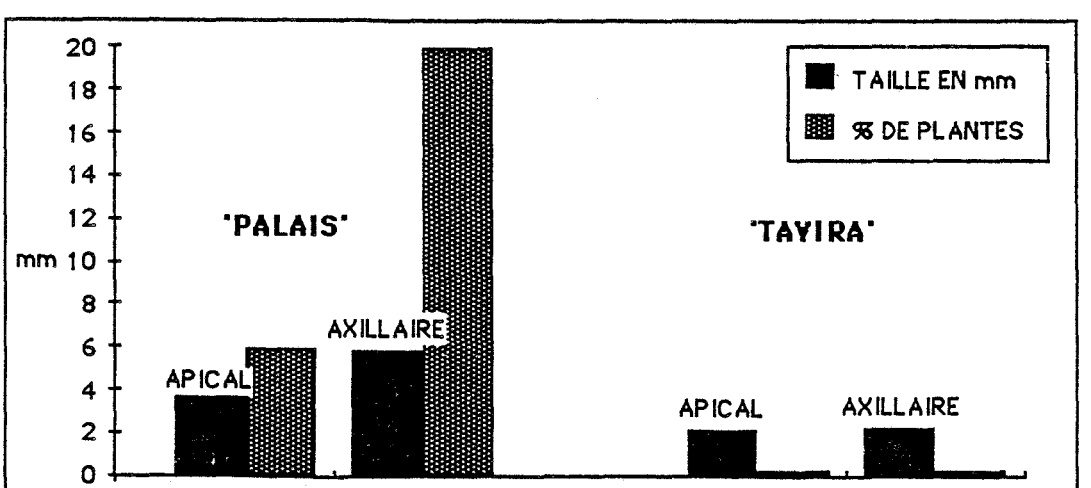
Le milieu utilisé est le milieu de base additionné de zéatine (O,1 mg.l-1) précédé d'une culture en présence de charbon actif.

Les cultivars employés sont 'Palais' (*P. x hortorum*) et 'Tavira' (*P x hederaefolium).*

Les résultats sont relevés toutes les 3 semaines.



DIFFERENCE DE CROISSANCE ENTRE MERISTEME APICAL ET AXILLAIRE



INFLUENCE DE L'ORIGINE DU MERISTEME SUR LA TAILLE MOYENNE ET LE POURCENTAGE DE PLANTES OBTENUES APRES 13 SEMAINES DE CULTURE

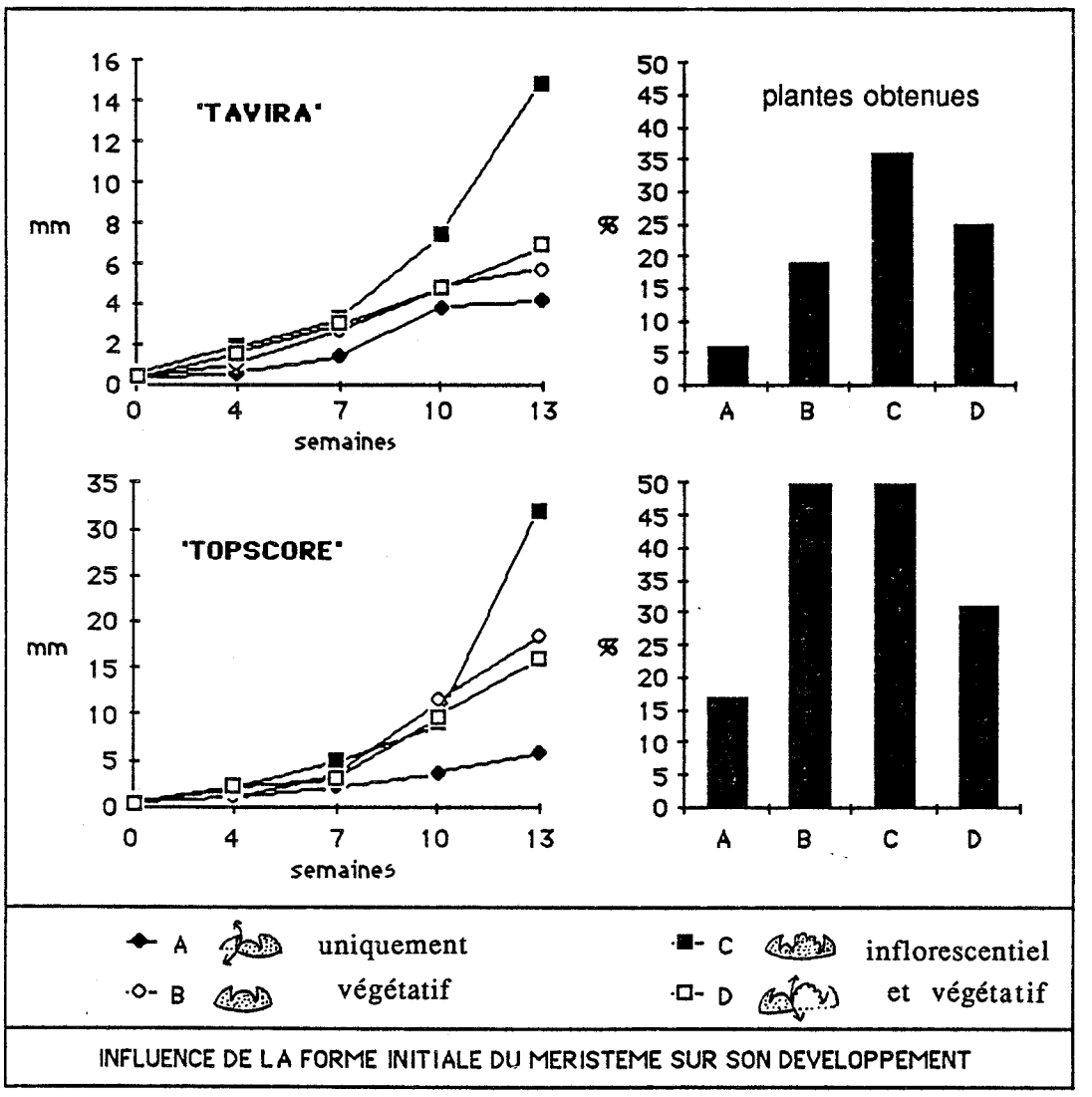
Il s'avère que les méristèmes apicaux n'ont pas un meilleur développement que les axillaires, la tendance est plutôt inverse. il est donc inutile d'ensemencer uniquement des apex pour augmenter les résultats en période défavorable. Il serait cependant intéressant de renouveler cette expérience en période favorable.

C - La forme du méristème

Nous avons vu précédemment qu'il existe plusieurs types de méristèmes sur une tige de *Pelargonium* (cf Matériel et Méthodes, IV). Ces méristèmes sont inflorescentiels ou non et pourvus d'une ou deux ébauches foliaires, la présence d'une inflorescence n'empêchant pas l'existence d'un dôme végétatif à son aisselle.

Nous avons voulu déterminer si la mise en place de l'inflorescence était un obstacle au développement et vérifier l'importance du nombre d'ébauches foliaires entourant le dôme lors de la mise en culture.

L'expérimentation est réalisée sur le milieu de base en présence de zéatine (O,1 mg.l^{-1}) avec les cultivars 'Tavira' (*P. x hederaefolium*) et 'Topscore' (*P. x hortorum*). Les résultats sont relevés tous les 2O jours après 1 phase d'une semaine sur milieu de base et charbon actif 1 g. l^{-1}.



INFLUENCE DE LA FORME INITIALE DU MERISTEME SUR SON DEVELOPPEMENT

En début de culture les différences sont faibles et difficiles à interpréter. Mais après 13 semaines, il s'avère que la présence d'une inflorescence ne nuit pas à la croissance du dôme végétatif. Notons pourtant que ces ensembles à la fois végétatifs et inflorescentiels possèdent des primordiums foliaires bien plus développés que les méristèmes uniquement végétatifs. Ils sont par conséquent plus riches en substances endogènes ce qui explique sans doute leur développement ultérieur plus important et ainsi leurs plus grandes chances d'évoluer en plante grâce à une plus grande indépendance du milieu de culture.

Quant aux inflorescences qui accompagnent les dômes végétatifs, il est probable qu'elles avortent (après un mois de culture, elles ne sont plus visibles) car il est peu vraisemblable qu'ensemencées à ce stade de développement elles puissent réverser.

Nous n'avons pas observé de relation entre les différents types de méristèmes prélevés et la présence de cal, de nécrose ou de vitrification à la base des explantats.

Il est possible que les ébauches inflorescentielles avant de disparaître apportent au méristème végétatif à son aisselle, des substances capables de stimuler son développement. Dans le cas contraire notre expérimentation revient donc à considérer surtout la taille et le nombre de primordiums foliaires puisque le développement des explants et le rendement en plantes est d'autant plus important que les ébauches sont grandes et nombreuses . Mais il ne faut pas dépasser le stade de 2 primordiums si l'on veut éliminer bactéries et virus.

II - CONDITIONNEMENT

A - Influence du "flaconnage"

L'emploi de petits tubes à hémolyse pour l'ensemencement de méristèmes est très courant. Cette pratique peut avoir plusieurs objectifs :

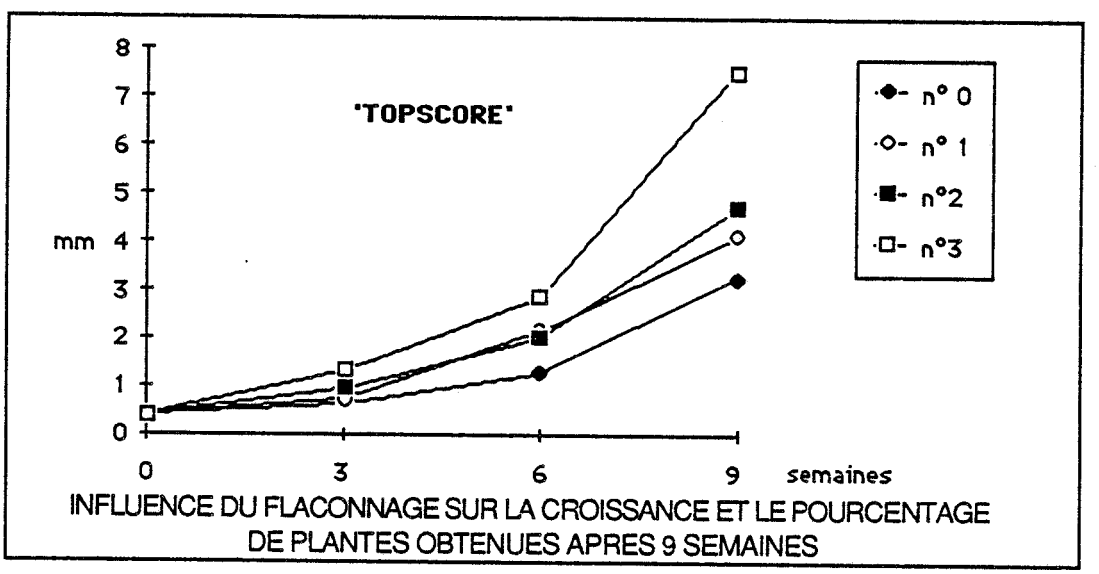
- réaliser des économies car les méristèmes étant très petits, ils n'ont pas besoin d'une grande quantité de milieu.
- utiliser un récipient à la dimension de l'explant, ce qui est plus pratique et prend moins de place dans la pièce à culture.
- améliorer la croissance de l'explant.

Nous avons donc essayé de déterminer si cette technique était davantage pratique, économique ou utile au développement.

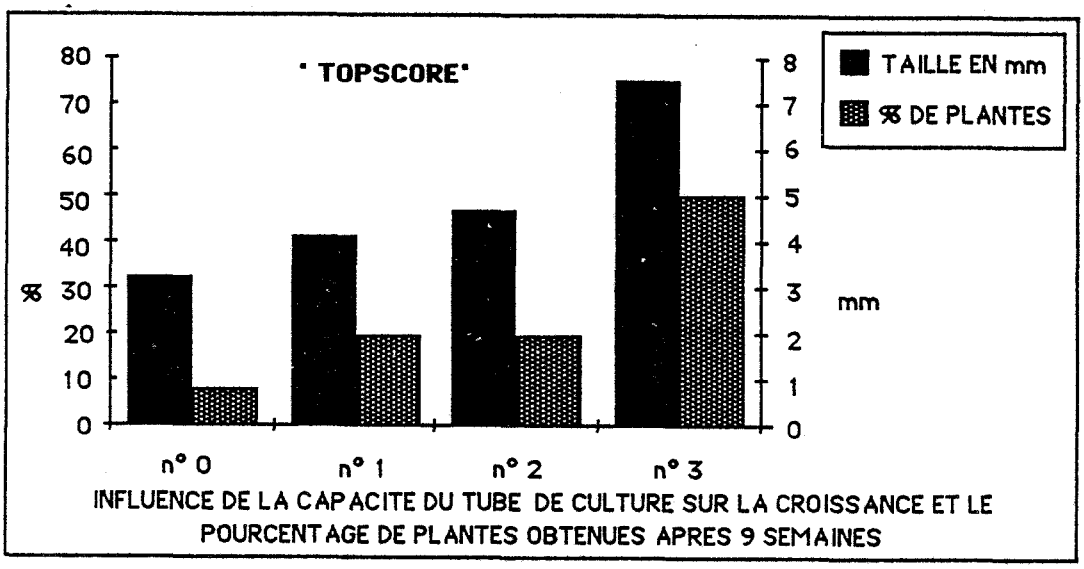
Pour cela nous avons utilisé 4 types de tubes de culture :

- tube n° O : tube de culture ordinaire (25 x 160 mm)
- tube n° 1 : tube de culture moyen (100 x 13 mm)
- tube n° 2 : tube de culture petit (80 x 12,5 mm)
- tube n° 3 : tube de culture très petit (45 x 12,5 mm).

L'expérimentation a été réalisée avec un seul cultivar : 'Topscore' (*P. x hortorum*) en période favorable. Le milieu d'ensemencement est dépourvu d'hormones mais les repiquages ont lieu sur du milieu de base en présence de zéatine (0,1 mg.l-1) et en tubes de culture ordinaire (n°0) .



INFLUENCE DU FLACONNAGE SUR LA CROISSANCE ET LE POURCENTAGE DE PLANTES OBTENUES APRES 9 SEMAINES



INFLUENCE DE LA CAPACITE DU TUBE DE CULTURE SUR LA CROISSANCE ET LE POURCENTAGE DE PLANTES OBTENUES APRES 9 SEMAINES

La croissance est d'autant plus importante que le tube employé au départ est petit. Ceci se répercute encore, lorsque les explants sont transférés dans des tubes plus grands, ce qui souligne l'importance de la phase d'ensemencement.

Le nombre de plantes obtenu est proportionnel à la vitesse de la croissance initiale. Trois hypothèses permettent d'interpréter ces résultats :

- le volume restreint de milieu pourrait être facilement "conditionné" par le méristème de petite taille.

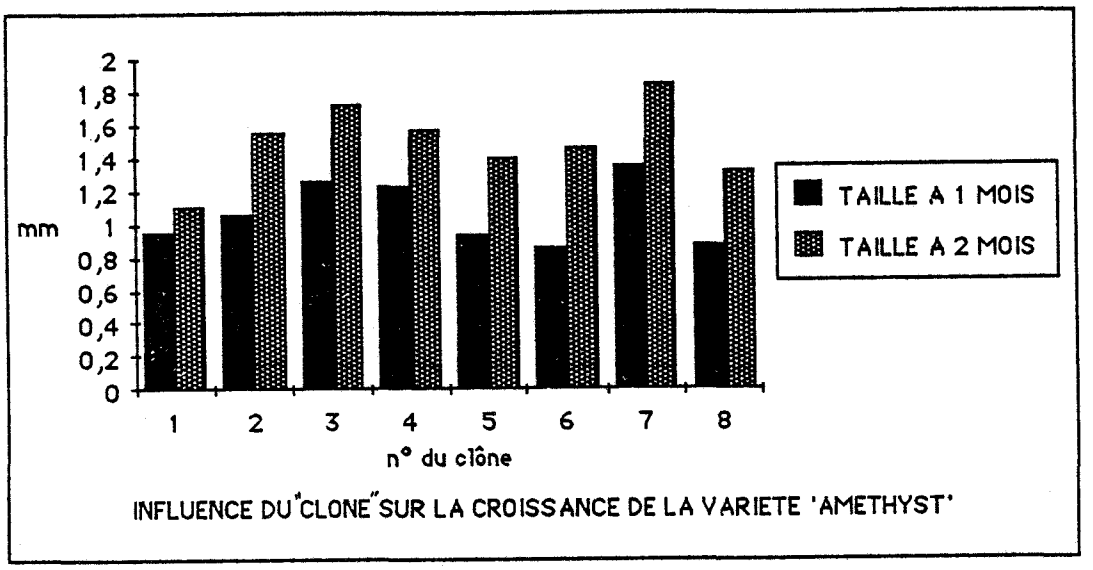
- l'hygrométrie dans les petits tubes serait plus importante et par la suite plus favorable au développement des méristèmes.

- la quantité de milieu dans les petits tubes est réduite et serait plus appropriée aux besoins d'un explant de petite taille.

B - Influence du pied mère

Pour augmenter le pourcentage de plantes obtenues en période favorable nous avons vérifié dans une même variété si les différents "clônes" réagissent différemment ou non.

Le cultivar employé pour l'expérimentation est 'Amethyst' (*P. x hederaefolium*). Les résultats sont relevés après 1 et 2 mois sur le milieu de base (zéatine : O,1 mg.l-1) en période défavorable.



INFLUENCE DU "CLONE" SUR LA CROISSANCE DE LA VARIETE 'AMETHYST'

Si des différences apparaissent cela peut être dû aux conditions expérimentales dans la mesure où au moment du prélèvement les méristèmes ne sont pas rigoureusement identiques ou encore au fait que l'état physiologique des pieds mères n'est pas exactement le même. Toutefois les différences d'un "clone" à l'autre ne sont pas telles qu'elle puissent permettre une véritable sélection à ce niveau.

C - Conditionnement du milieu

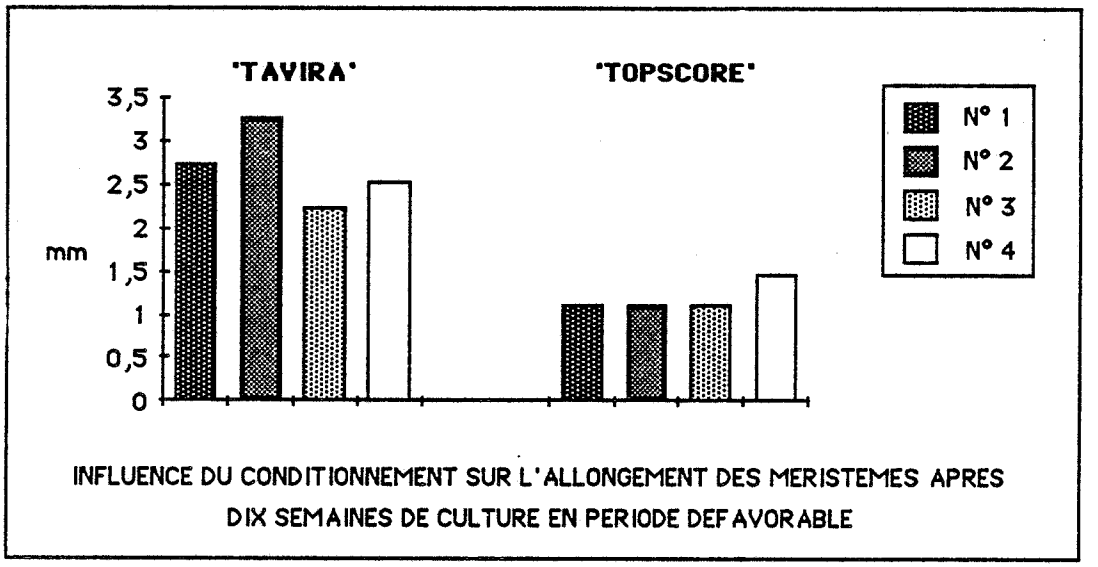
3 conditionnements différents de milieux ont été essayés (N°1, N°2, N°3) et comparés au milieu témoin (N°4).

N°1 - Il est bien connu que les gibbérellines sont des hormones qui permettent le fonctionnement des méristèmes et stimulent l'élongation des tiges. Toutefois les gibbérellines exogènes, les plus couramment utilisées (cf résultats ,VI, C) ne sont pas efficaces sur l'allongement des méristèmes de *Pelargonium*. On pouvait penser que les *Pelargonium x hederaefolium* qui ont l'aptitude à développer des entrenoeuds plus longs renferment plus de gibbérellines : nous avons voulu vérifier si leurs feuilles étaient capables de relarguer dans le milieu de culture des substances efficaces sur l'allongement. Pour cela nous avons ensemencé ensemble des feuilles et des méristèmes.

N°2 - Les méristèmes prélevés sont de très petite taille aussi leurs réserves en substances endogènes sont faibles. Nous avons donc voulu voir si en augmentant le nombre de méristèmes sur un même volume de milieu, il était possible de "conditionner" celui-ci.

N°3 - Un autre problème consiste à définir si la croissance est meilleure en petits tubes parce que la quantité de milieu est réduite ou l'atmosphère saturée en humidité, nous avons donc doublé la quantité de milieu.

Les variétés "Topscore" (*P. x hortorum*) et "Tavira" (*P. x hederaefolium*) sont ensemencées une semaine sur du milieu de base additionné de charbon actif avant d'être repiquées dans les différentes conditions énumérées (n°1, 2, 3, 4) en présence de zéatine (O,1 mg. l^{-1}).



INFLUENCE DU CONDITIONNEMENT SUR L'ALLONGEMENT DES MERISTEMES APRES DIX SEMAINES DE CULTURE EN PERIODE DEFAVORABLE

Il apparaît à l'issue de cette expérience quelques différences plus prononcées pour le *P. x hederaefolium* que pour le *P. x hortorum* puisque sa croissance est plus importante. Toutefois ces différences rencontrées chez le *P.x hederaefolium* ne sont pas tangibles , elles pourraient être simplement dues au hasard, et ne sont pas suffisantes pour permettre un développement ultérieur des cultures qui se nécrosent toutes après 1O semaines.

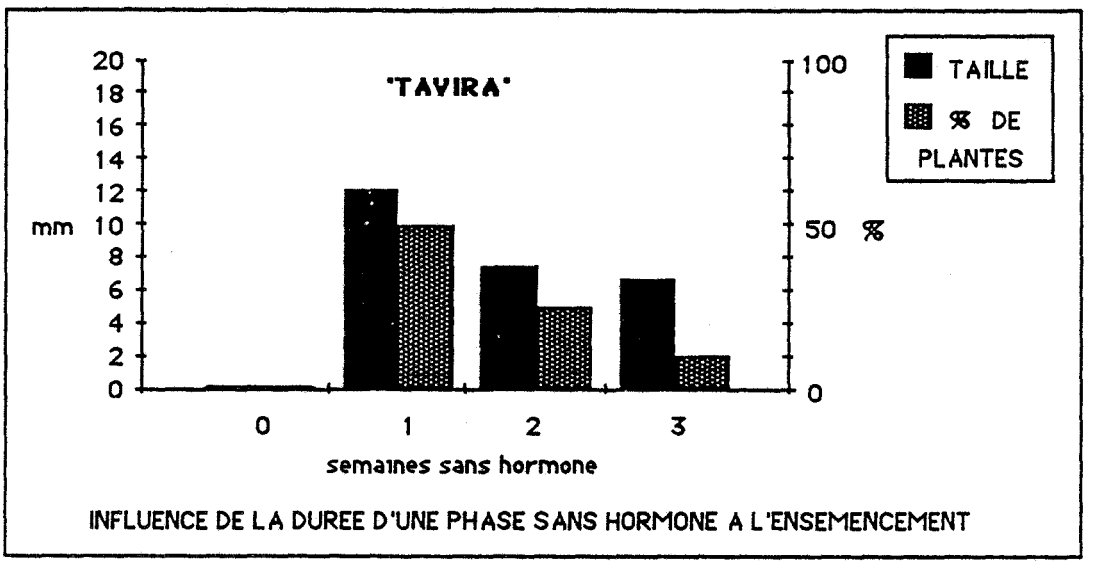
Toutes ces tentatives de conditionnement n'ont pas permis de réveiller les méristèmes en période défavorable.

D - Conséquences d'un passage de durée déterminée sur un milieu sans hormone à l'ensemencement

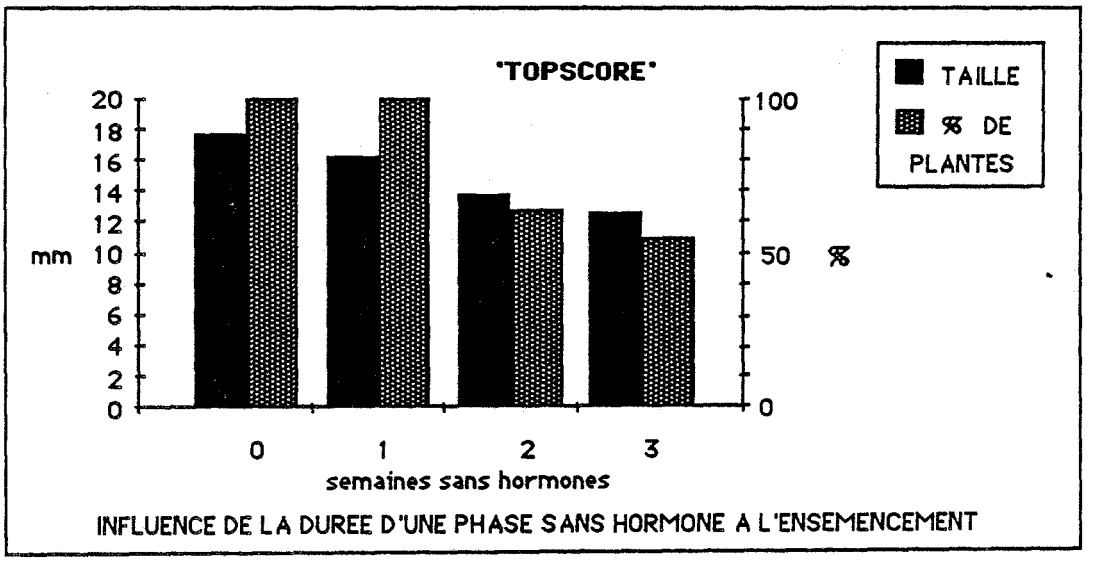
Le but de cette expérience est de savoir si les hormones doivent être appliquées dès la mise en culture ou après un certain délai et d'examiner la durée optimale de ce délai.

Les cultivars utilisés sont 'Topscore' (*P. x hortorum*) et 'Tavira' (*P. x hederaefolium*) . Le milieu est celui de base dépourvu d'hormone en première phase puis additionné de zéatine (O,1 mg.l^{-1}).

Les résultats sont relevés après 12 semaines.



INFLUENCE DE LA DUREE D'UNE PHASE SANS HORMONE A L'ENSEMENCEMENT



INFLUENCE DE LA DUREE D'UNE PHASE SANS HORMONE A L'ENSEMENCEMENT

Outre la différence de croissance pour 'Topscore' et 'Tavira' dues à l'hybride *(hederaefolium ou hortorum)* et à la variété, il y a une différence essentielle : le *P. x hortorum* est beaucoup moins sensible aux hormones que le *P. x hederaefolium* et il peut ainsi supporter immédiatement la présence d'hormone.

Si le *P. x hederaefolium* est ensemencé immédiatement sur un milieu contenant de la zéatine, il n'y a pas de développement en plante mais formation de cal et de bourgeons vitrifiés. Par conséquent une période de latence sans hormone d'une semaine est plus favorable au développement ultérieur des *P. x hederaefolium*, mais il ne faut pas excéder ce délai sous peine de diminuer la croissance et le nombre de plantes obtenues en fin de culture;ceci vaut également pour le *P. x hortorum.*

Ajoutons encore qu'au moment où s'est déroulée l'expérience(1985), le % de plantes de *P. x hortorum* obtenu, était le même avec application directe ou différée d'une semaine de zéatine . Mais les méristèmes ensemencés immédiatement sur un milieu pourvu d'hormone avaient mieux proliféré et émettaient davantage de bourgeons axillaires (risque possible également de bourgeons néoformés) d'où notre préférence pour un démarrage plus lent mais évoluant plus surement vers une plante.

III - LE MILIEU MINERAL

A - Choix du milieu minéral

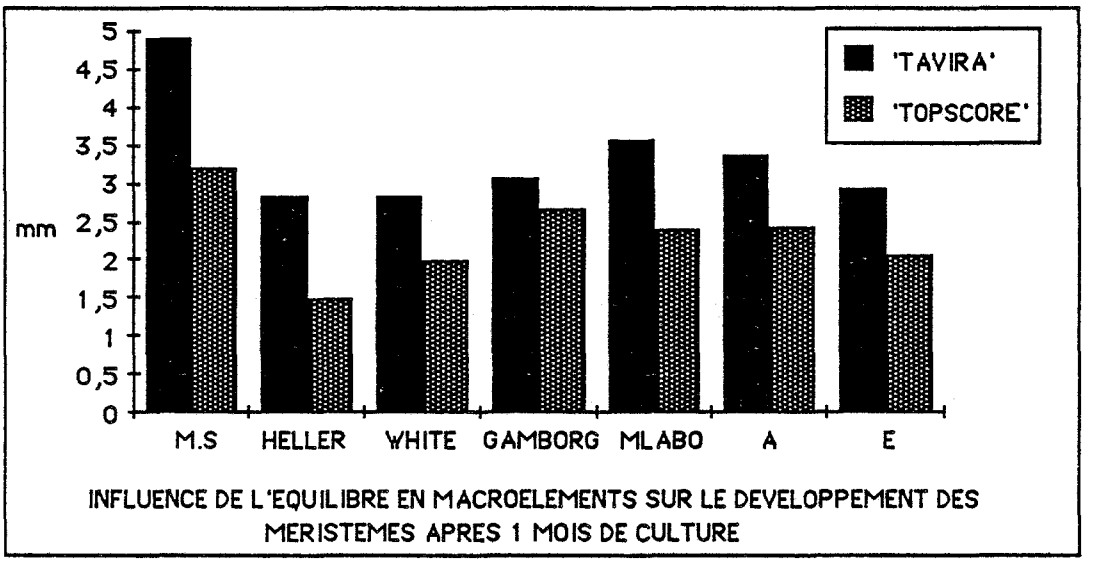
Nous avons essayé de déterminer l'équilibre en macroéléments le plus favorable à la reprise des méristèmes.

Pour cela nous avons comparé les macroéléments des milieux couramment utilisés en micropropagation à l'équilibre minéral que nous avons élaboré d'après les rapports utilisés pour les engrais (milieu E.) ou pour les cultures hydroponiques (milieu H.) de *Pelargonium* (DARTIGUES et al., 1980) (cf tableaux des milieux chapitre Matériel et Méthodes, V,A).

Les microéléments et les vitamines de MURASHIGE et SKOOG (1962) et un mélange hormonal (AIA. : O,1 $mg.l^{-1}$; BA : O,1 $mg.l^{-1}$; AG : O,5 $mg.l^{-1}$) compléteront les différentes solutions de macroéléments.

Les variétés employées pour cette expérimentation sont 'Topscore' *(P. x hortorum)* et 'Tavira' *(P. x hederaefolium).*

Les résultats sont relevés après un mois de culture. Cette expérience n'a pu être poursuivie, des nécroses intervenant après 2 mois de culture.



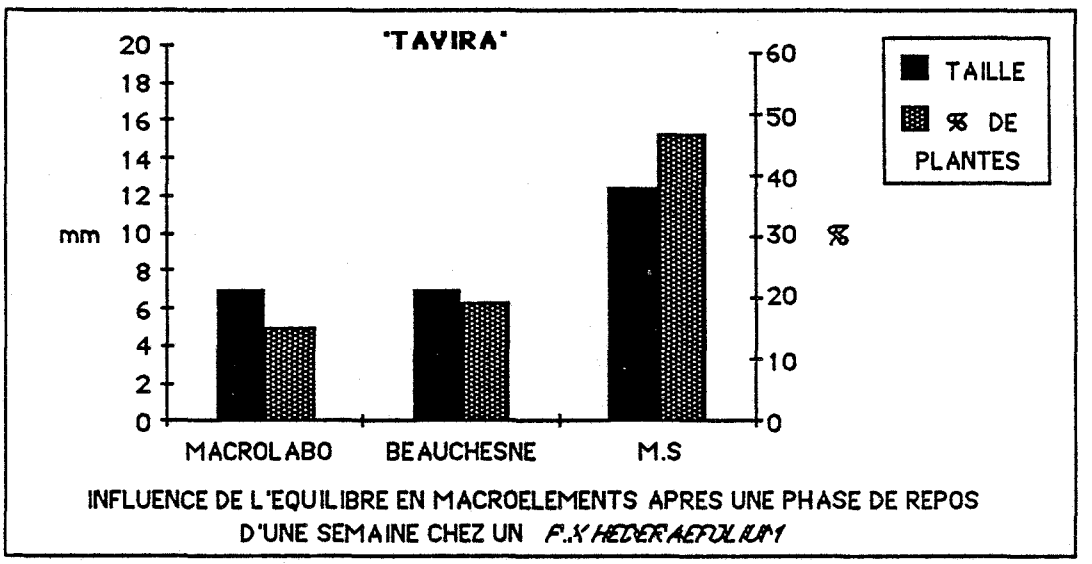
INFLUENCE DE L'EQUILIBRE EN MACROELEMENTS SUR LE DEVELOPPEMENT DES MERISTEMES APRES 1 MOIS DE CULTURE

Le milieu minéral entraînant la plus forte activation est le milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962) pour les 2 variétés.

Notons cependant que 'Tavira' n'a pas un aspect normal et présente trop de cals, de déformations et de symptômes de vitrosité. Il est donc préférable pour cette variété de la cultiver sur un milieu plus pauvre tel le Macrolabo (FEUTRY, 1976).

B - Choix d'un milieu minéral après une phase de repos chez les *P.x hederaefolium.*

Par la suite nous avons préféré employer des substances de croissance (zéatine : O,1 $mg.l^{-1}$) uniquement après une phase de repos correspondant à un ensemencement d'une semaine sur un milieu dépourvu d'hormone mais contenant du charbon actif : 1 $mg.l^{-1}$. Nous avons alors voulu déterminer s'il était toujours nécessaire d'employer un milieu pauvre pour les *P. x hederaefolium*. Les résultats sont relevés après 13 semaines de culture chez le cultivar 'Tavira' (*P. x hederaefolium*).



INFLUENCE DE L'EQUILIBRE EN MACROELEMENTS APRES UNE PHASE DE REPOS D'UNE SEMAINE CHEZ UN *P.X HEDERAEFOLIUM*

La nouvelle technique d'ensemencement qui consiste à procurer une phase de repos d'une semaine (en les ensemençant sur un milieu sans hormone) permet ensuite aux *P. x hederaefolium* d'être repiqués sur des milieux riches comme celui de MURASHIGE et SKOOG (1962). Elle permet un meilleur développement tout en limitant des inconvénients comme la présence de cal et de vitrosités.

C'est donc l'absence ou la présence d'hormone dans le milieu d'ensemencement qui détermine la richesse plus ou moins importante en éléments minéraux du milieu de culture des *P. x hederaefolium*. Il devient dès lors possible d'employer un même milieu de culture (riche) pour les 2 types d'hybrides.

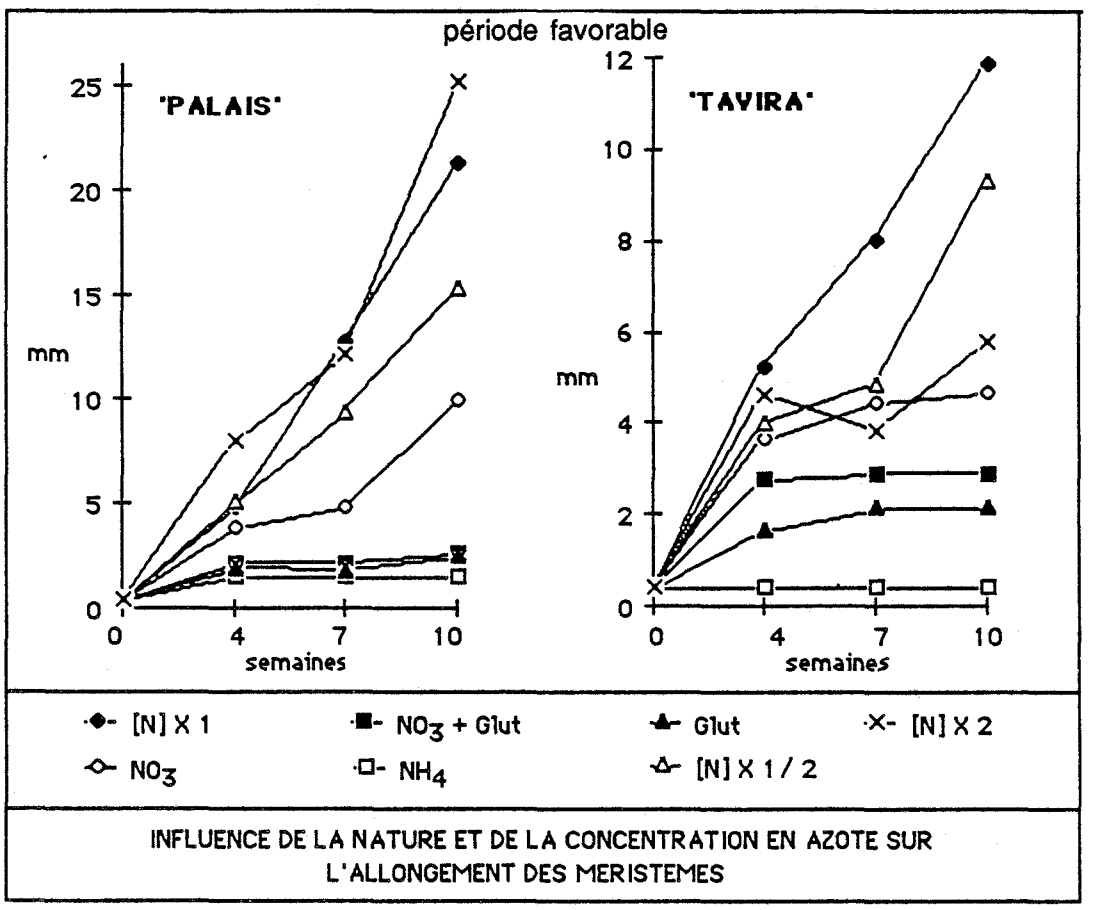
C - Rôle de l'azote

L'azote est l'élément minéral le plus important dans la constitution d'une plante. De plus, les méristèmes sont des tissus caractérisés par une prolifération cellulaire intense, donc par une synthèse protéique importante. Il était donc nécessaire de déterminer la concentration optimale d'azote, et la source d'azote la plus favorable.

Le milieu utilisé est le milieu de base dont on fait varier les 6O,O5 mM. l^{-1} d'éléments azotés (nitrates : 39,43 mM. l^{-1} et ammonium : 2O,62 mM. l^{-1}).

Les repiquages sont réalisés en présence de zéatine (O,1 mg.l^{-1}) et les résultats relevés toutes les 3 semaines (cf **PLANCHE II**).

1) Rôle de l'azote sur la croissance

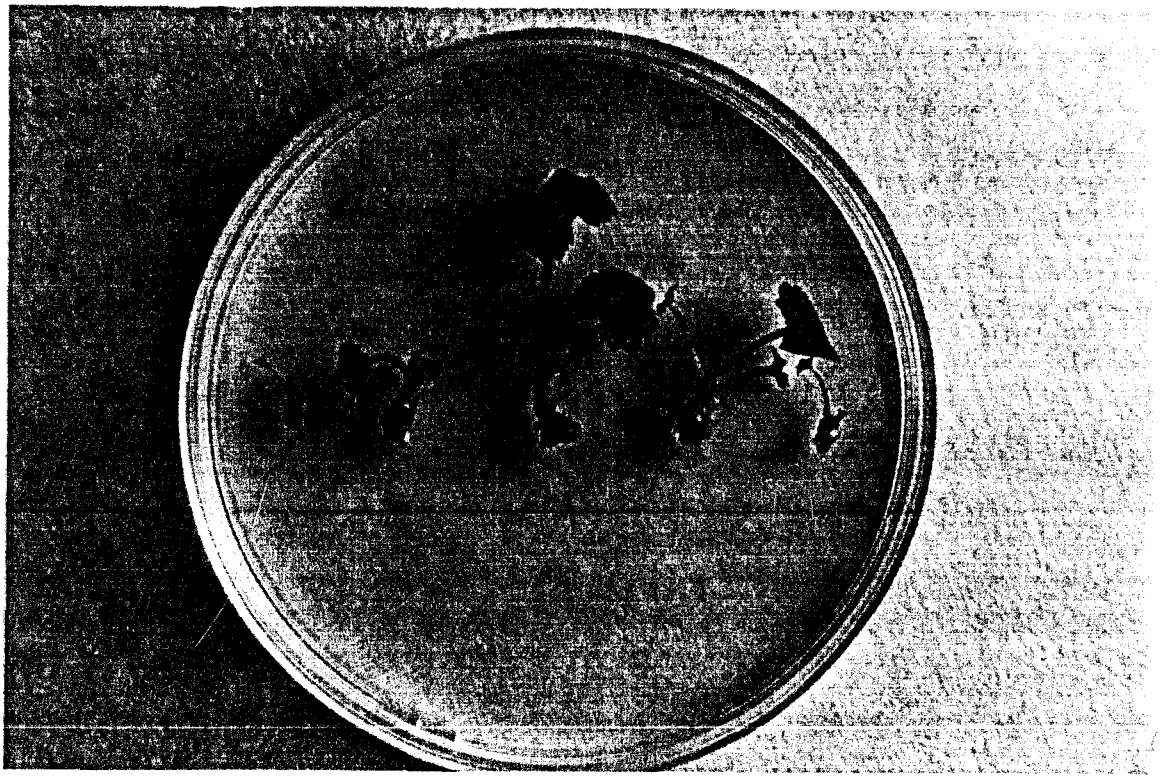


INFLUENCE DE LA NATURE ET DE LA CONCENTRATION EN AZOTE SUR L'ALLONGEMENT DES MERISTEMES

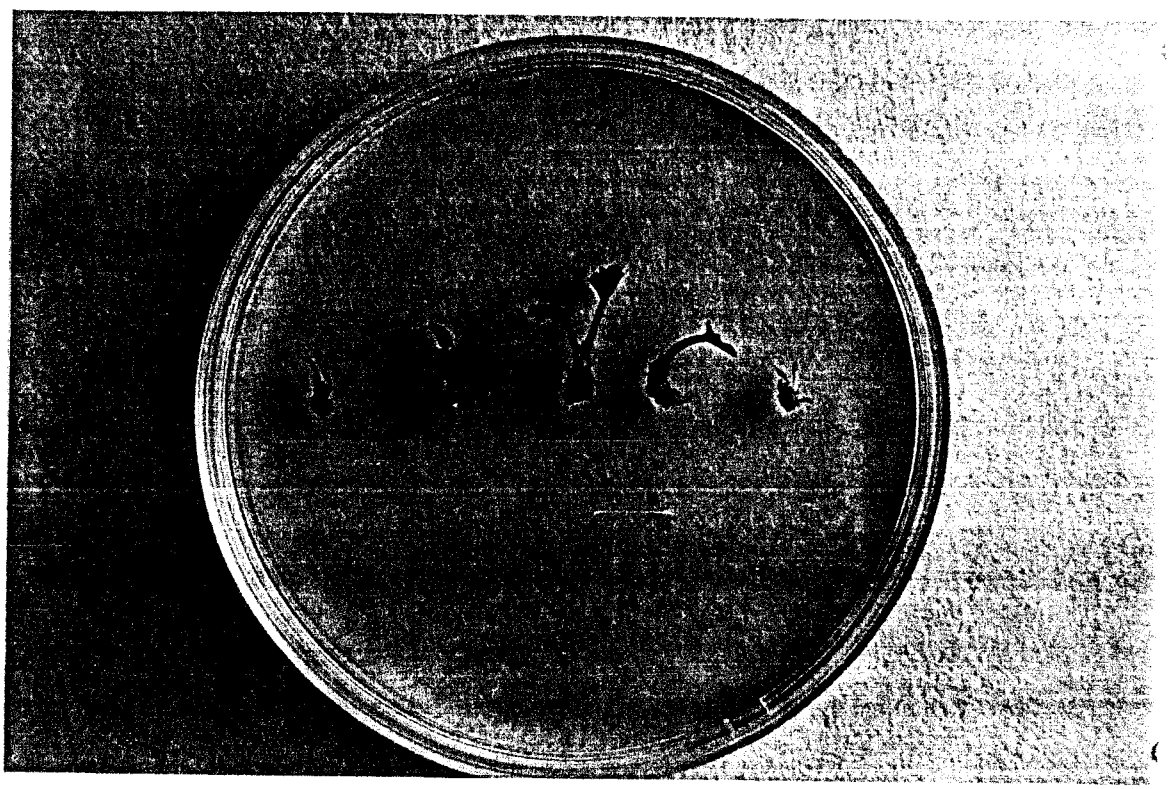
Les taux de croissance enregistrés sont les plus faibles lorsque la source azotée est constituée uniquement d'ammonium (6O,O5 mM. l^{-1}), uniquement de glutamine (6O,O5 mM. l^{-1}), ou de nitrates (39,43 mM. l^{-1}) associés à de la glutamine (2O,62 mM. l^{-1}) remplaçant l'ammonium du milieu de base.

La condition où seul le nitrate est employé (6O,O5 mM. l^{-1}) est moins toxique que les précédentes, mais beaucoup moins efficace sur la croissance que l'association nitrates (19,71 mM. l^{-1}) et ammonium (1O,31 mM. l^{-1}).

L' augmentation de la teneur en azote par rapport au témoin (nitrates : 78,86 mM. l^{-1} et ammonium : 41,24 mM. l^{-1}) provoque une réaction différente chez les 2 variétés. Cela accélère la croissance des *P. x hortorum* mais ralentit celle des *P. x*



De gauche à droite: 10, 20, 30, 40, 50 g.l-1 de saccharose
var : 'TAVIRA' (*P.x hederaefolium*)



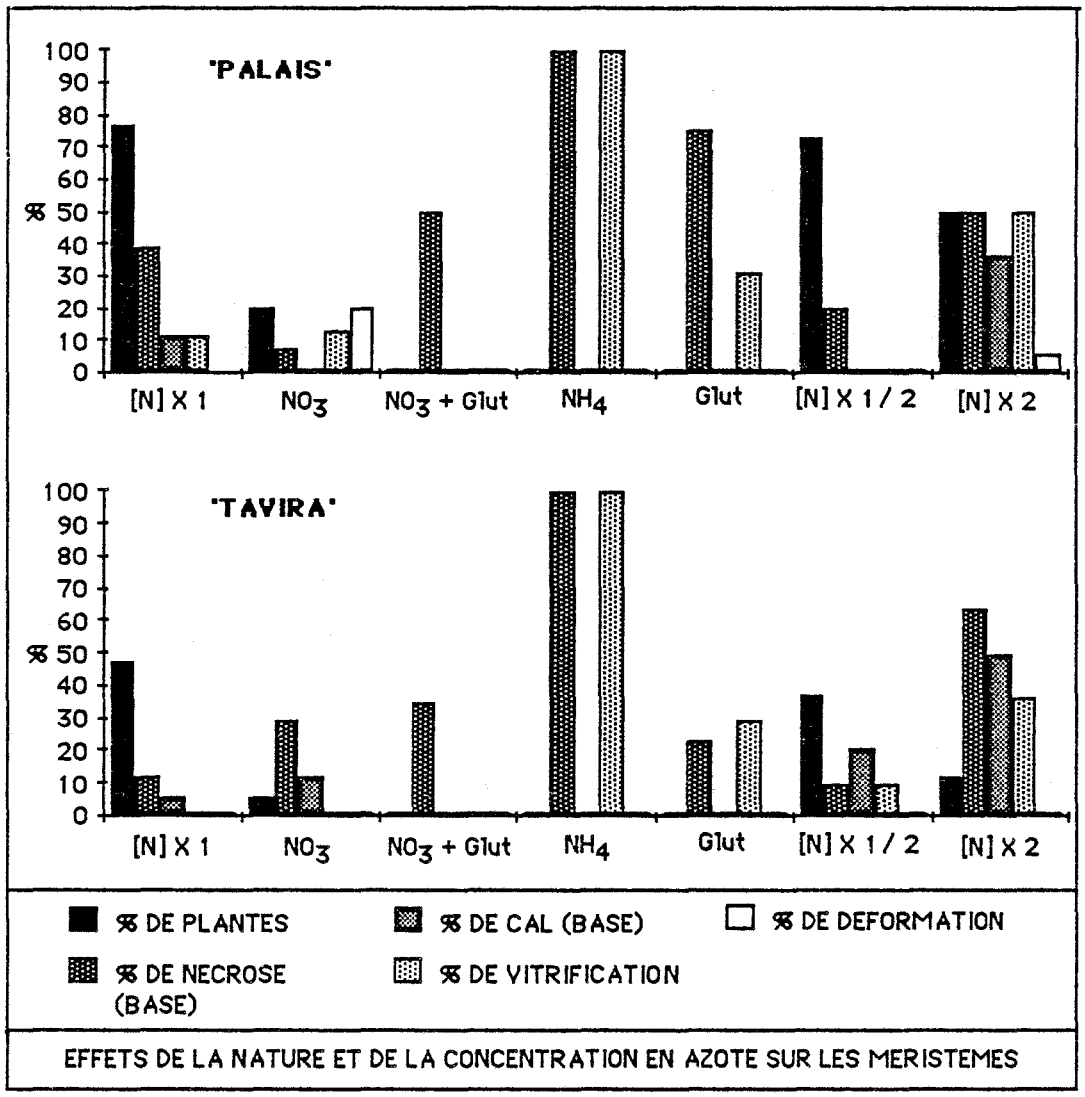
De gauche à droite: 10, 20, 30, 40, 50 g.l-1 de saccharose
var : 'PALAIS' (*P.x hortorum*)

PLANCHE III - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SACCHAROSE SUR LE DEVELOPPEMENT DES MERISTEMES

hederaefolium qui semblent beaucoup plus sensibles à l'excès d'azote.

Il s'avère donc que l'association nitrate-ammonium est indispensable pour un bon allongement des méristèmes. Cet allongement peut encore être accru ches les *P. x hortorum* en doublant la source azotée du témoin.

2) Rôle de l'azote sur le rendement en plante



EFFETS DE LA NATURE ET DE LA CONCENTRATION EN AZOTE SUR LES MERISTEMES

Le rendement en plantes est en partie proportionnel à la vitesse de croissance, et mesuré dans les 3 conditions les plus défavorables (c'est-à-dire emploi unique de $NH4^+$ ou de $NO3^-$, ou encore $NO3^-$ associé à la glutamine) montre qu'il n'y a pas régénération de plantes pour les 2 variétés.

Notons également que les taux de nécroses et/ou de "vitrifications" sont amplifiés par l'empoi d'ammonium seul ou de glutamine seule.

Le maximum de plantes est obtenu avec l'association ammonium-nitrates du témoin. Une dilution de celle-ci au demi donne des résultats un peu plus faibles. Une multiplication par deux des nitrates et ammonium du témoin augmente l'allongement des *P. hortorum* mais réduit le nombre de plantes obtenues tout comme chez les *P. x hederaefolium.*

Pour obtenir un bon allongement des méristèmes et un taux de régénération intéressant, il est nécessaire de conjuguer de l'ammonium aux nitrates.

Ce sont les concentrations des sources azotées du témoin qui nous ont donné les meilleurs résultats, mais il est sans doute possible de les améliorer encore en faisant varier le rapport ammonium/nitrates.

3) Interprétation

Le méristème prélevé est un explant très petit, donc contenant peu de réserves; il est pourtant le siège d'une activité intense et sa mise en culture nécessite un milieu plus riche (notamment en source d'azote) que pour une multiplication ordinaire des microboutures.

L'azote utilisé couramment dans les milieux de culture est sous forme d'ions NO_3^- et d'ions NH_4^+. Ces ions sont nécessaires à la constitution des tissus issus du fonctionnement de méristème. Cependant les ions NO_3^- doivent être réduits en NH_4^+ avant d'être incorporés dans la formation d'acides aminés. Par conséquent l'utilisation de NO_3^- nécessite beaucoup plus d'énergie à la plante que les ions NH_4^+. Ce qui explique sans doute la nécessité de la forme ammoniacale pour développer le méristème en plante. Ce phénomène est également vrai à l'échelle du bouturage traditionnel où la plante consomme beaucoup plus de NH_4^+ pendant les trois premiers mois de culture ; le rapport initial NO_3/NH_4 à 5,4 passe à 3 (DARTIGUES et al., 1980).

C'est avec le "témoin" que les résultats sont les meilleurs, mais doubler le taux d'azote de celui-ci accélère nettement la croissance des *P. x hortorum* . Cela provoquerait une forte activation du métabolisme vers un meilleur développement ou vers des "vitrifications" et des nécroses. Ce phénomène pourrait être utilisé en hiver, période où le développement est difficile. A cette époque, cela vaut la peine de prendre des risques, même si un certain nombre de plantes est perdu.

Le NH_4^+ seul, est fortement toxique par suite de l'acidification du milieu de culture due à l'absorption plus forte de cations que d'anions dans les tissus méristématiques (LESAINT et al. ,1983).

L'emploi de NO_3^- seul, provoque au contraire une alcalinisation physiologique mais celle-ci est moins forte et on a donc une action moins importante sur le pH (LESAINT et al., 1983).

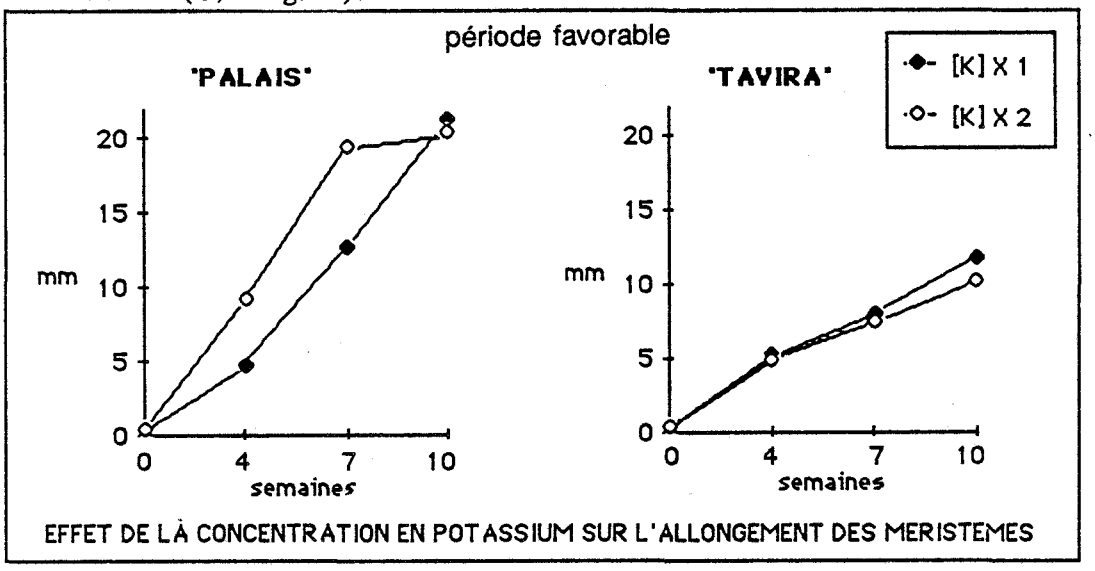
La glutamine peut être un moyen d'éviter la toxicité d'un apport trop massif d'ions ammonium (GUIGNARD, 1983). Cependant dans nos expériences la concentration de 60,05 mM. l^{-1} seule ou 20,05 mM. l^{-1} associée aux nitrates ne s'est pas révélée efficace sur le développement des méristèmes.

D - Rôle du potassium

Les méristèmes possèdent peu de réserves. Etant donné leur petite taille, ils ont besoin généralement d'un milieu plus riche et d'autre part ils sont plus exigeants en potassium. Nous avons voulu vérifier, si en doublant la dose de potassium du milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962) il était possible de favoriser la reprise des méristèmes de *Pelargonium*.

Nos expériences ont porté sur les cutivars 'Tavira' *(P. x hederaefolium)* et 'Palais' *(P. x hortorum)* (cf **PLANCHE II**).

Le milieu de culture employé est celui de MURASHIGE et SKOOG (1962) additionné de zéatine (O,1 mg.l^{-1}).



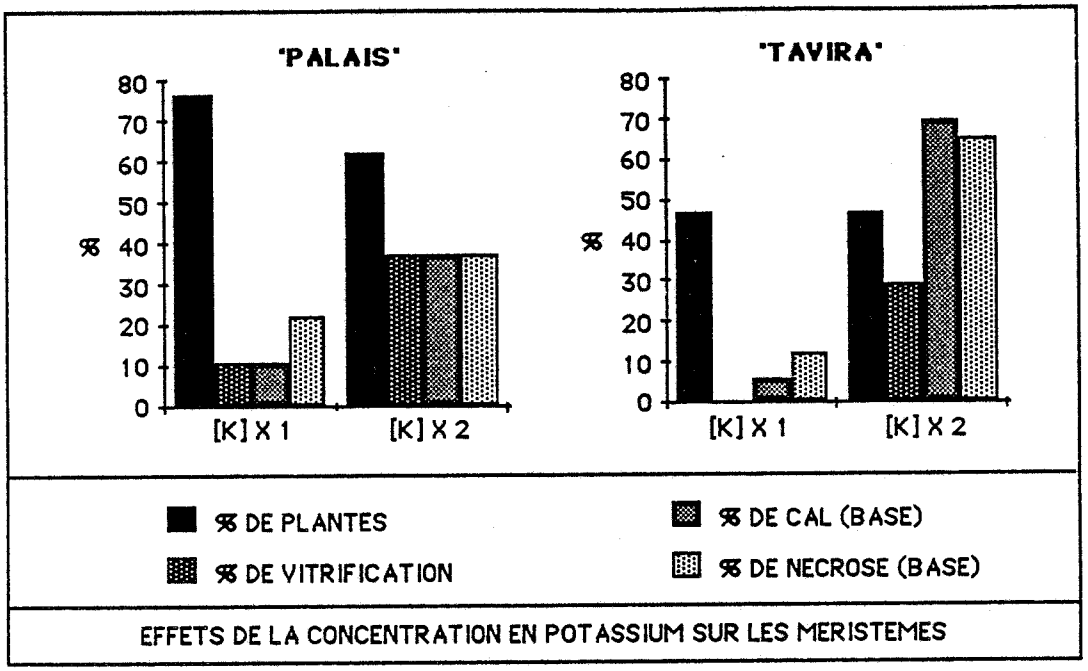
EFFET DE LA CONCENTRATION EN POTASSIUM SUR L'ALLONGEMENT DES MERISTEMES

Nous constatons immédiatement un comportement très différent des 2 variétés vis-à-vis du potassium.

En effet, 'Tavira' semble beaucoup plus sensible à l'excès de potassium. Par contre 'Palais' peut supporter assez facilement une forte concentration qui stimule au début le développement des méristèmes mais par la suite, cette dose double de potassium se révèle quelque peu néfaste.

La sensibilité différente des 2 variétés pourrait s'expliquer par la croissance rapide de 'Palais', qui impliquerait une protéogenèse plus importante où le potassium serait impliqué. On peut également penser que les besoins de *P. x hederaefolium* sont plus réduits.

Notons que lorsque MOREL et al. (1955) préconisaient d'enrichir le milieu en potassium, il s'agissait de la solution de KNOP (1865), nettement plus pauvre en potassium que le milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962) (4,32 mM.l^{-1} contre 20,06 mM. l^{-1} dans le MURASHIGE et SKOOG, 1962). Notre expérience montre qu'il n'est pas nécessaire d'enrichir notre solution de base si ce n'est éventuellement en début de culture chez les *P. x hortorum* .

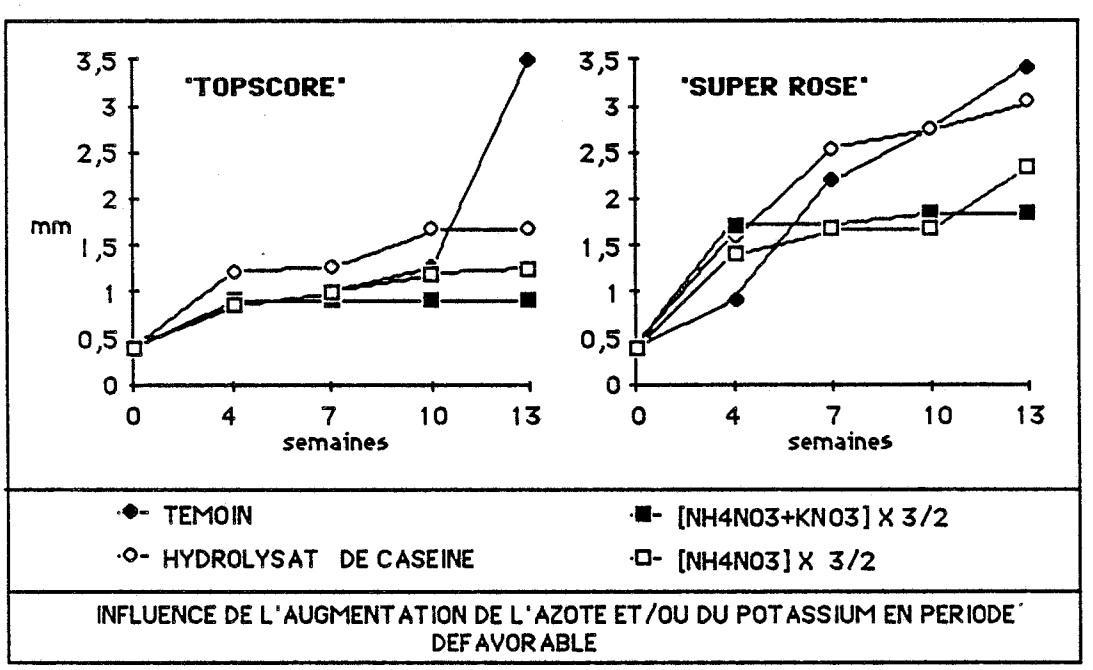


EFFETS DE LA CONCENTRATION EN POTASSIUM SUR LES MERISTEMES

Si nous considérons le rendement en plantes, il est moins bon avec davantage de potassium surtout pour 'Palais'. De plus l'accélération de croissance en début de culture augmente la vitrification, la callogenèse et les nécroses. Toutefois dans la mesure ou les fortes concentrations de potassium peuvent activer la croissance, elles pourront peut être permettre le débourrement des méristèmes pendant l'hiver.

E - Effets de l'azote et du potassium en période défavorable

En période favorable , l' azote ou le potassium provoquent l' allongement des méristèmes de *Pelargonium*, notamment les *P. x hortorum.* Nous avons donc enrichi le milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962) en éléments minéraux pendant la période défavorable. Le but est d'activer la régénération de plantes à partir de méristèmes en répondant à un éventuel besoin en éléments minéraux plus important ou en stimulant le réveil physiologique des méristèmes. 'Topscore' *(P. x hortorum)* et 'Super Rose' (*P. x hederaefolium*) ont été employées pour cette expérience.



INFLUENCE DE L'AUGMENTATION DE L'AZOTE ET/OU DU POTASSIUM EN PERIODE DEFAVORABLE

L'augmentation du taux de nitrate d'ammonium ($NH_4 NO_3$), seul ou associé au nitrate de potassium (KNO_3) ou encore additionné d'hydrolysat de caséine, augmente légèrement la taille des méristèmes dans la première phase de culture (4 semaines) mais cela n'est pas suffisant pour provoquer un véritable démarrage. On peut également constater qu'après 13 semaines de culture les méristèmes cultivés dans ces différentes conditions sont presque tous rattrapés par le témoin (sauf M.S. + hydrolysat de caséine avec 'Topscore'). Cependant aucune de ces conditions ne permet d'obtenir de plantes, ce qui confirme les résultats de MAMET, (1983).

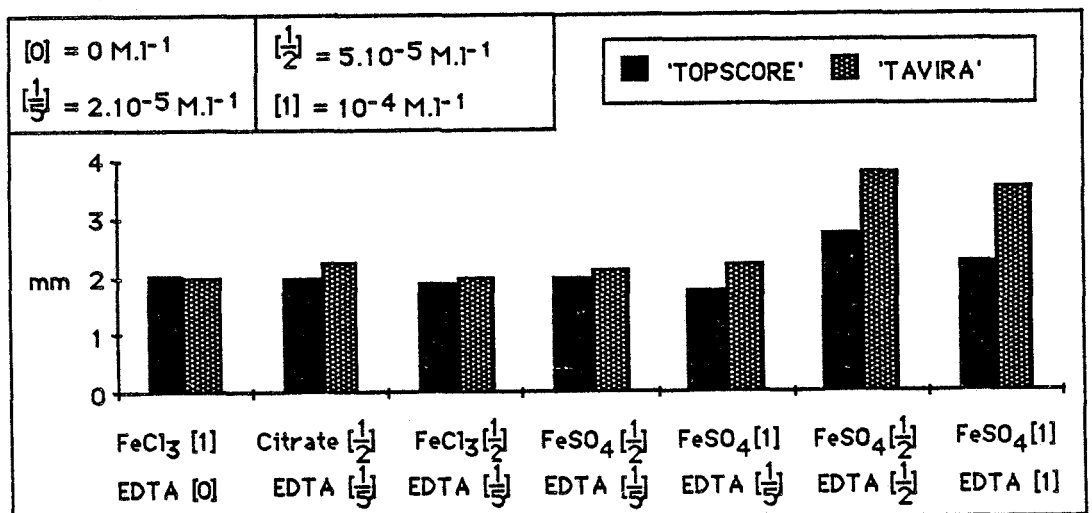
Une augmentation du taux d'azote et de potassium n'apparaît donc pas comme déterminante dans le développement des méristèmes en période défavorable.

F - Le fer

Le fer est indispensable, car il intervient au niveau des enzymes de l'assimilation chlorophyllienne. On l'associe souvent à un chélateur : l'E.D.T.A. , qui permet une meilleure absorption par les plantes. Cependant l'E.D.T.A. (éthylènediaminetétraacétate) peut se révéler toxique, et il faudrait peut-être réduire sa concentration au 1/5 dans le milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962). (travaux de LEGRAND, 1975) . Nous allons donc analyser le comportement de différentes sources de fer associées ou non à de l'E.D.T.A.

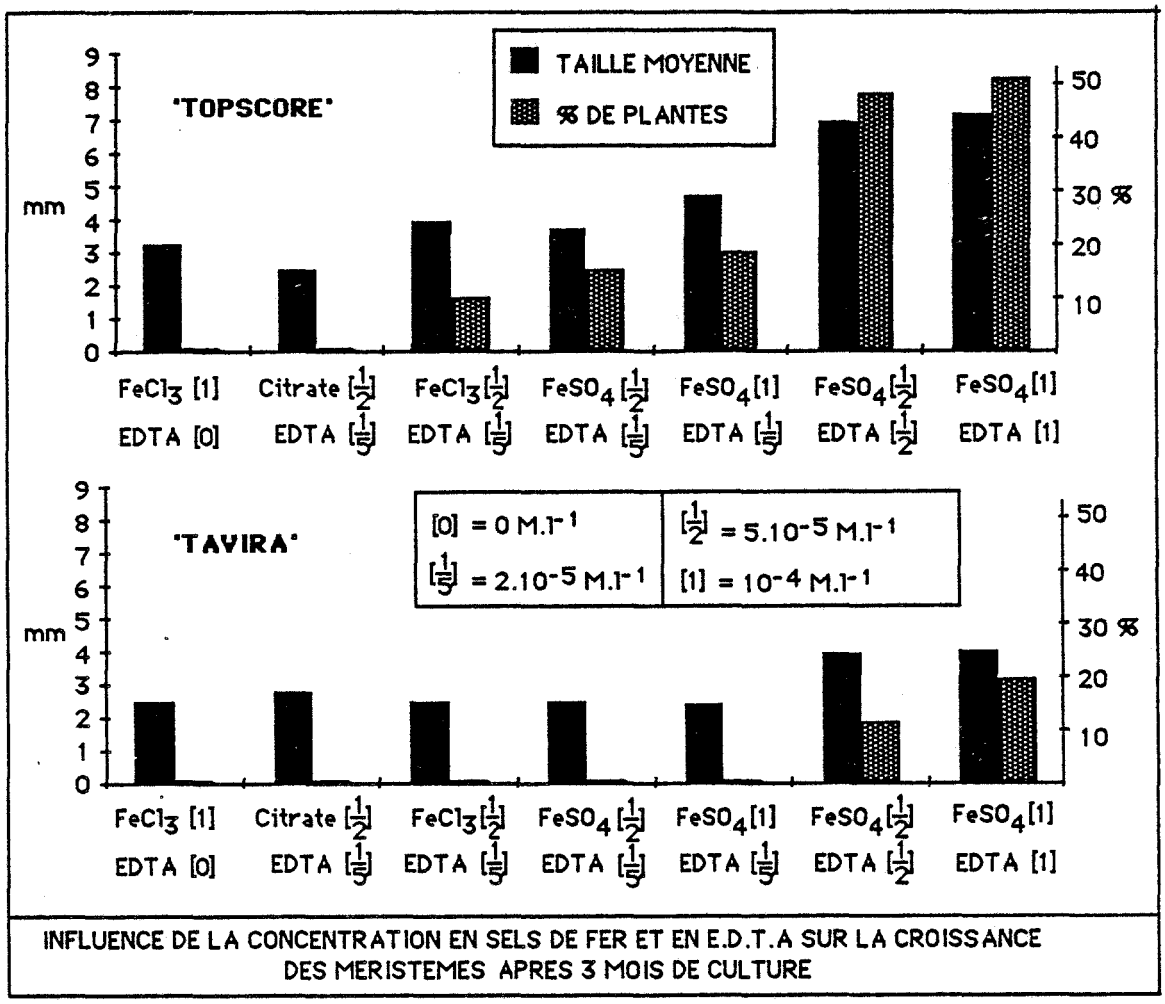
L'expérimentation a été réalisée avec 'Tavira' (*P. x hederaefolium*) et 'Topscore' (*P. x hortorum*) cultivés respectivement sur les milieux Macrolabo (FEUTRY, 1976) (AIA. : O,1 $mg.l^{-1}$; BA : O,1 $mg.l^{-1}$) et de MURASHIGE et SKOOG (1962) (2 iP : 1 $mg.l^{-1}$; ANA : O,1 $mg.l^{-1}$).

Les résultats sont relevés tous les mois :



INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SELS DE FER ET EN E.D.T.A SUR LA CROISSANCE DES MERISTEMES APRES 1 MOIS DE CULTURE

Bien qu'après un mois de culture les explants soient encore très petits, certaines différences apparaissent déjà. En effet nous constatons une certaine amélioration du démarrage lorsque l'E.D.T.A. est employé à une concentration supérieure à 2.10^{-5} $M.l^{-1}$, mais il n'est pas encore possible de déterminer la quantité de fer la plus efficace.



INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SELS DE FER ET EN E.D.T.A SUR LA CROISSANCE DES MERISTEMES APRES 3 MOIS DE CULTURE

Après 3 mois de culture les différences sont beaucoup plus nettes (notamment pour 'Topscore') et les premières plantes se développent. L'expérience a été réalisée à un moment où la croissance de 'Topscore' était supérieure à celle de 'Tavira'; par conséquent les résultats obtenus avec 'Topscore' sont plus tangibles.

Le citrate de fer est inefficace, $FeCl_3$ et $FeSO_4$ donnent approximativement le même taux de croissance, mais on obtient davantage de plantes avec $FeSO_4$ et celles-ci sont moins chlorotiques qu'en présence de $FeCl_3$.

L'association Fe - E.D.T.A. semble indispensable et la concentration d' E.D.T.A. doit être proportionnelle à la quantité de fer utilisée. En effet c'est la quantité d' E.D.T.A. présente dans le milieu qui va déterminer la quantité de fer absorbée par la plante. Si la proportion de fer est supérieure à celle d' E.D.T.A., tout le fer n'est pas absorbé, par conséquent toute augmentation du fer nécessite la même augmentation en E.D.T.A.

Les meilleures conditions de croissance sont ($FeSO_4$ - E.D.T.A.) à 10^{-4} M.l^{-1} et à 5.10^{-5} M.l^{-1}, mais avec 10^{-4} M.l^{-1} les plantes sont plus belles et plus vertes. Il n'y a donc pas de phénomène de toxicité avec les concentrations employées.

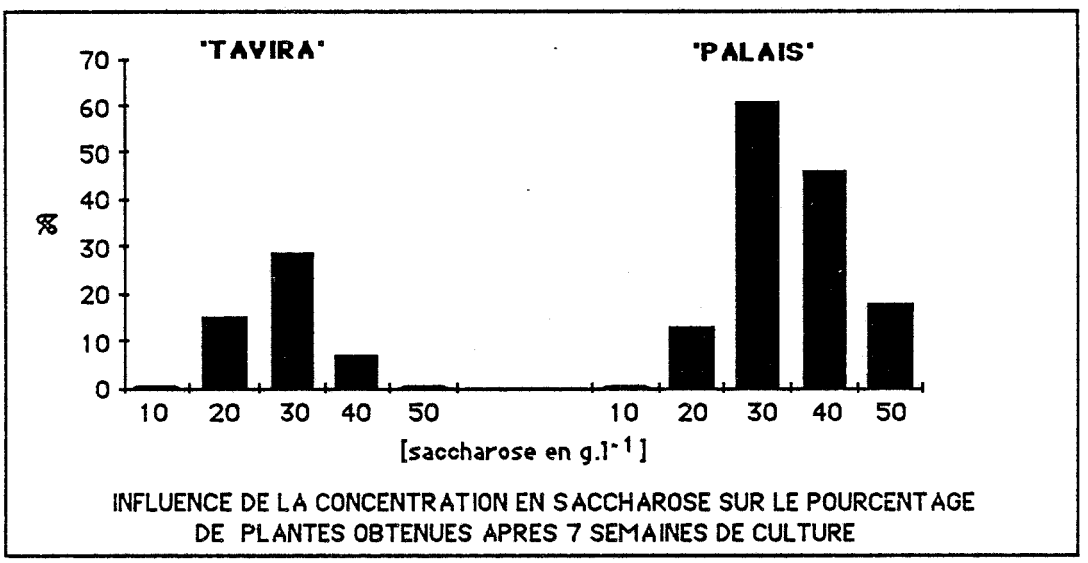
IV - LES GLUCIDES

A - La concentration en saccharose

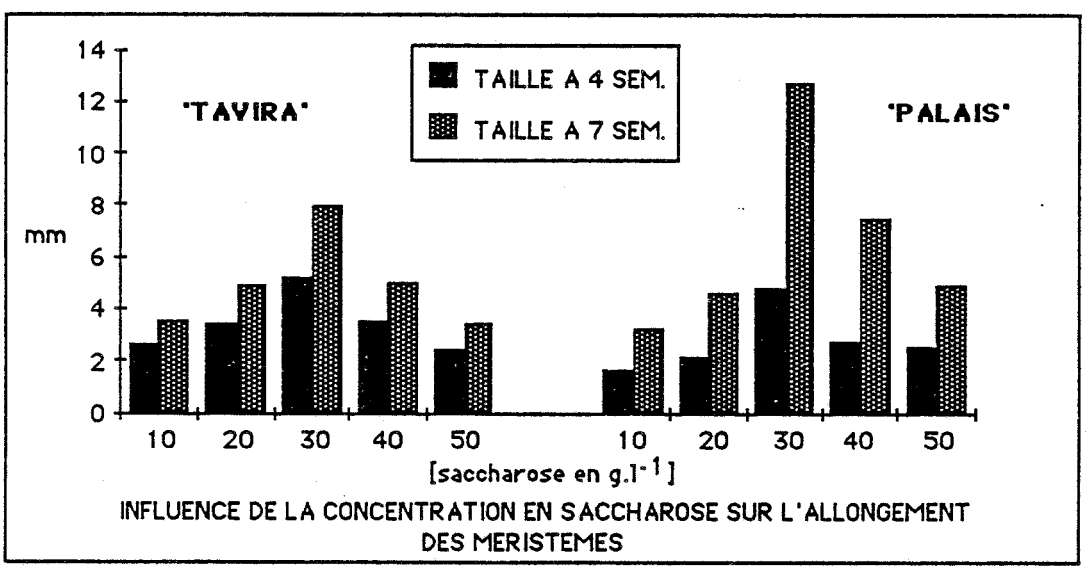
Les cultures des tissus végétaux cultivés *in vitro*, même chlorophylliens, sont en grande partie hétérotrophes donc tributaires de la source de carbone du milieu de culture. Ceci est d'autant plus vrai avec les méristèmes qui sont de petite taille (O,2 à O,5 mm) et peu chlorophylliens. Nous avons donc essayé de déterminer la concentration optimale de saccharose à employer pour les cultures de *Pelargonium*.

L'expérimentation a été réalisée avec les cultivars 'Palais' (*P. x hortorum*) et 'Tavira' (*P. x hederaefolium*).

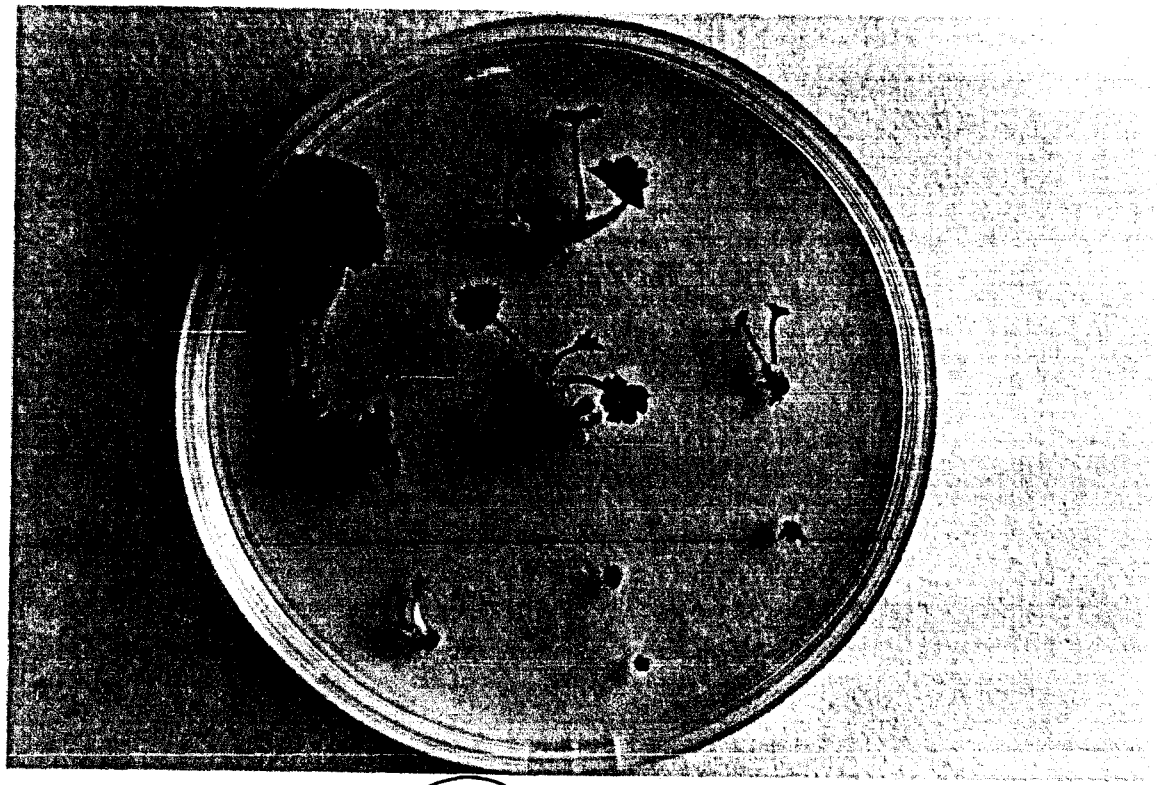
Le milieu de culture (MURASHIGE et SKOOG, 1962) contient une substance de croissance : la zéatine employée à O,1 mg.l^{-1}.Les résultats sont relevés après 4 et 7 semaines.(cf **PLANCHE III**).

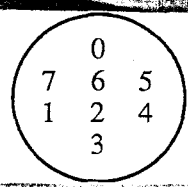


INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SACCHAROSE SUR LE POURCENTAGE DE PLANTES OBTENUES APRES 7 SEMAINES DE CULTURE

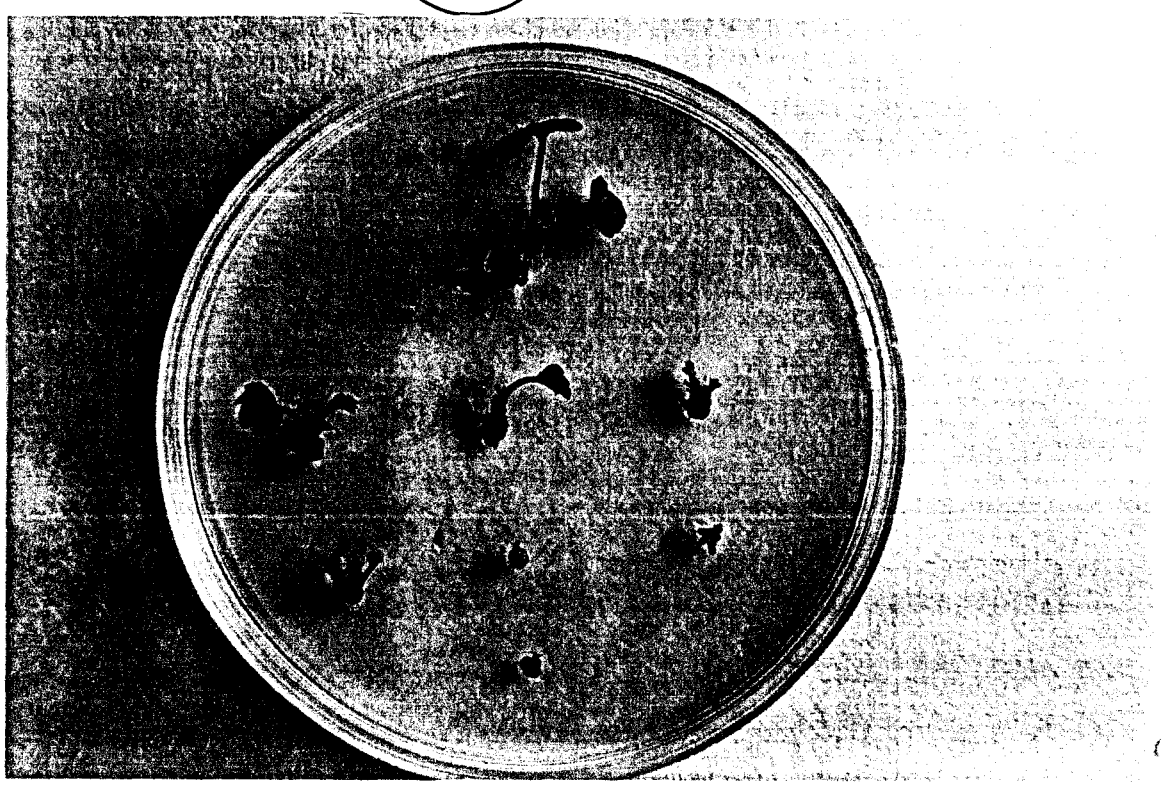


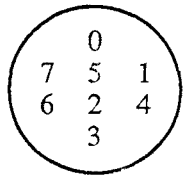
INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SACCHAROSE SUR L'ALLONGEMENT DES MERISTEMES





P.x hortorum
var : 'PALAIS'





P.x hederaefolium
var : 'TAVIRA'

PLANCHE II - EFFETS DE L'AZOTE ET DU POTASSIUM SUR LE DEVELOPPEMENT DES MERISTEMES

0	:	témoin	4	:	Glut.
7	:	[K] x 2	3	:	NH4
6	:	[N] x 2	2	:	NO3+Glut.
5	:	[N] x 1/2	1	:	NO3

Après 4 semaines de culture la concentration de 30 $g.l^{-1}$ de saccharose apparait la plus favorable à l'allongement des méristèmes. Cette tendance est amplifiée après 7 semaines où l'on peut déjà voir les premières microplantes puisque l'époque est favorable au développement. Le nombre de plantes obtenues est proportionnel au taux de croissance des méristèmes. Notons également que le développement après 4 semaines de culture est plus important pour 'Tavira' mais qu'il y a largement rattrapage et même dépassement à 7 semaines par 'Palais'. Le pourcentage de plantes issues du cultivar 'Palais' est par conséquent plus important. La concentration optimale de saccharose se situe donc aux environs de 30 $g.l^{-1}$; aux concentrations inférieures l'insuffisance de l'assimilation chlorophyllienne n'est pas compensée et aux concentrations supérieures la croissance est moindre et il y a des nécroses à la base des explants. L'augmentation de la teneur en sucres favorise souvent la prolifération du cal .

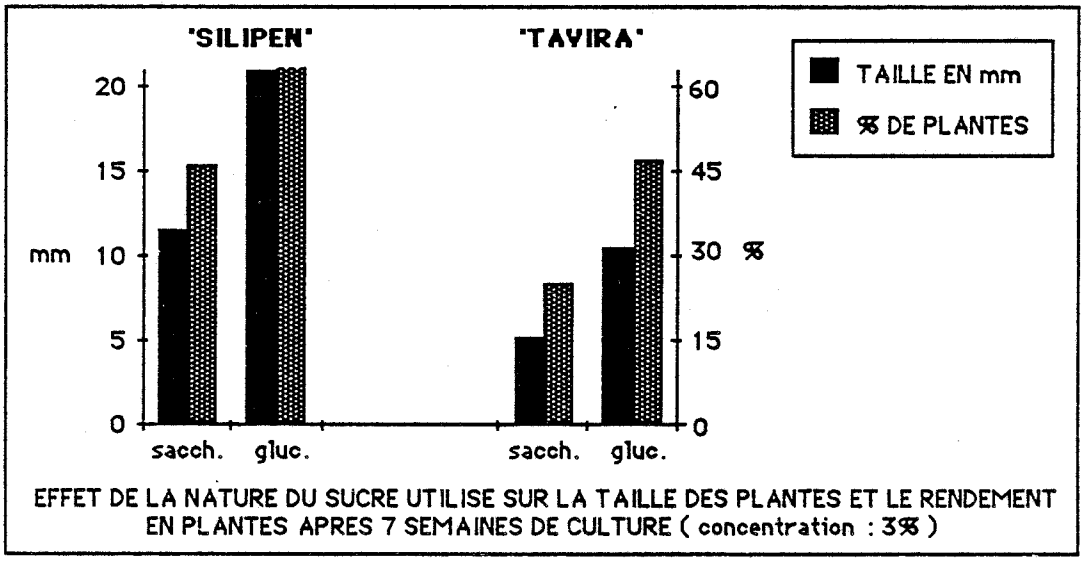
B - La nature du sucre

Tous les auteurs ayant travaillé sur le Pelargonium utilisent du saccharose à 30 $g.l^{-1}$ excepté BEAUCHESNE et al., (1977) qui préfèrent employer du glucose à la même concentration. Il nous a donc paru important de vérifier si l'emploi du glucose est préférable ou non.

Les cultivars ayant servi à l'expérimentation sont : 'Silipen' (*P. x hortorum*) et 'Tavira' (*P. x hederaefolium*) .

Le milieu de culture employé est celui de MURASHIGE et SKOOG (1962) additionné de zéatine (0,1 $mg.l^{-1}$).

Les résultats sont relevés après 4 semaines et 7 semaines de culture.



EFFET DE LA NATURE DU SUCRE UTILISE SUR LA TAILLE DES PLANTES ET LE RENDEMENT EN PLANTES APRES 7 SEMAINES DE CULTURE (concentration : 3%)

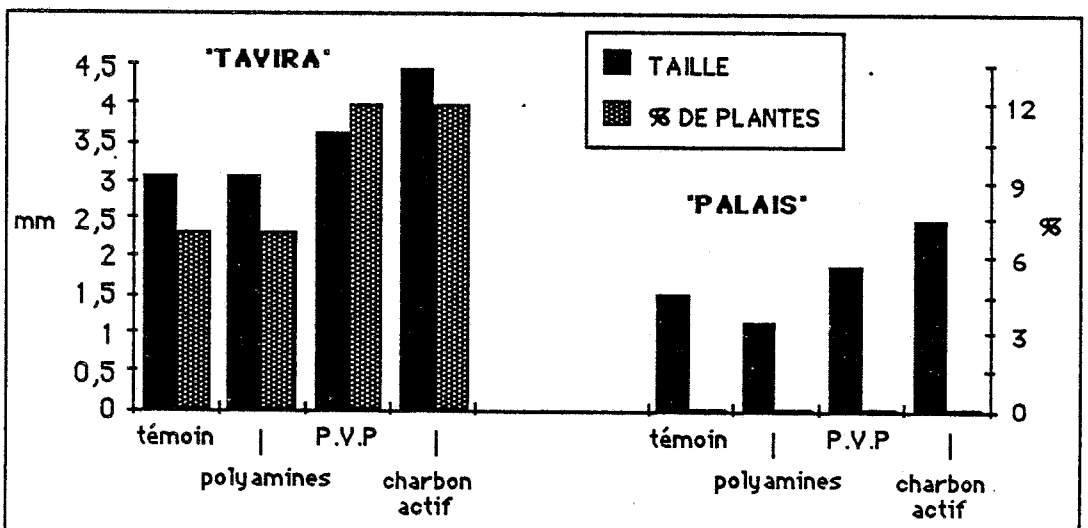
Nous constatons que le glucose favorise davantage l'élongation et le rendement en plantes que le saccharose. Notons cependant que l'expérience a été réalisée en période favorable pour ces 2 variétés et que la variété la plus sensible au glucose est celle qui s'est le mieux développée sur le milieu témoin. Il est donc possible que l'influence de la nature du sucre soit en relation avec l'état physiologique du méristème ensemencé mais les expériences n'ont pas été suffisamment répétées pour se prononcer.

V- ROLE DU CHARBON ACTIF SUR L'ALLONGEMENT DES MERISTEMES

La présence de charbon actif en première phase de culture (1 semaine), à raison d'1 g. l^{-1} favorise la croissance. Nous avons donc essayé de déterminer si cette exaltation était due à la capacité d' adsorption des phénols excrétés par les méristèmes ou à certaines substances qu'il contient tels que les polyamines (CARRE, 1978).

Pour cela nous avons comparé son action à celle du P.V.P. (polyvinylpyrrolidone) et de polyamines (spermidine 30 mg. l^{-1} ; putrescine 30 mg.l^{-1} ; spermine 30 mg. l^{-1}) par rapport à un milieu ne contenant pas de charbon actif.

Les cultivars utilisés pour l'expérimentation sont 'Palais' (*P. x hortorum*) et 'Tavira' (*P. x hederaefolium*) : le milieu est celui de MURASHIGE et SKOOG (1962) additionné de zéatine (O,1 mg. l^{-1}).



COMPARAISON DE L'EFFET DU CHARBON ACTIF A D'AUTRES SUBSTANCES SUR L'ALLONGEMENT DES MERISTEMES APRES 10 SEMAINES DE CULTURE

L'expérience s'est déroulée en pleine période défavorable (janvier) ; par conséquent l'obtention de plantes était plus difficile, notamment pour 'Palais'.

Cependant on peut constater, surtout pour 'Tavira' dont la croissance est plus forte, donc plus tangible , que l'addition de P.V.P. est moins efficace sur l'allongement que le charbon actif et que les polyamines sont inutiles voire toxiques à la concentration employée chez le P. x hortorum.

VI - LES HORMONES

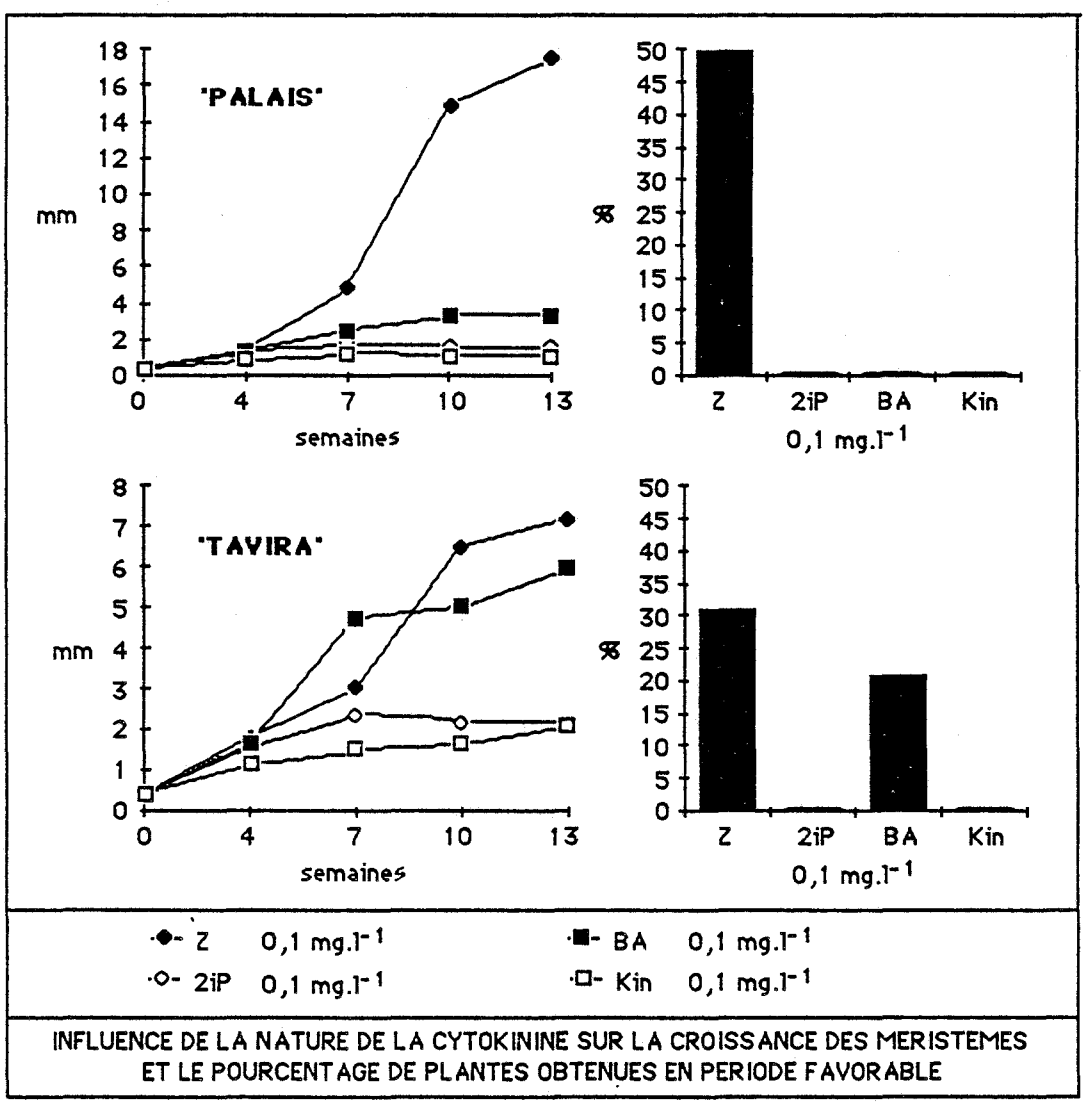
A - Les cytokinines

1) La nature des cytokinines

Parmi les 4 cytokinines (BA, Kin, 2 iP, Zéatine), les plus employées en micropropagation, nous avons voulu déterminer celle qui est la plus efficace sur les méristèmes de *Pelargonium*.

Nous les avons essayées à faible concentration (O,1 mg.l^{-1}) pour les 2 types d'hybrides en période favorable.

Les variétés utilisées sont 'Tavira' (*P. x hederaefolium*) et 'Topscore' (*P. x hortorum*). L'ensemencement des explants se fait sur le milieu de base enrichi en charbon actif (une semaine) puis additionné de cytokinine pour les repiquages ultérieurs (toutes les 3 semaines).



INFLUENCE DE LA NATURE DE LA CYTOKININE SUR LA CROISSANCE DES MERISTEMES ET LE POURCENTAGE DE PLANTES OBTENUES EN PERIODE FAVORABLE

Les graphiques avec les courbes de croissance montrent que les deux types d'hybrides ont des sensibilités assez comparables aux différentes cytokinines dont l'activité se classe ainsi :

- n° 1 : zéatine
- n° 2 : BA.
- n° 3 : 2 iP
- n° 4 : Kin.

Mais si nous comparons le pourcentage de plantes obtenu après 3 semaines nous voyons que l'obtention de plantes demeure possible avec 2 cytokinines (Zéatine et BA.) chez le *P.* x *hedraefolium*, mais que seule la zéatine est suffisamment active à O,1 $mg.l^{-1}$ pour donner des plantes chez le *P. x hortorum.*

La zéatine est donc l'hormone la plus efficace pour les 2 types d'hybrides car sans doute la plus proche de celle fabriquée par le *Pelargonium.*

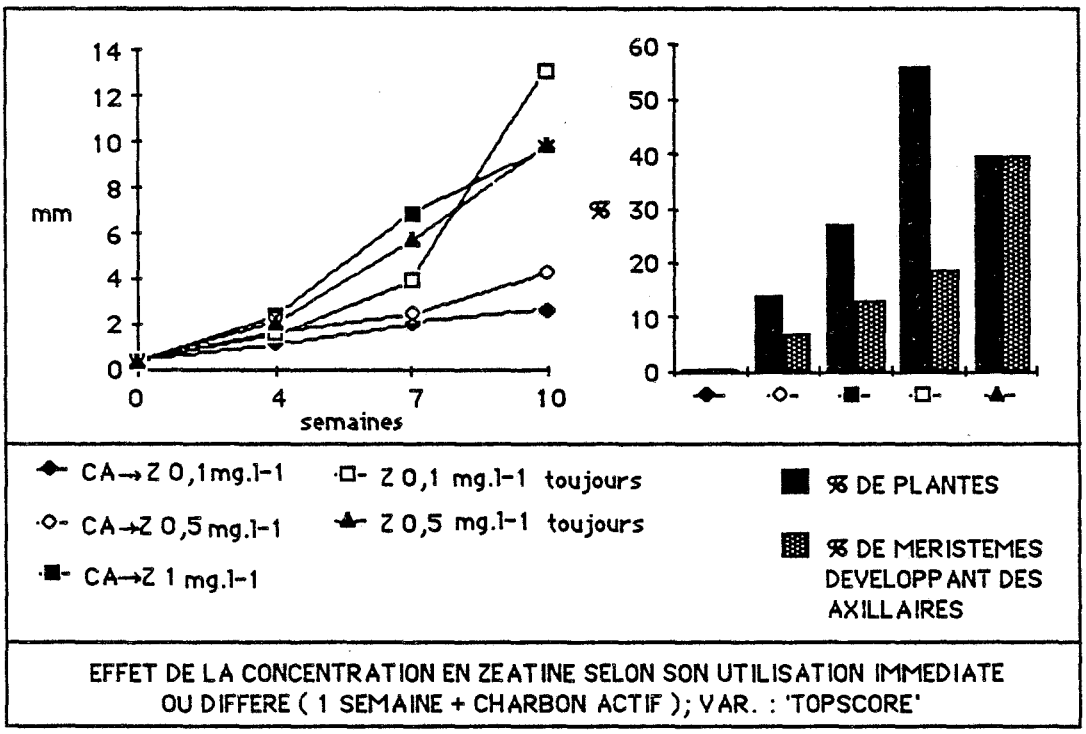
2) influence de l'emploi immédiat ou différé de zéatine chez le *P. x hortorum*

Les expériences concernant le conditionnement du milieu ayant souligné l'influence de l'incorporation directe ou différée de cytokinine dans le milieu d'ensemencement , nous avons donc voulu préciser l'importance de ce phénomène à l'aide de différentes concentrations en cytokinine .

L'expérience n'a été réalisée que sur le *Pelargonium* 'Topscore' puisque les *P. x hederaefolium* supportent mal l'introduction d'hormones dès l'ensemencement.

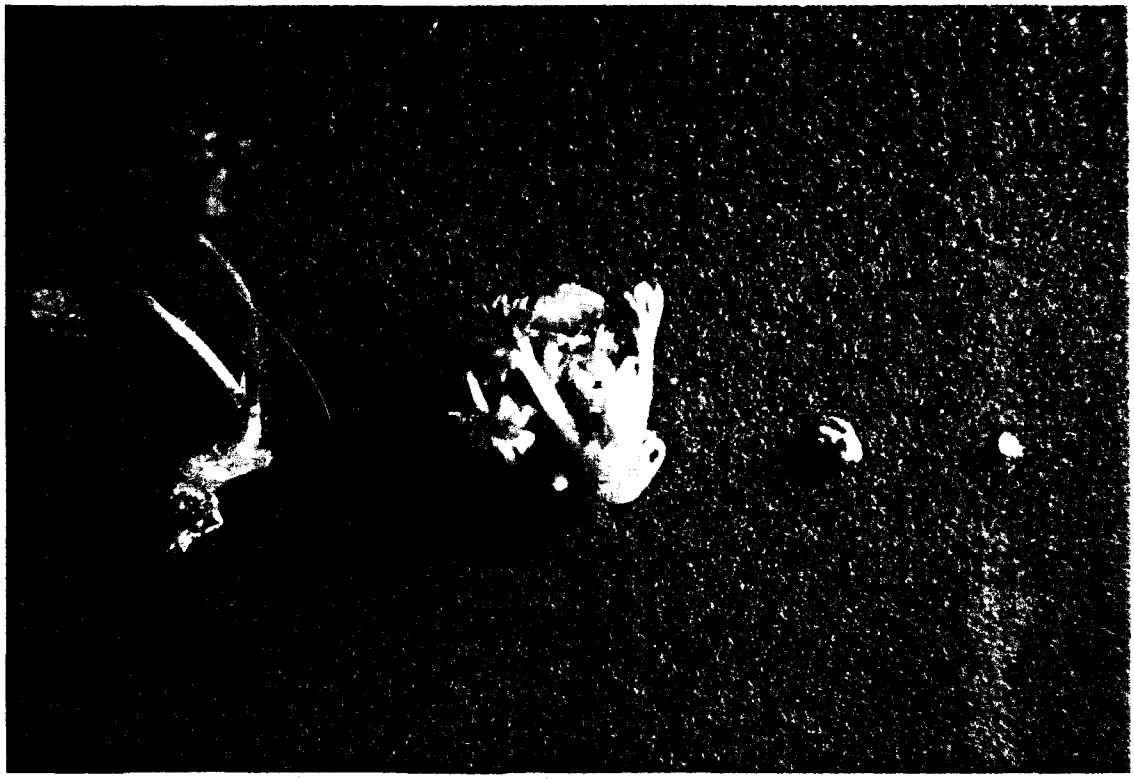
La culture des méristèmes a été réalisée sur le milieu de base additionné de zéatine à différentes concentrations précédé ou non d'un passage sur charbon actif (1 $g.l^{-1}$). Les résultats sont relevés après 4, puis toutes les 3 semaines.

(cf **PLANCHE IV**)



EFFET DE LA CONCENTRATION EN ZEATINE SELON SON UTILISATION IMMEDIATE OU DIFFERE (1 SEMAINE + CHARBON ACTIF); VAR. : 'TOPSCORE'

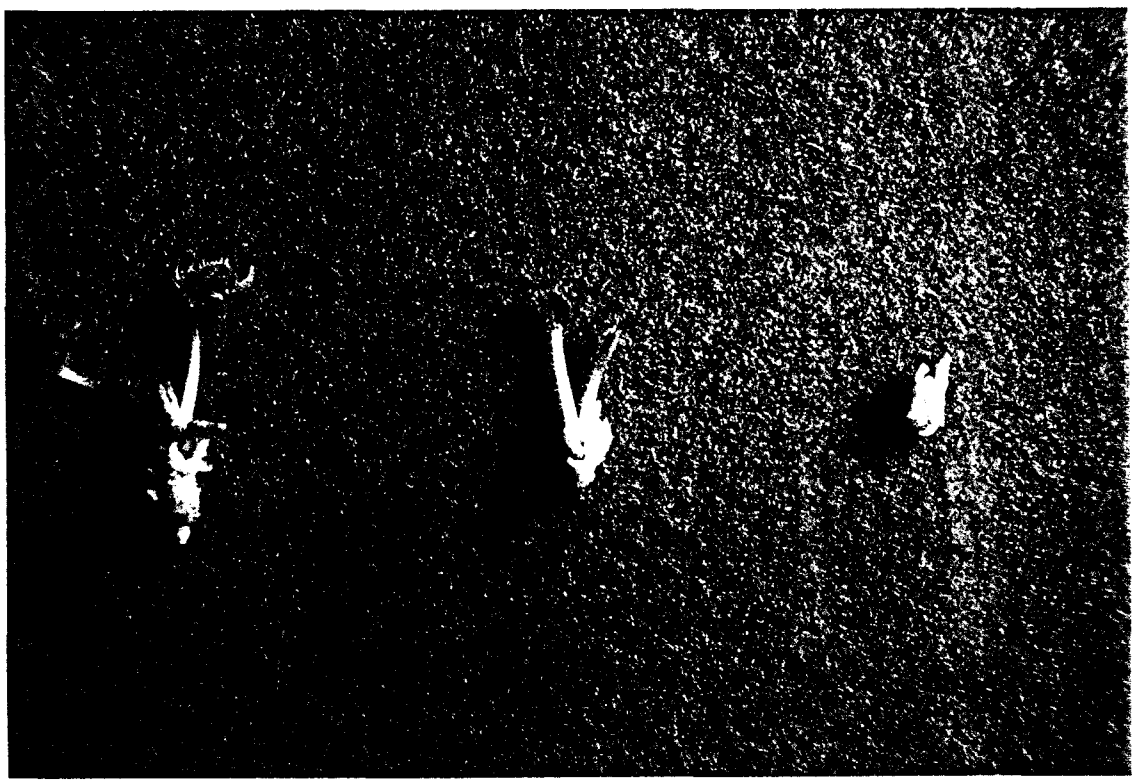
Lorsque les méristèmes ont été ensemencés au préalable une semaine sur un milieu contenant du charbon actif la croissance et le rendement en plantes est d'autant plus important que la concentration en zéatine est élevée en début de



De gauche à droite: culture en présence de zéatine dès l'ensemencement:
- zéatine (0,1 mg.l-1)
- zéatine (0,5 mg.l-1)

culture en présence de zéatine (0,1 mg.l-1) après:
- 1 passage sans hormone avec charbon actif
- 1 passage sans hormone sans charbon actif

(var. : 'TOPSCORE', période favorable)



De gauche à droite: culture en présence de zéatine après un passage sans hormone:
- passage avec charbon actif puis zéatine (0,5 mg.l-1)
- passage avec charbon actif puis zéatine (0,1 mg.l-1)
- passage sans charbon actif puis zéatine (0,1 mg.l-1)

(var. : 'SUPER ROSE', période défavorable)

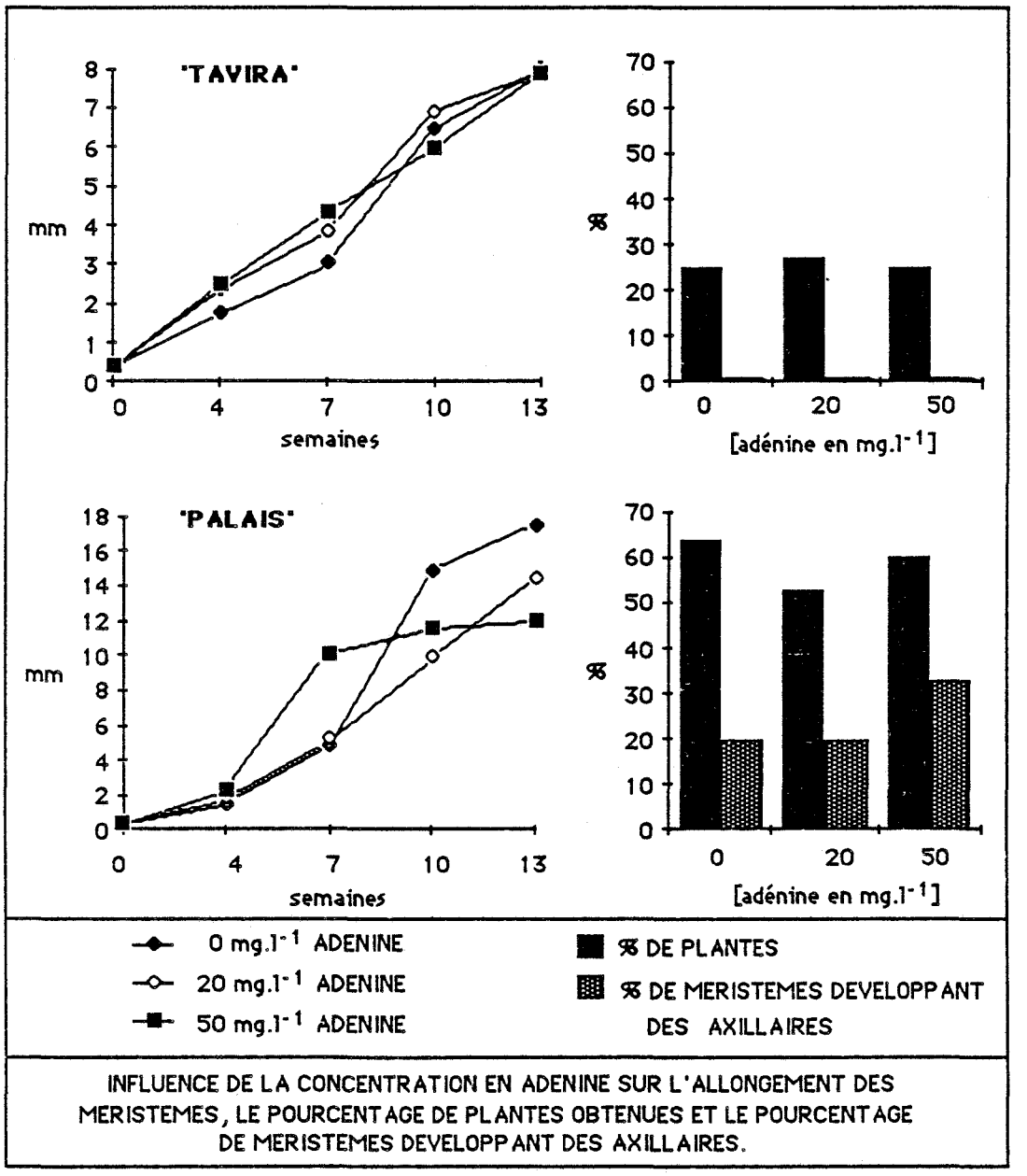
PLANCHE IV - EFFETS DE LA ZEATINE SUR LE DEVELOPPEMENT DES MERISTEMES

période favorable. Par contre, lorsque l'ensemencement a lieu immédiatement sur un milieu enrichi en hormone, la croissance est optimale avec une dose faible de zéatine (O,1 $mg.l^{-1}$) dont l'activité paraît être multipliée par 1O par rapport à une application différée. Chez les *P. x hortorum* l'efficacité de la cytokinine est donc fortement liée au protocole expérimental, mais les résultats ne peuvent être analysés avant 1O semaines de culture car le comportement en début de culture ne donne qu'une interprétation imparfaite du résultat final.

3) Utilisation d'un précurseur de cytokinines : l'adénine

Augmenter le taux de cytokinine ne correspond pas fatalement à une régulation hormonale favorable puisque l'on a quelquefois prolifération de bourgeons axillaires ou adventifs. L'adénine, de part sa structure proche d'une cytokinine, pourrait être employée comme un complément susceptible d'être transformé en régulateur de croissance, ce qui serait plus efficace sur le développement.

Les cultivars choisis pour l'expérimentation sont 'Palais' (*P. x hortorum*) et 'Tavira' (*P. x hederaefolium*). L'adénine est ajoutée aux concentrations de 2O et 5O $mg.l^{-1}$ au milieu de base enrichi en zéatine (O,1 $mg.l^{-1}$).



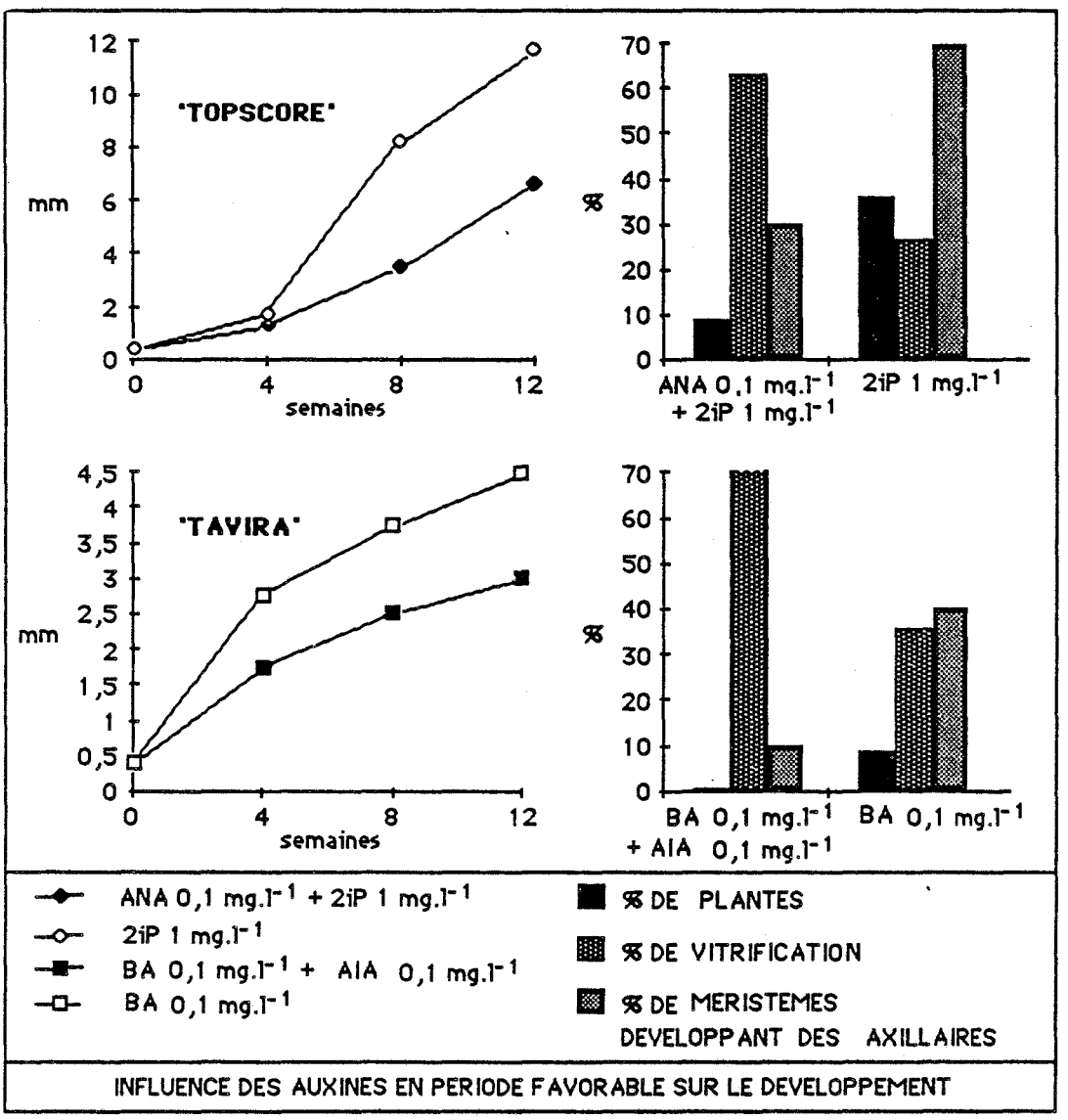
INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN ADENINE SUR L'ALLONGEMENT DES MERISTEMES, LE POURCENTAGE DE PLANTES OBTENUES ET LE POURCENTAGE DE MERISTEMES DEVELOPPANT DES AXILLAIRES.

Les courbes de croissance indiquent que l'augmentation de la taille des méristèmes pendant les 7 premières semaines est favorisée par l'adénine mais après 1O semaines de culture le phénomène s'inverse et le témoin rattrape les autres conditions.Le *P. x hortorum* 'Palais' semble plus sensible à l'addition d'adénine que le *P. x hederaefolium* 'Tavira' mais cela n'est peut-être du qu'à la différence d'activité des 2 variétés au moment du prélèvement.Il n'est donc pas utile d'ajouter de l'adénine au milieu de culture pour augmenter l'allongement des méristèmes en période favorable, sauf peut être en limitant son action à 7 semaines de culture. Notons également que le développement de bourgeons axillaires n'est pas moins important en sa présence.

B - L'auxine

Tous les auteurs excepté MENARD (1983) emploient des auxines pour la culture de méristèmes de *Pelargonium*. Nous avons donc voulu savoir si l'association auxine-cytokinine est indispensable.

Les cultivars employés sont 'Tavira' (*P. x hederaefolium*) et 'Topscore' (*P. x hortorum*).'Tavira' est ensemencé sur du milieu Macrolabo (FEUTRY, 1976) en présence de BA. (O,1 g. l^{-1}) associée ou non à de l'AIA. (O,1 mg.l^{-1}). 'Topscore' est ensemencé sur du milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962) en présence de 2 iP. 1 mg. l^{-1} associée ou non à de l'ANA (O,1 mg. l^{-1}).



INFLUENCE DES AUXINES EN PERIODE FAVORABLE SUR LE DEVELOPPEMENT

Nous constatons que les courbes de croissance sont à nouveau décalées et que le développement est meilleur sans auxine. De même le pourcentage de plantes est plus important avec les cytokinines seules. La suppression de l'auxine augmente également le développement des bourgeons axillaires et diminue le taux de vitrification. En période favorable l'auxine exogène apparaît donc inutile. S'ajoutant à l'auxine endogène, sa concentration serait trop élevée et provoquerait l'hyperhydricité des cellules, un allongement plus faible des méristèmes et en partie l'inhibition des bourgeons axillaires.

C) Les gibbérellines

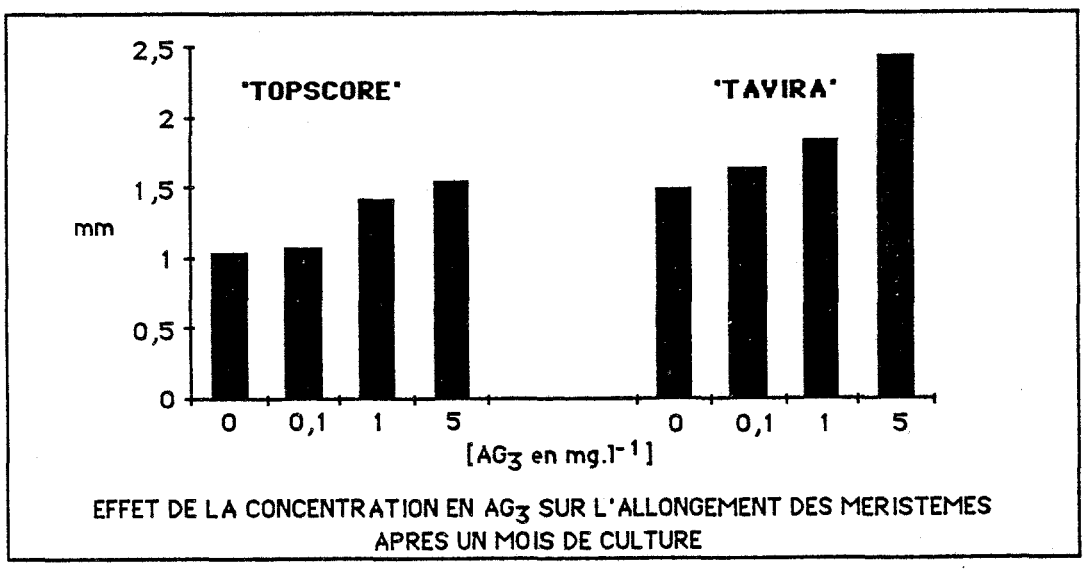
1) Action de la concentration en gibbérelline

Chez certaines plantes, notamment la Pomme de Terre, (PENNAZIO et al., 1974), l'allongement du méristème ne se produit qu'en présence des gibbérellines dans le milieu . Nous avons donc étudié l'effet de l'acide gibbérellique (AG_3) à différentes concentrations :

. le milieu de culture utilisé est celui de MURASHIGE et SKOOG (1962) additionné d'AG_3 en absence de toute autre hormone

. les cultivars utilisés sont 'Topscore' (*P. x hortorum*) et 'Tavira' (*P. x hederaefolium)*

. l'allongement du méristème en première phase de culture est mesuré après un mois de culture.



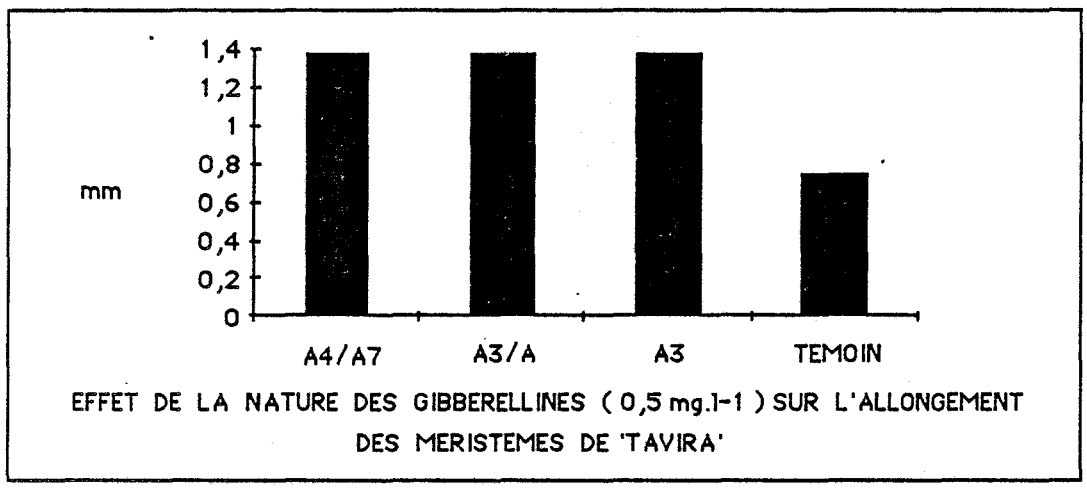
EFFET DE LA CONCENTRATION EN AG_3 SUR L'ALLONGEMENT DES MERISTEMES APRES UN MOIS DE CULTURE

Nous constatons que l'augmentation de taille est proportionnelle à la concentration en AG_3. Cependant cet accroissement du méristème est dû seulement à l'allongement des primordiums foliaires en feuilles filiformes déformées et non pas au grandissement de l'axe; Notons également que les déformations affectent surtout la variété *P.* x *hederaefolium* qui offre la particularité de posséder des entre-noeuds plus développés et donc sans doute un taux de gibbérellines endogènes plus élevé. C'est d'ailleurs ce phénomène qui conduit les horticulteurs à nanifier leurs plantes en pratiquant des traitements intensifs à l'aide du chlorméquat (C.C.C.) substance inhibant la synthèse de gibbérellines.

2) Influence de la nature des gibbérellines

Après avoir constaté l'inefficacité de l'AG3 sur l'allongement de l'axe du méristème, nous avons voulu vérifier si d'autres gibbérellines pouvaient être efficaces.

Nous les avons expérimentées avec la variété la plus sensible : 'Tavira' (*P. x hederaefolium*) en ajoutant au milieu une concentration peu élevée (0,5 mg.l^{-1}). Les résultats sont relevés après un mois de culture.



EFFET DE LA NATURE DES GIBBERELLINES (0,5 mg.l-1) SUR L'ALLONGEMENT DES MERISTEMES DE 'TAVIRA'

L'allongement provoqué par les 3 types de substances est très proche et ne concerne que les feuilles. Les 3 gibbérellines employées ne montrent pas la moindre spécificité vis-à-vis du *Pelargonium*. Elles ont toutes provoqué des déformations foliaires au lieu de favoriser la caulogenèse.

3) Action d'un précurseur de la synthèse des gibbérellines

Le geranyl- géraniol est transformé en kaurène qui est alors introduit dans la chaine de synthèse de gibbérellines. Etant donné l'inefficacité des gibbérellines utilisées nous avons voulu vérifier si un précurseur tel que le géraniol pouvait donner de meilleurs résultats. Nous avons donc incorporé ce composé au milieu à différentes concentrations (8-80 mg.l^{-1}). La concentration de 80 mg.l^{-1} s'est révélée toxique et celle de 8 mg.l^{-1} légèrement favorable après un mois de culture. Mais l'expérience n'ayant pu être continuée il est difficile de se prononcer sur les résultats obtenus.

La présence de gibbérellines chez le *Pelargonium* ne semble pas faire de doute puisque l'emploi de nanifiants est courant. Il est donc probable que ni la nature, ni la concentration des gibbérellines employées ne conviennent .

VII - VARIATIONS SAISONNIERES

L'hétérogénéité dans les réponses obtenues pour des mêmes expériences selon l'époque du prélèvement, nous a conduit à reprendre differents milieux et à les appliquer à date fixe chaque mois sur deux hybrides 'Super rose'(*P. x hederaefolium*) et Topscore' (*P.* x *hortorum*) afin de mieux cerner l'époque optimale d'application de chacun d'eux et en espérant qu'ils se complètent.

Les différentes conditions adoptées sont les suivantes :

-Emploi de cytokinine dans toutes les phases de culture (4 cas):
. la cytokinine est la BA. (O,5mg.l^{-1} pour 'Topscore' ; 0,05mg.l^{-1} pour 'Super rose')
. la cytokinine est la zéatine associée ou non pendant le premier passage (3 semaines) au charbon actif(1g.l^{-1}); zéatine (0,1mg.l-1)

-Emploi de zéatine(0,1 mg.l-1) précédée d'un passage sans hormone (2cas)
. le passage sans hormone a lieu pendant une semaine sur le milieu de base additionné ou non de charbon actif.

A - EMPLOI DE BA DES L'ENCEMENCEMENT.

Les premiers milieux de culture utilisés contenaient de la BA. Nous avons donc voulu vérifier si la BA. était toute l'année moins favorable à la croissance que la zéatine .
Son utilisation dès l'encemencement a nécessité l'appauvrissemment du milieu minéral chez les *P. x hederaefolium* afin de limiter la prolifération de cal.

Le milieu Macrolabo (FEUTRY, 1976) avec BA. (0,05 mg.l^{-1}) a été employé pour 'Super rose'et le milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962) avec BA. 0,5 mg.l^{-1} pour 'Topscore' .

(cf graphiques **GR1** et **GR2** en fin du **VII**)

La BA. dans les conditions où nous l'avons employée ne convient pas à la culture des méristemes de *Pelargonium.*
En effet, si les méristèmes de *P. x hortorum* gonflent davantage en sa présence , ils finissent ensuite par se vitrifier et se nécroser. C'est pourquoi aucun d'entre-eux ne s'est transformé en plante.

Pour` Super rose', on arrive à obtenir quelques plantes mais la proportion obtenue est encore beaucoup trop faible et le taux de vitrification trop élevé . Les mauvais résultats enregistrés avec la BA. sont peut-être dû au fait qu'il s'agit d'un produit de synthèse alors que la zéatine est un produit naturel.

B - EMPLOI DE ZEATINE DES L'ENCEMENCEMENT.

Nous avons essayé d'augmenter la production de plantes en période défavorable en ensemençant directement les méristèmes sur un milieu additionné de zéatine. Nous avons espéré ainsi provoquer un phénomène de synergie entre les substances de croissance exogènes et endogènes.

(cf graphiques **GR3** et **GR4** en fin du **VII**)

Cette méthode est favorable au développement du *P. x hortorum*, et permet d'obtenir plus longtemps un maximum de plantes. Mais cette technique reste insuffisante pour obtenir des plantes pendant l'hiver.

Chez les *P. x hederaefolium* , l'application de zéatine dès l'ensemencement, limite toujours l'allongement des méristèmes au profit de la prolifération du cal et de la vitrification. Il semblerait que même en hiver l'effet de synergie (hormones endogènes et exogènes) soit toujours trop fort.

On note donc pendant toute l'année une différence de comportement très importante entre les 2 types d'hybrides vis à vis de la zéatine, puisque les *P. x hederaefolium* semblent toujours avoir un excès d'hormones alors que les *P. x hortorum* semblent plutôt en déficit.

C - EMPLOI DIFFERE DE ZEATINE.

1) Premiere phase de culture sans charbon actif.

Cette technique consiste à utiliser un passage sans cytokinine d'une semaine avant de repiquer les méristèmes sur le milieu de base contenant de la zéatine (0,1mg. l^{-1}).

Cela devrait permettre aux méristèmes de se décharger d'une partie de leurs substances endogènes par diffusion dans le milieu de culture et d'éviter la synergie avec la zéatine exogène.

(cf graphiques **GR5** et **GR6** en fin du **VII**)

Le spectre d'activité obtenu dans le temps pour les *P. x hortorum* est très étroit et très faible comparé à celui des *P. x hederaefolium.*

Cependant , si la production des plantes de *P . x hederaefolium* est possible en été , elle ne l'est plus pendant l'hiver, ce qui prouve que ces derniers subissent quand même une baisse en hormones endogènes à cette époque.

2) Premiere phase de culture avec charbon actif.

Le charbon actif est connu pour ses propriétés d'adsorption de différentes substances telles les phytohormones (sauf les gibberellines) et les phénols. Son utilisation pourrait donc s'avérer bénéfique d'une part pour limiter l'oxydation des

phénols (toxique) et d'autre part pour adsorber d'éventuels inhibiteurs de la croissance en période défavorable.

(cf graphiques **GR7** et **GR8** en fin du **VII**)

Les résultats obtenus ne corroborent pas l'hypothèse précédente puisque, pour les 2 variétés, l'activité du méristème n'est pas prolongée dans le temps.

L'addition de charbon actif accentue surtout les différences entre les 2 hybrides en période estivale .

le *P. x hortorum* se comporte encore moins bien qu'avec un passage sans charbon actif alors que le rendement en plantes s'amplifie pour le *P. x hederaefolium* .

Notons cependant qu'un an auparavant, de bons résultats avaient été obtenus avec et sans charbon actif dans la première phase sans hormone pour 'Topscore' en période favorable . Cela voudrait dire qu'il faut également prendre en compte les variations annuelles.

D - EMPLOI DE ZEATINE ET DE CHARBON ACTIF EN PREMIERE PHASE DE CULTURE (3 SEMAINES).

Des expériences précédentes nous avaient montré les effets bénéfiques du charbon actif sur la croissance. Nous avons encore voulu les augmenter en étendant à 3 semaines la période de contact avec les méristèmes. Simultanément, de la zéatine a été ajoutée au milieu afin de limiter l'adsorption des substances endogènes du méristème par le charbon actif et faire bénéficier les méristèmes de la zéatine pouvant ne pas être totalement adsorbée.

(cf graphiques **GR9** et **GR10** en fin du **VII**)

Ce passage de 3 semaines avec charbon actif et zéatine empêche le développement des 2 hybrides qui réagissent essentiellement par un phénomène de grandissement cellulaire (donnant dans un premier temps l'illusion d'une croissance) puis de nécrose. Les réactions sont similaires à celles obtenues pour des cultures ayant passé 3 semaines en présence de charbon actif seul.

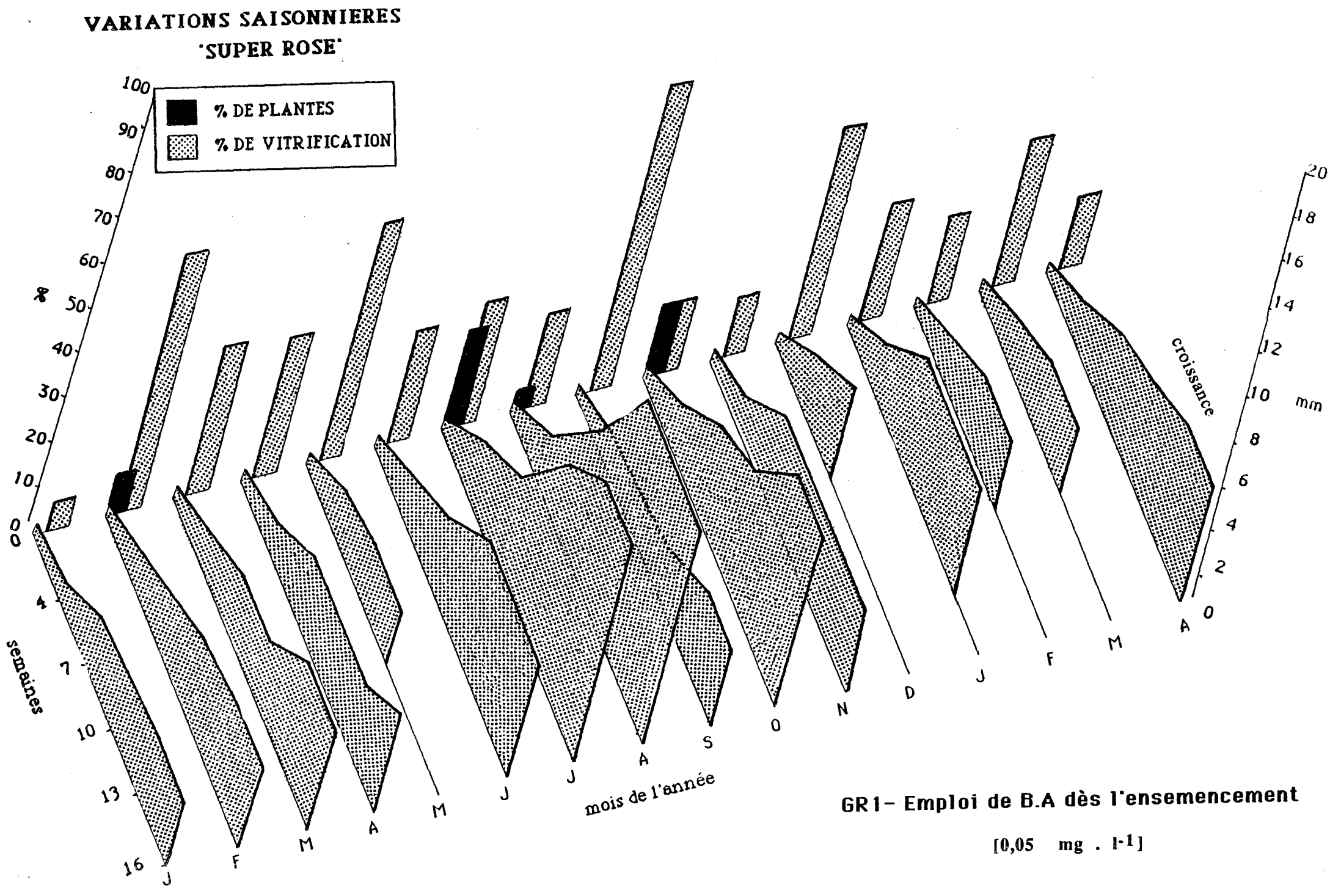
Le passage sur un milieu avec charbon actif ne doit donc être appliqué qu'aux *P. x hederaefolium* et pendant une courte période.

E - CONCLUSION

Lorsque le milieu convient, les 2 hybrides, produisent toujours un maximum de plantes pendant la saison estivale.

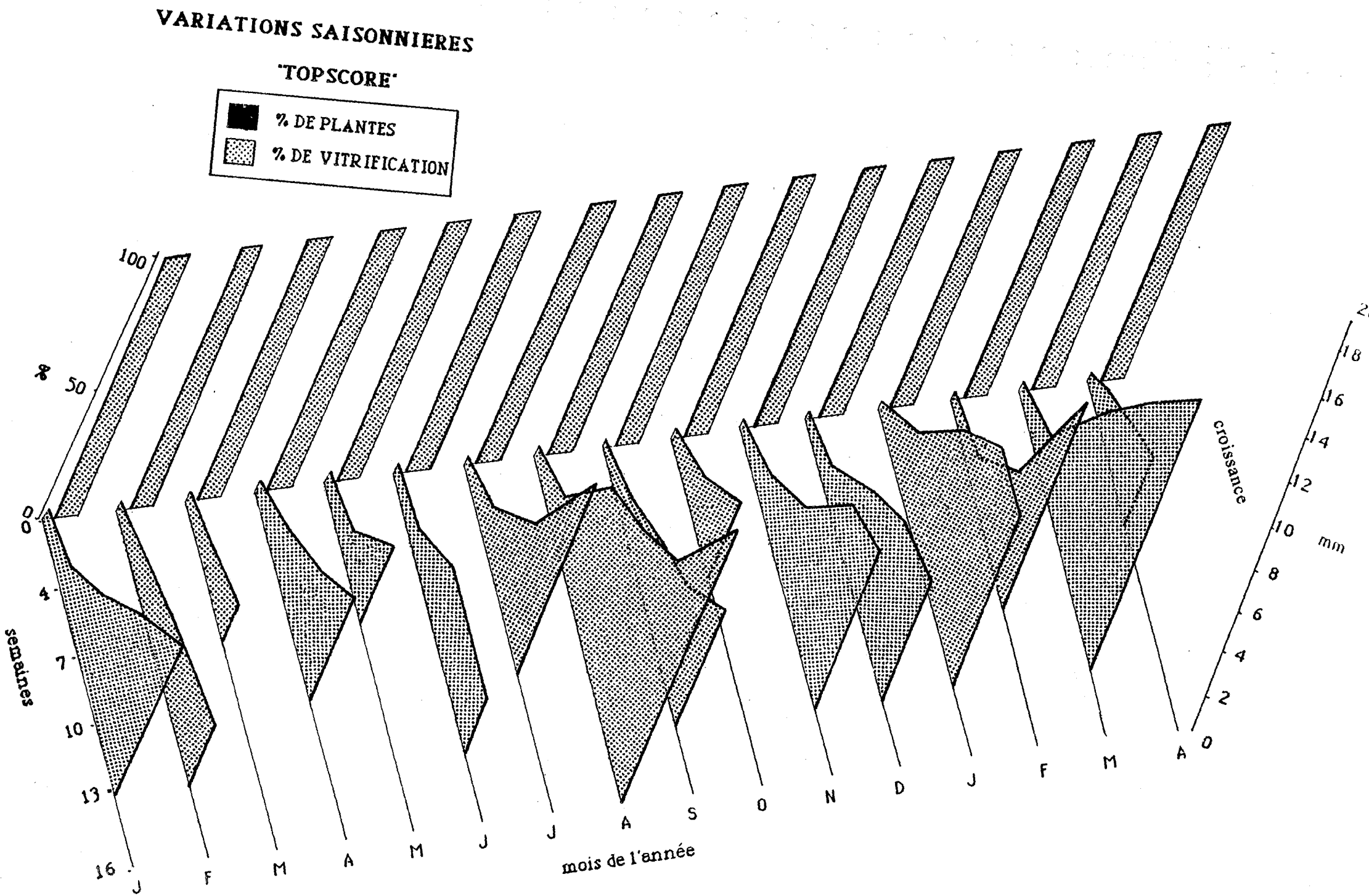
Les fluctuations apparaissant dans le taux de plantes obtenues chaque mois permettent d'expliquer les résultats très différents obtenus selon l'époque de l'ensemencement avec d'autres variétés dans d'autres expériences.

Les *P. x hederaefolium* ont un comportement très différent des *P. x hortorum* qui pourrait être dû à un taux de substances endogènes plus élevé. Ce phénomène nécessite donc la mise en place d'une technique de culture appropriée à chaque hybride : c'est à dire que les *P. x hortorum* donnent un maximum de plantes pendant l'année si ils sont dès leur ensemencement mis en présence de zéatine, et que les méristèmes *P. x hederaefolium* doivent attendre une semaine sur un milieu dépourvu d'hormone avant d'être mis en présence de cytokinine.

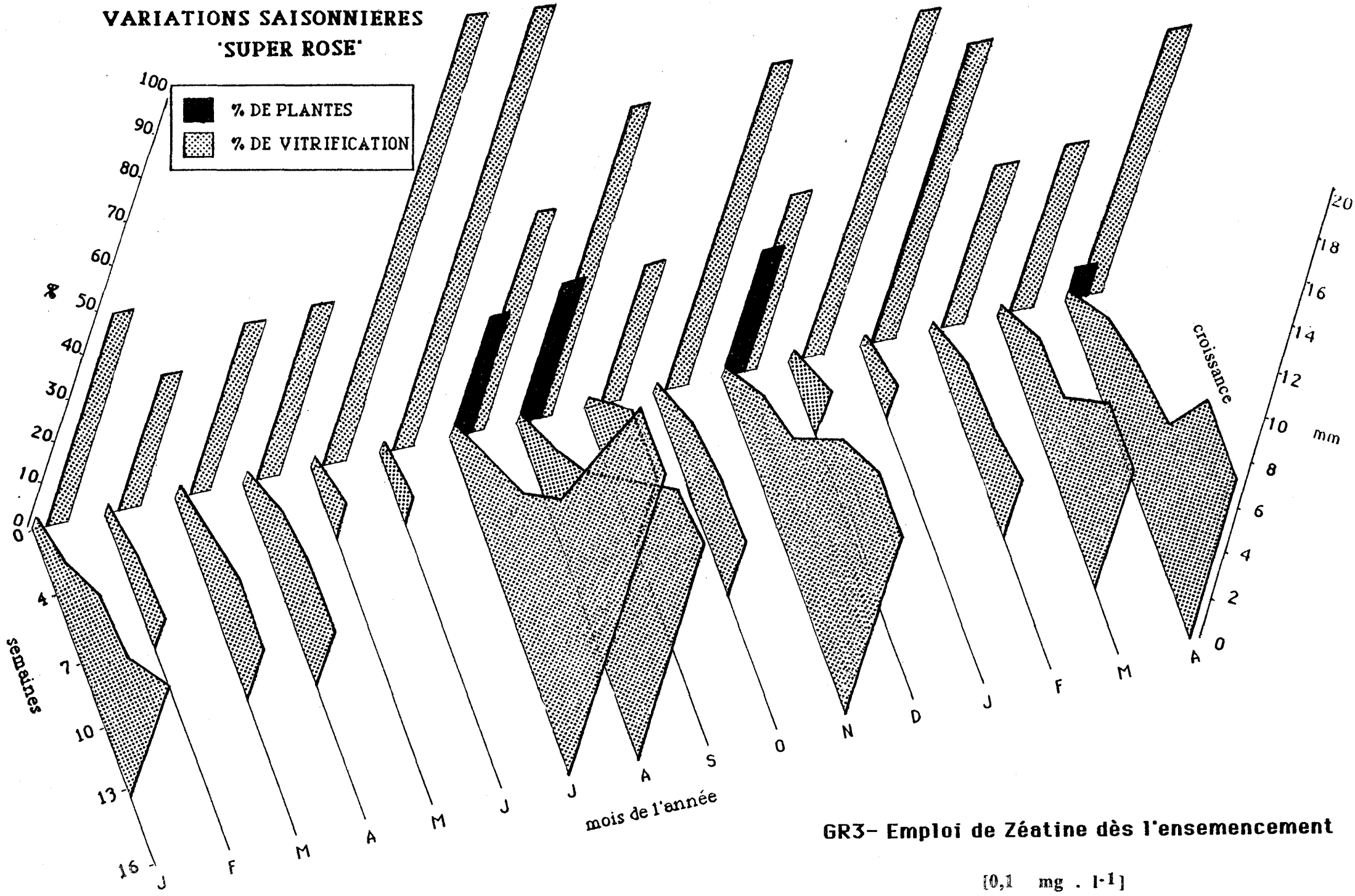


GR1- Emploi de B.A dès l'ensemencement

[0,05 mg . l-1]

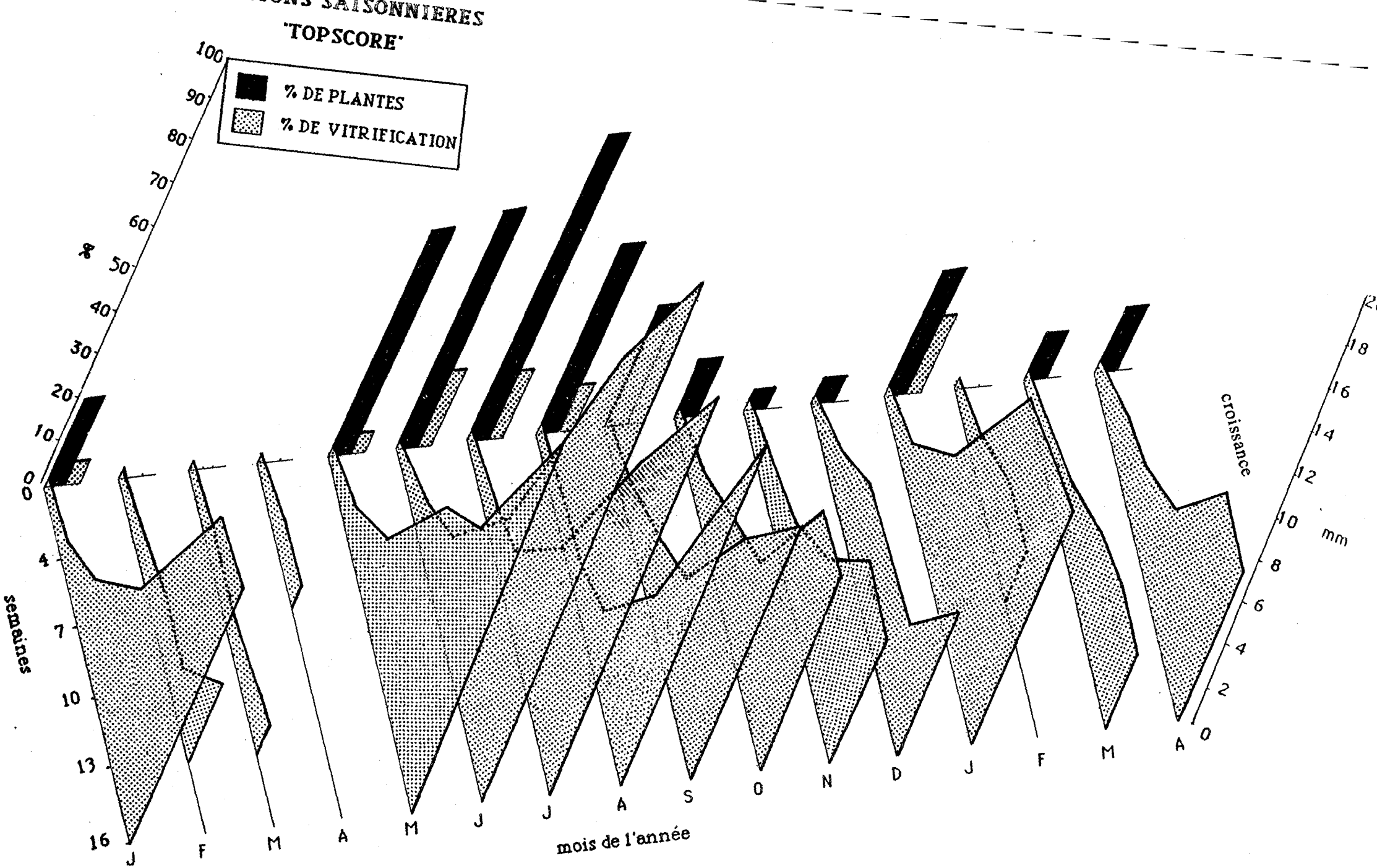


GR2- Emploi de B.A dès l'ensemencement

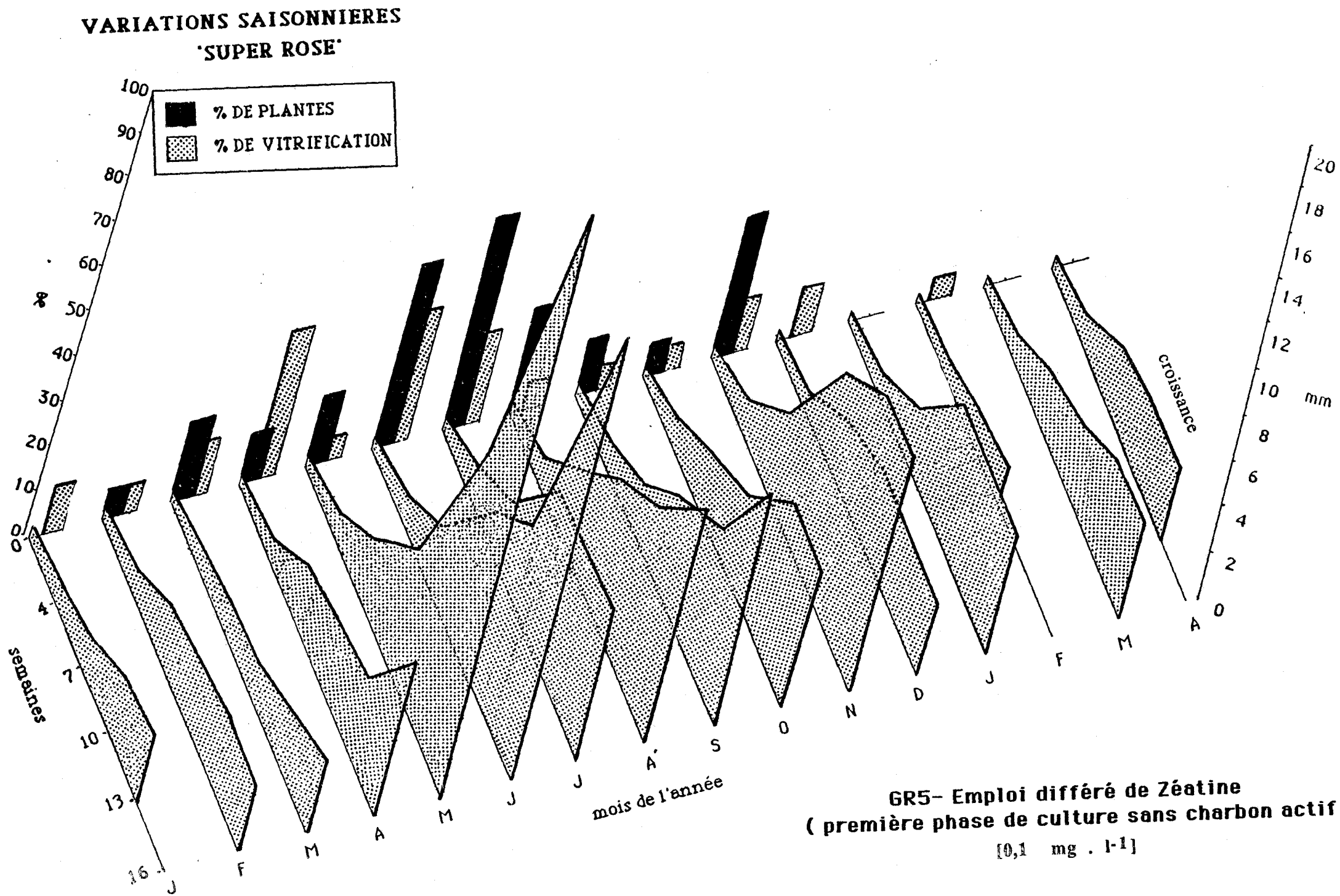


GR3- Emploi de Zéatine dès l'ensemencement

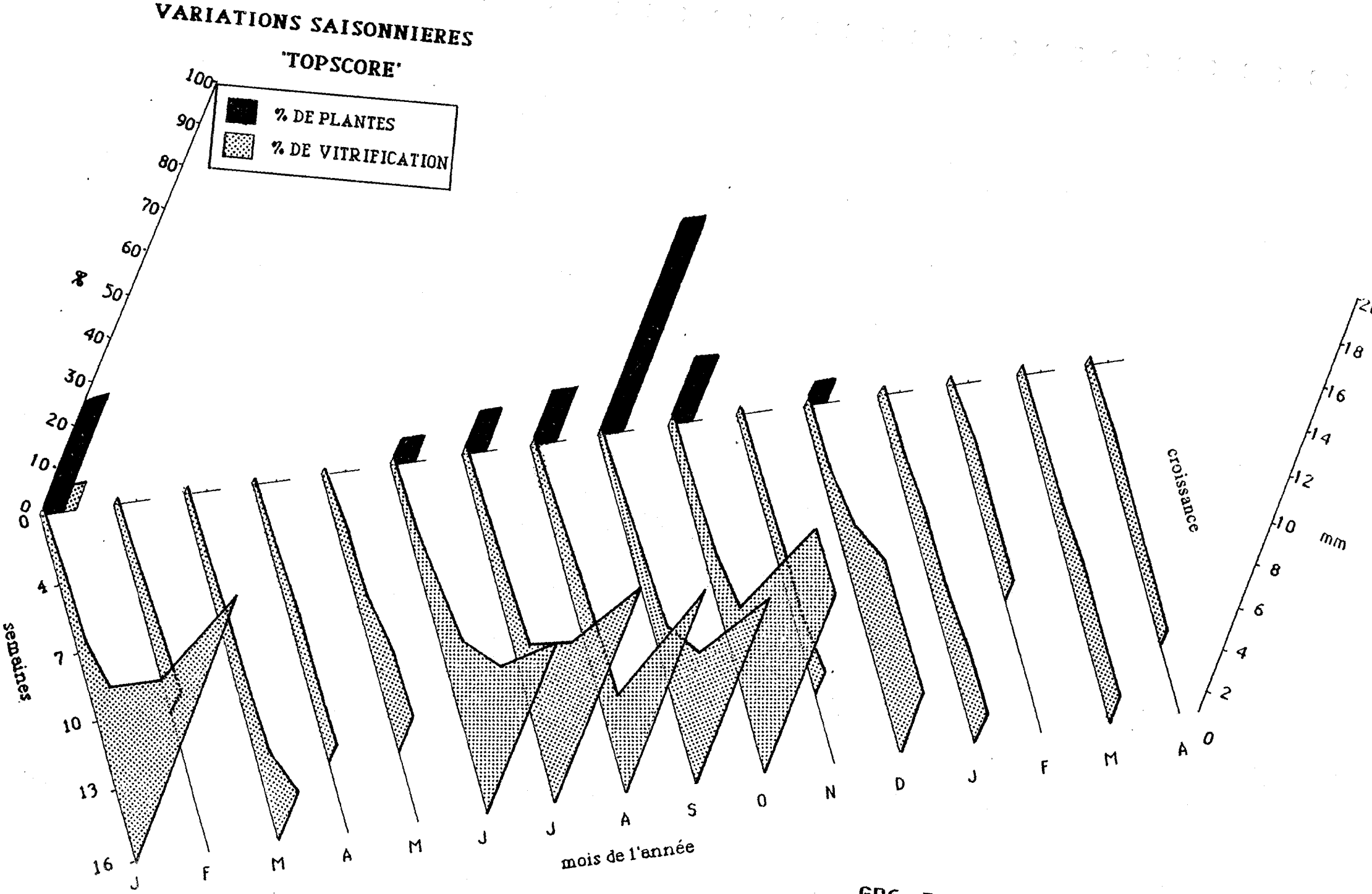
[0,1 mg . l-1]



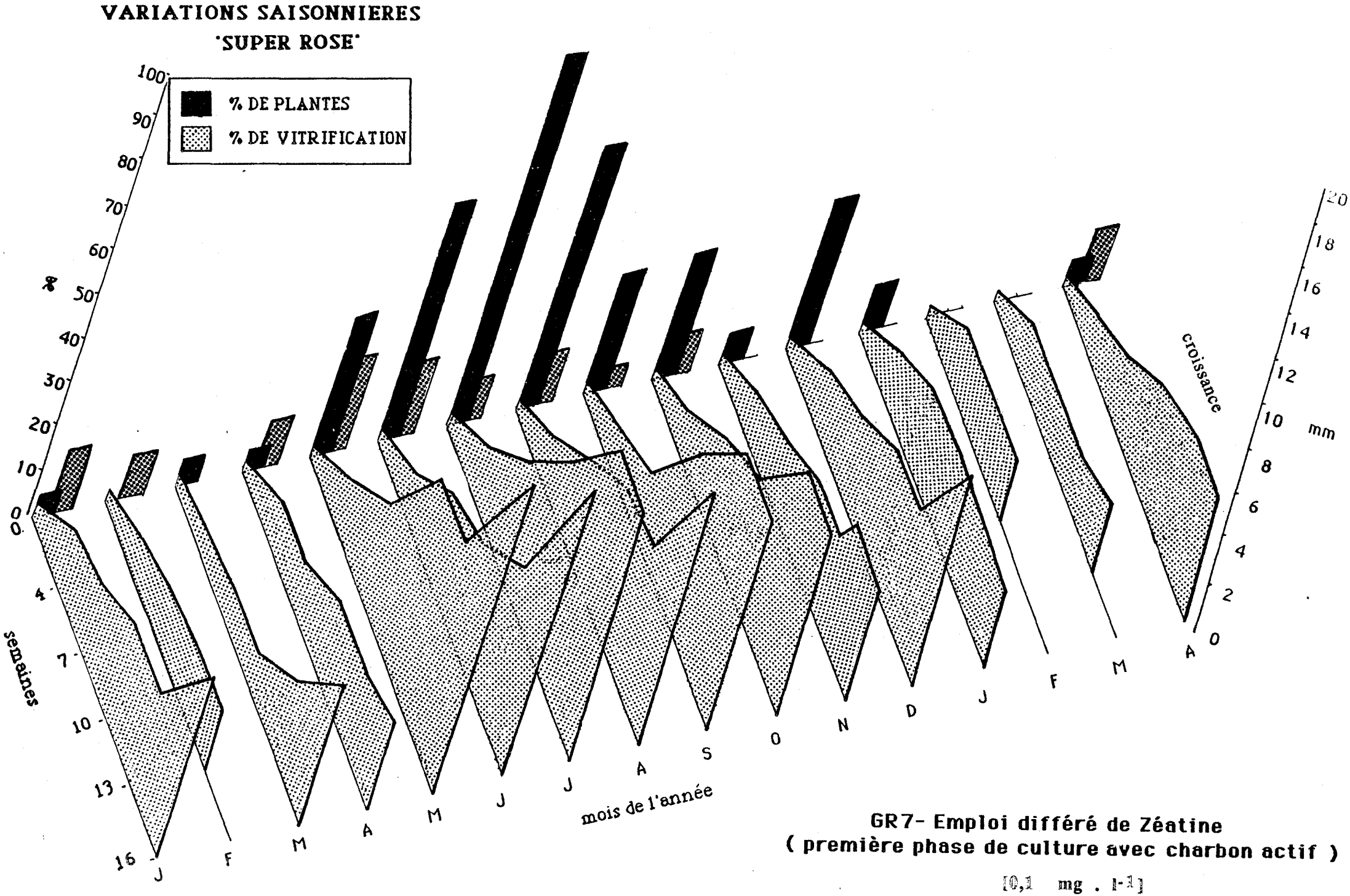
GR4- Emploi de Zéatine dès l'ensemencement



GR5- Emploi différé de Zéatine
(première phase de culture sans charbon actif)
[0,1 mg . l-1]

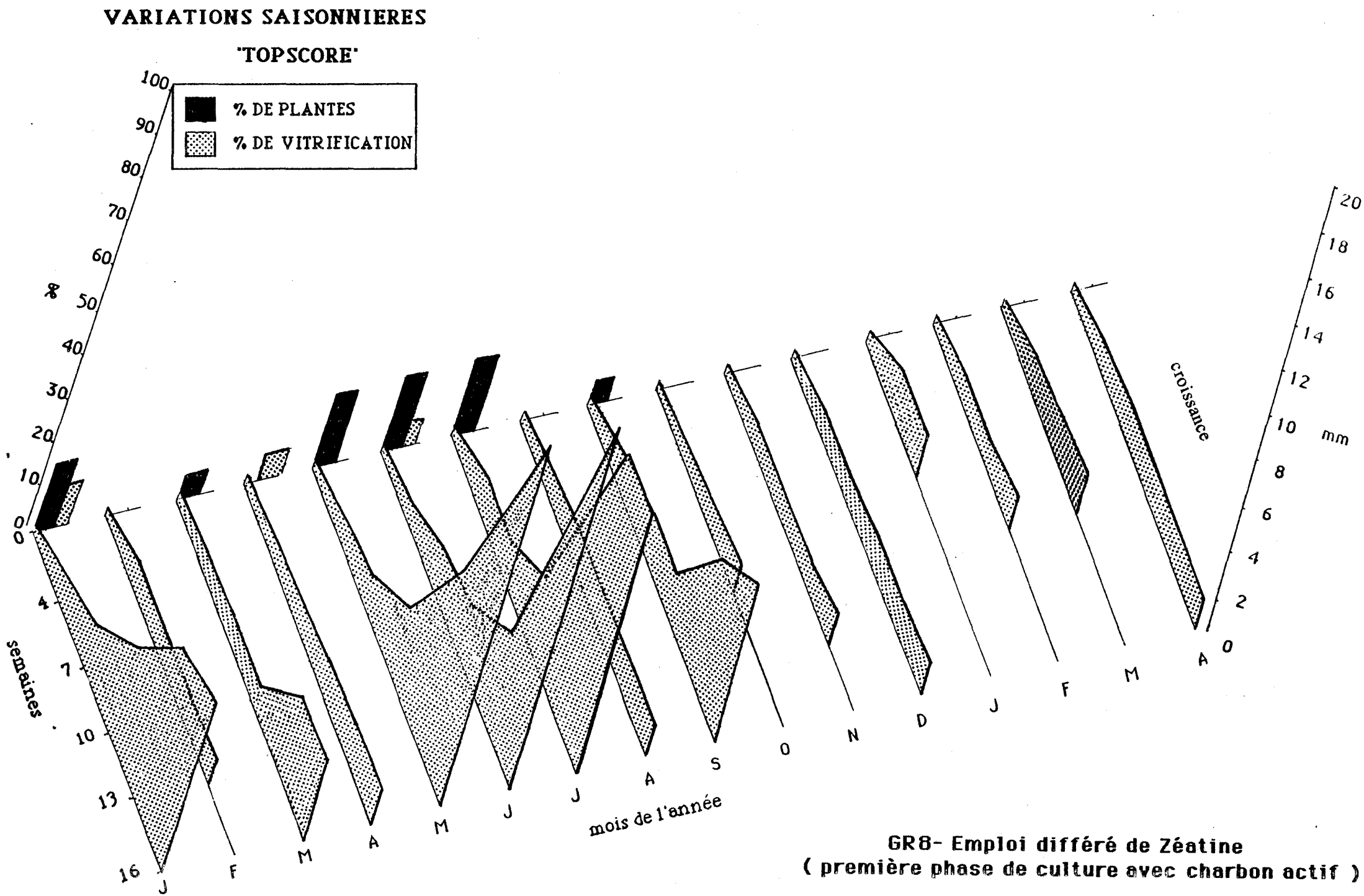


GR6- Emploi différé de Zéatine
(première phase de culture sans charbon actif)

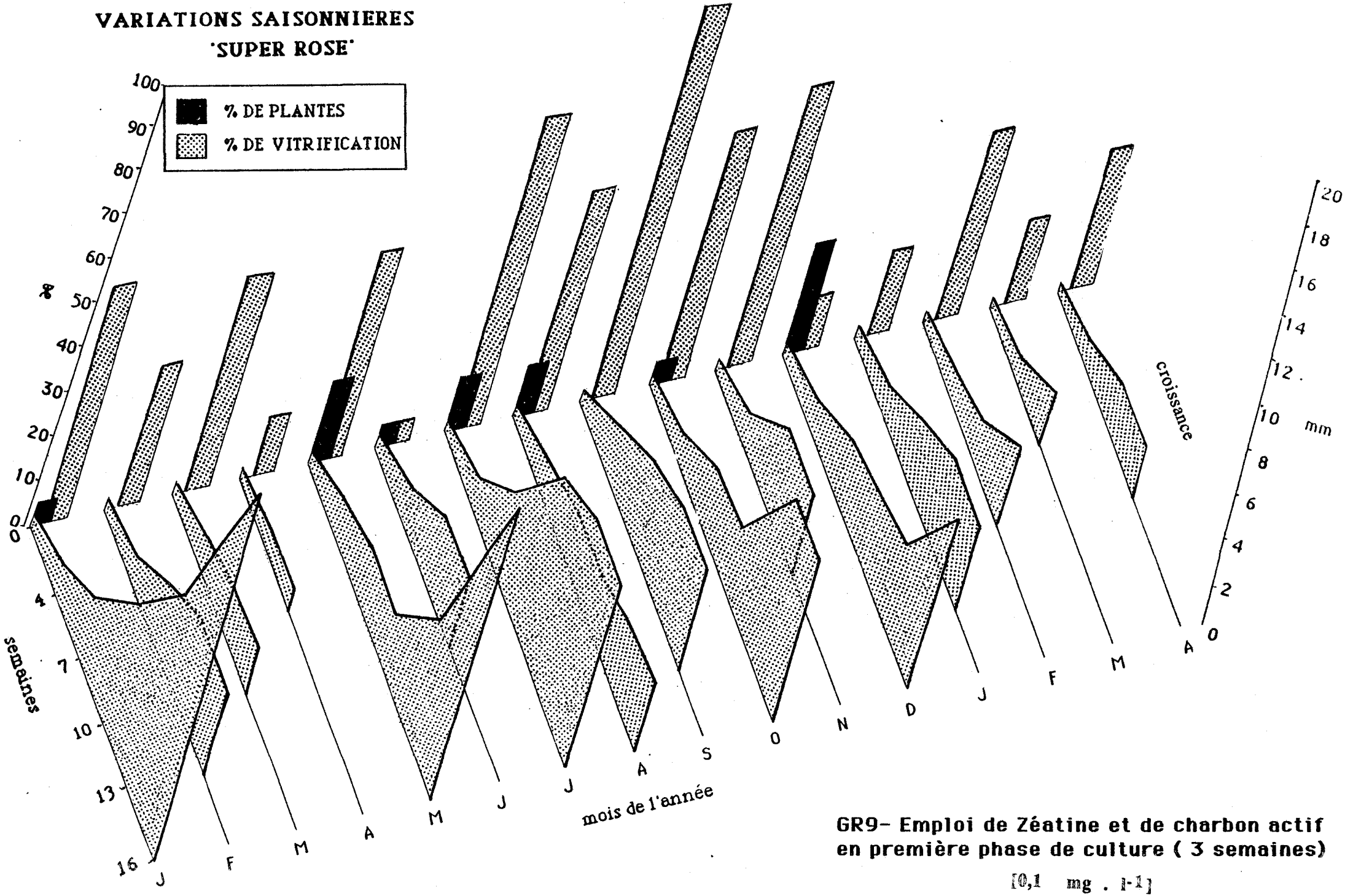


GR7- Emploi différé de Zéatine
(première phase de culture avec charbon actif)

[0,1 mg . l-1]

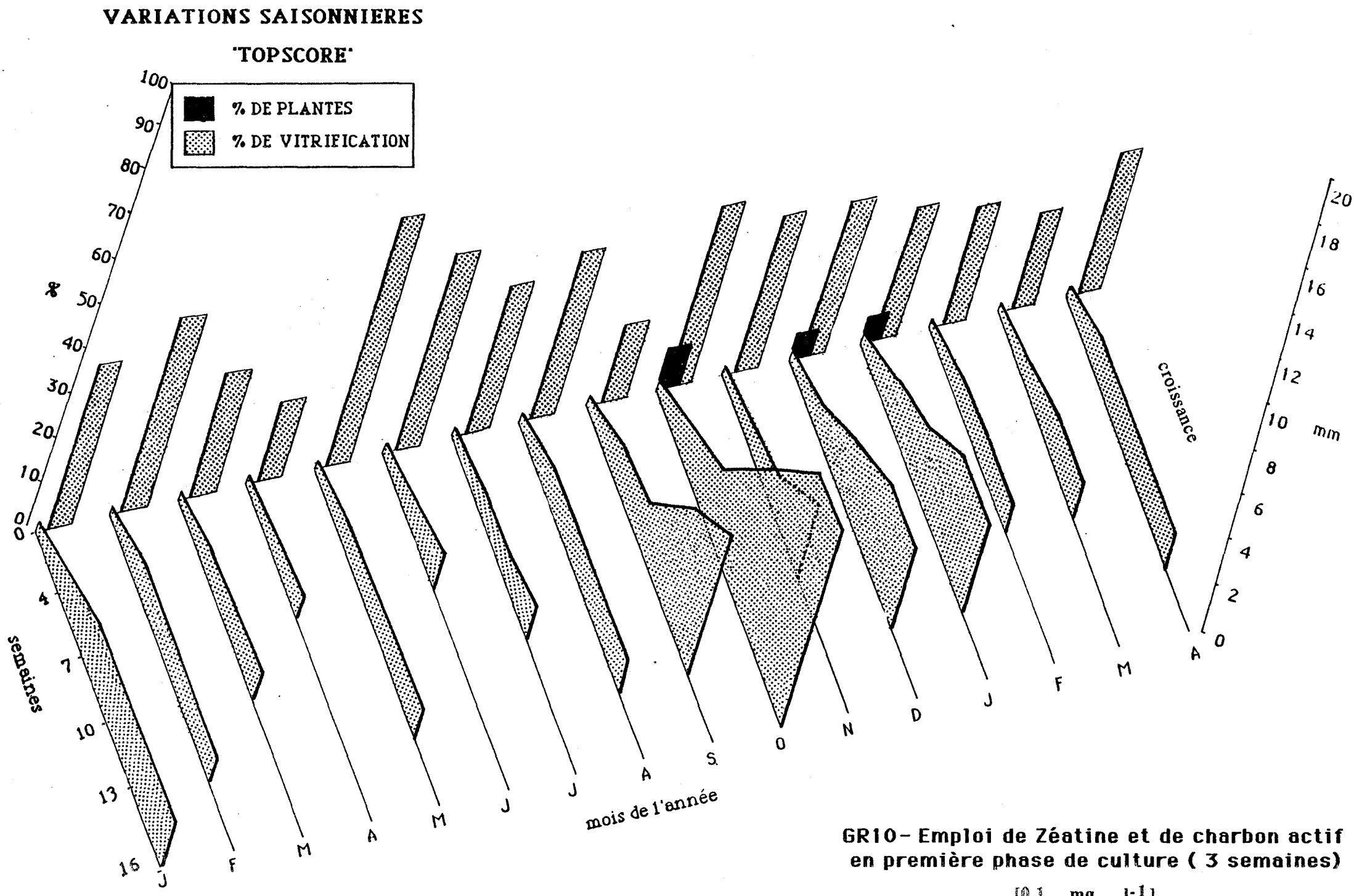


GR8- Emploi différé de Zéatine
(première phase de culture avec charbon actif)



GR9- Emploi de Zéatine et de charbon actif en première phase de culture (3 semaines)

[0,1 mg . l-1]



GR10- Emploi de Zéatine et de charbon actif en première phase de culture (3 semaines)

[0,1 mg . l^{-1}]

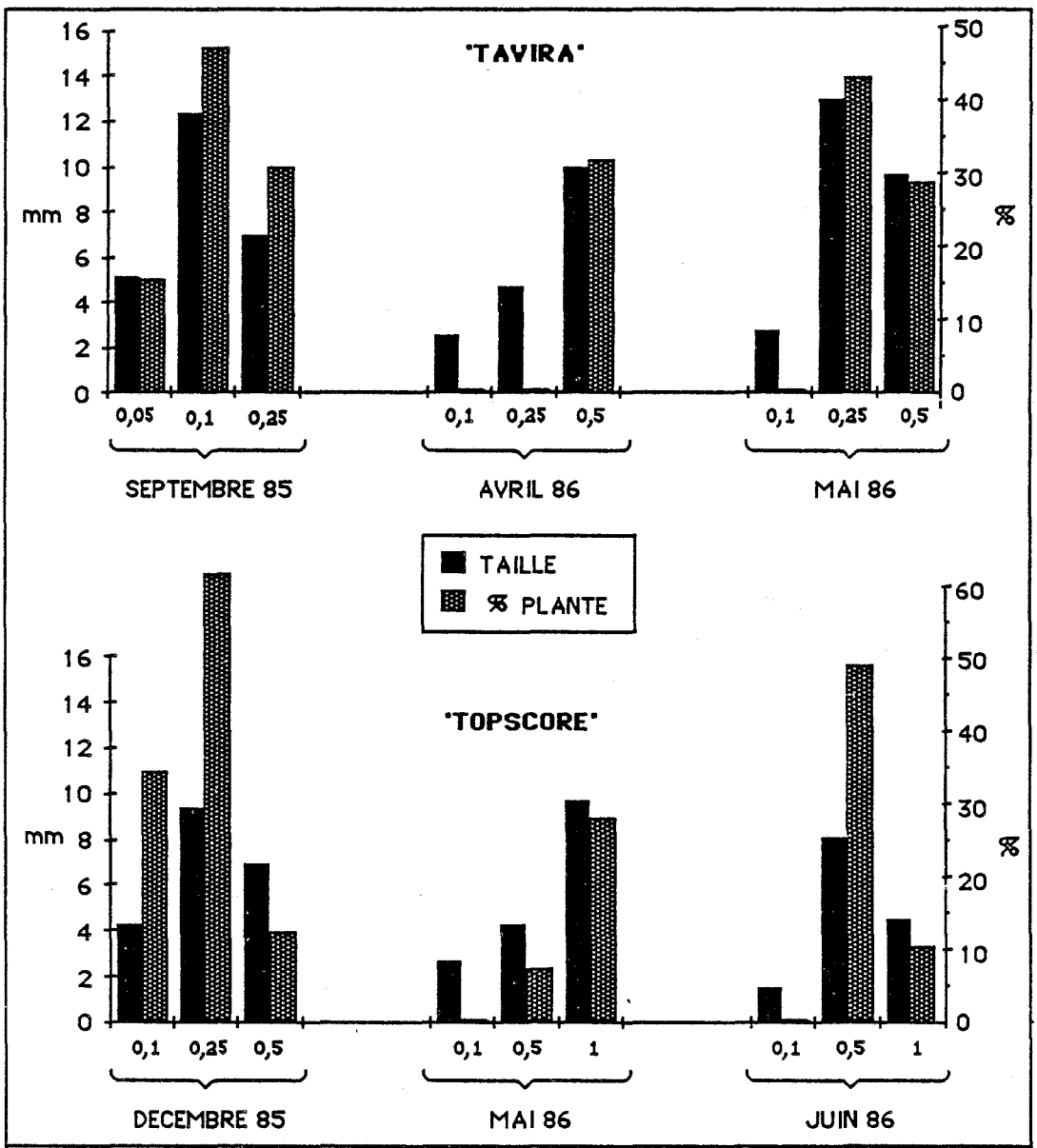
VIII - ESSAIS DE REVEIL PHYSIOLOGIQUE DES MERISTEMES

A - PAR LES HORMONES.

1) Les cytokinines

a) Influence de la saison sur la concentration optimale en cytokinine

En essayant de préciser la concentration optimale en cytokinine, nous nous sommes rendu compte que les résultats variaient selon l'époque de l'année. Les essais ont été réalisés avec la zéatine pour les cultivars 'Tavira' (*P. x hederaefolium*) et 'Palais' (*P. x hortorum*). L'ensemencement des méristèmes a lieu sur du milieu de base enrichi de charbon actif (1 g l^{-1}) pendant la première semaine de culture.(cf **PLANCHE IV**).



VARIATION DE LA CONCENTRATION OPTIMALE EN ZEATINE (mg.l-1) SELON LA SAISON SUR LA CROISSANCE DES MERISTEMES

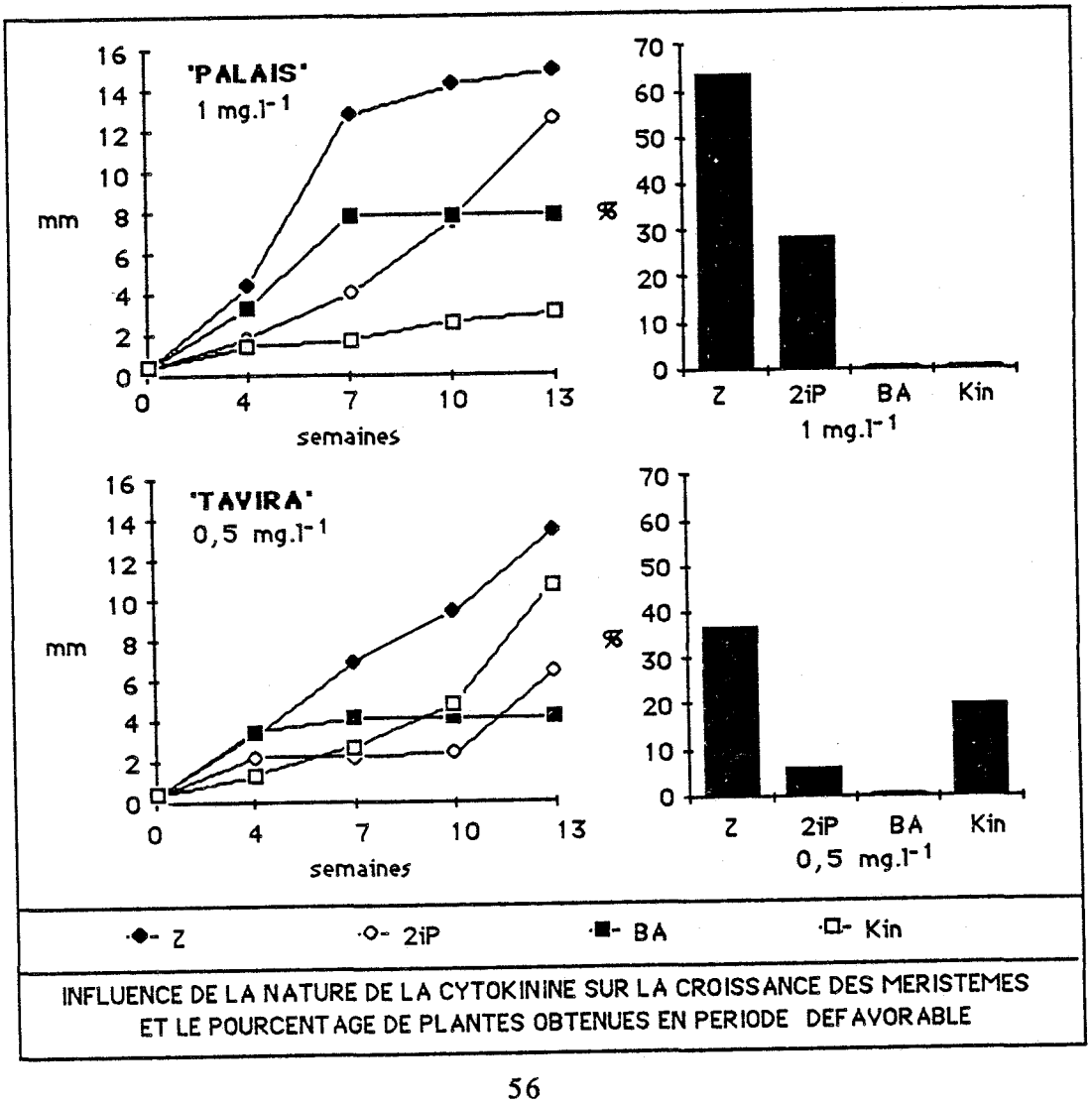
Les besoins en zéatine semblent varier avec:
- le type d'hybride : les *P. x hederaefolium* sont moins exigeants que les *P x hortorum*
- la saison : les besoins sont moins importants en période estivale
- l'année : les besoins ont été plus importants en 1986 qu'en 1985

En employant la zéatine nous n'avons jamais dépassé 1 $mg.l^{-1}$ pour les *P. x hortorum* et O,5 $mg.l^{-1}$ pour les *P. x hederaefolium* qui sont plus sensibles aux hormones afin de limiter au maximum les risques de malformations et d'apparition de bourgeons adventifs. En effet en augmentant le taux d'hormone pendant l'hiver on compense peut être un manque, mais le méristème qui se développe alors avec 0,5 $mg.l^{-1}$ n'est pas comparable à celui qui se développe avec O,1 $mg.l^{-1}$ de zéatine en été : le méristème d'été donne le plus souvent une seule plante pouvant éventuellement développer quelques bourgeons axillaires alors que le méristème d'hiver se boursouffle et produit de nombreux bourgeons axillaires ou adventifs.

b) Influence de la nature de la cytokinine en période défavorable.

Nous avions vu précédemment que la zéatine était l'hormone la plus efficace à O,1 mg. l^{-1} en période favorable. Nous avons alors voulu voir si cette spécificité est maintenue l'hiver lorsque les doses en substances de croissance doivent être augmentées.

Pour le *P. x hortorum* 'Topscore' nous avons employé la concentration de 1 mg. l^{-1}, mais pour les *P. x hederaefolium* nous n'avons utilisé que O,5 mg. l^{-1} car ils sont plus sensibles aux hormones. L'ensemencement des explants se fait sur du milieu de base enrichi en charbon actif (1 g. l^{-1} pendant une semaine) puis additionné de cytokinine pour les repiquages ultérieurs (toutes les trois semaines).



INFLUENCE DE LA NATURE DE LA CYTOKININE SUR LA CROISSANCE DES MERISTEMES ET LE POURCENTAGE DE PLANTES OBTENUES EN PERIODE DEFAVORABLE

En période défavorable le développement au cours des 10 premières semaines de culture est plus important en présence de zéatine et de BA. mais ensuite cette dernière se révèle peu efficace. En effet, la BA. permet un bon démarrage des méristèmes mais provoque ensuite l'hyperhydricité et la nécrose des tissus.

Après 13 semaines de culture il est possible d'obtenir des plantes avec 3 cytokinines: la zéatine, la 2 iP et la kinétine. Le meilleur rendement étant obtenu en présence de zéatine.

Notons que la kinétine vient en 2ème position pour le *P. x hederaefolium* et seulement en 3ème position pour le *P. x hortorum.*

Mais en période défavorable la prépondérance de la zéatine tend à se réduire sans doute par suite des concentrations plus importantes utilisées.

La zéatine peut être utilisée en faible dose l'été mais avant et après il faut progressivement augmenter sa concentration. La zéatine a un maximum d'effet sur les méristèmes de *P. x hederaefolium* si l'incorporation au milieu de base est différée d'une semaine mais chez les *P. x hortorum* il faut au contraire mettre les méristèmes en sa présence dès leur ensemencement.

2) L'auxine

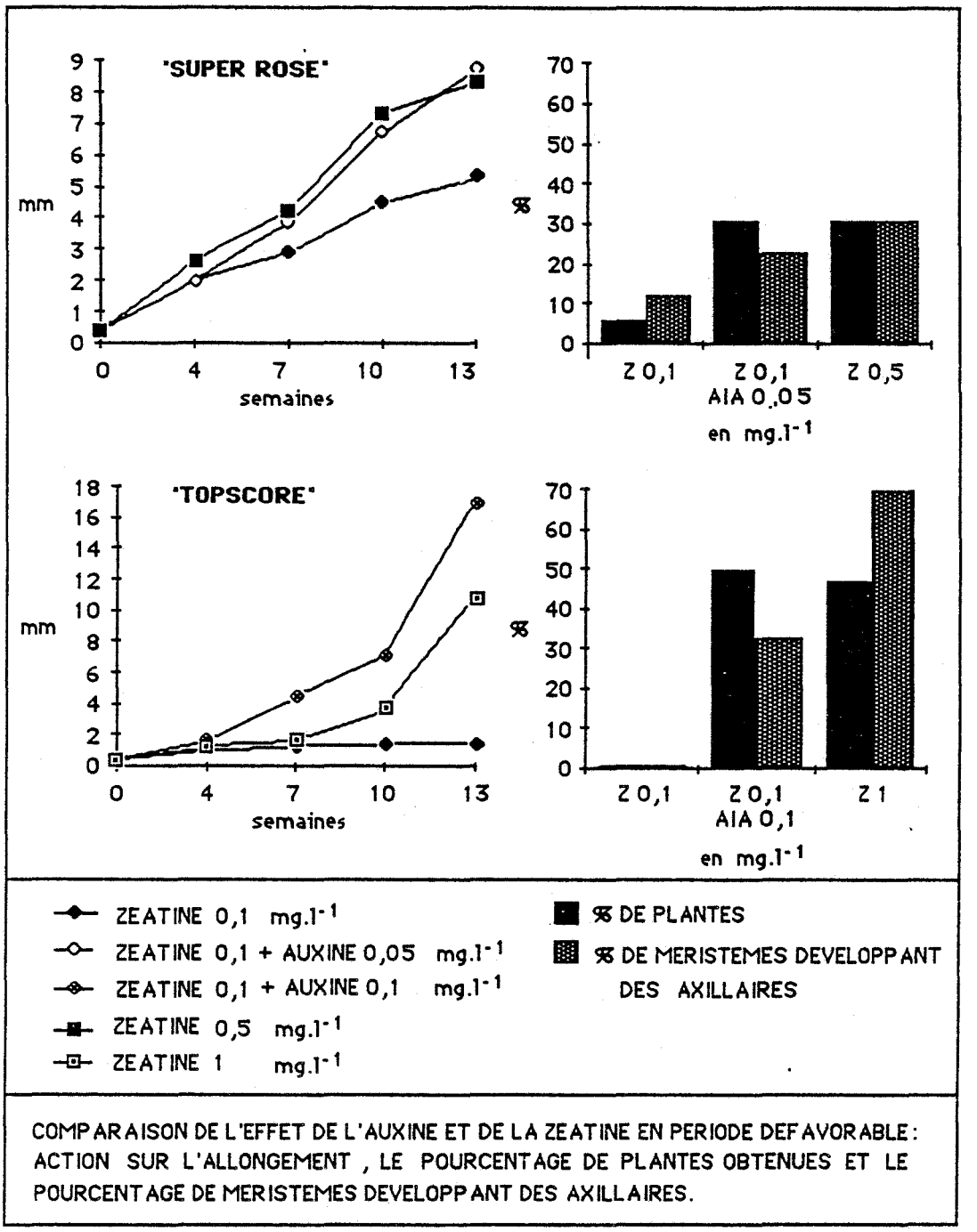
a) Rôle de l'auxine en période défavorable, comparaison avec la zéatine.

Nous avons voulu déterminer le rôle de l'auxine associée à une cytokinine, à une époque de l'année défavorable à la croissance.

Les concentrations : (AIA : O,1 $mg.l^{-1}$; zéatine : O,1 $mg.l^{-1}$) pour le *P. x hortorum* 'Topscore' et (AIA : O,O5 mg. l^{-1} : zéatine : O,1 $mg.l^{-1}$) pour le *P. x hederaefolium* 'Super Rose' sont comparées aux concentrations de zéatine de 1 mg. l^{-1} et O,5 mg. l^{-1}.

Les résultats sont notés après 4 semaines puis toutes les 3 semaines:

(cf PLANCHE V)



COMPARAISON DE L'EFFET DE L'AUXINE ET DE LA ZEATINE EN PERIODE DEFAVORABLE: ACTION SUR L'ALLONGEMENT , LE POURCENTAGE DE PLANTES OBTENUES ET LE POURCENTAGE DE MERISTEMES DEVELOPPANT DES AXILLAIRES.

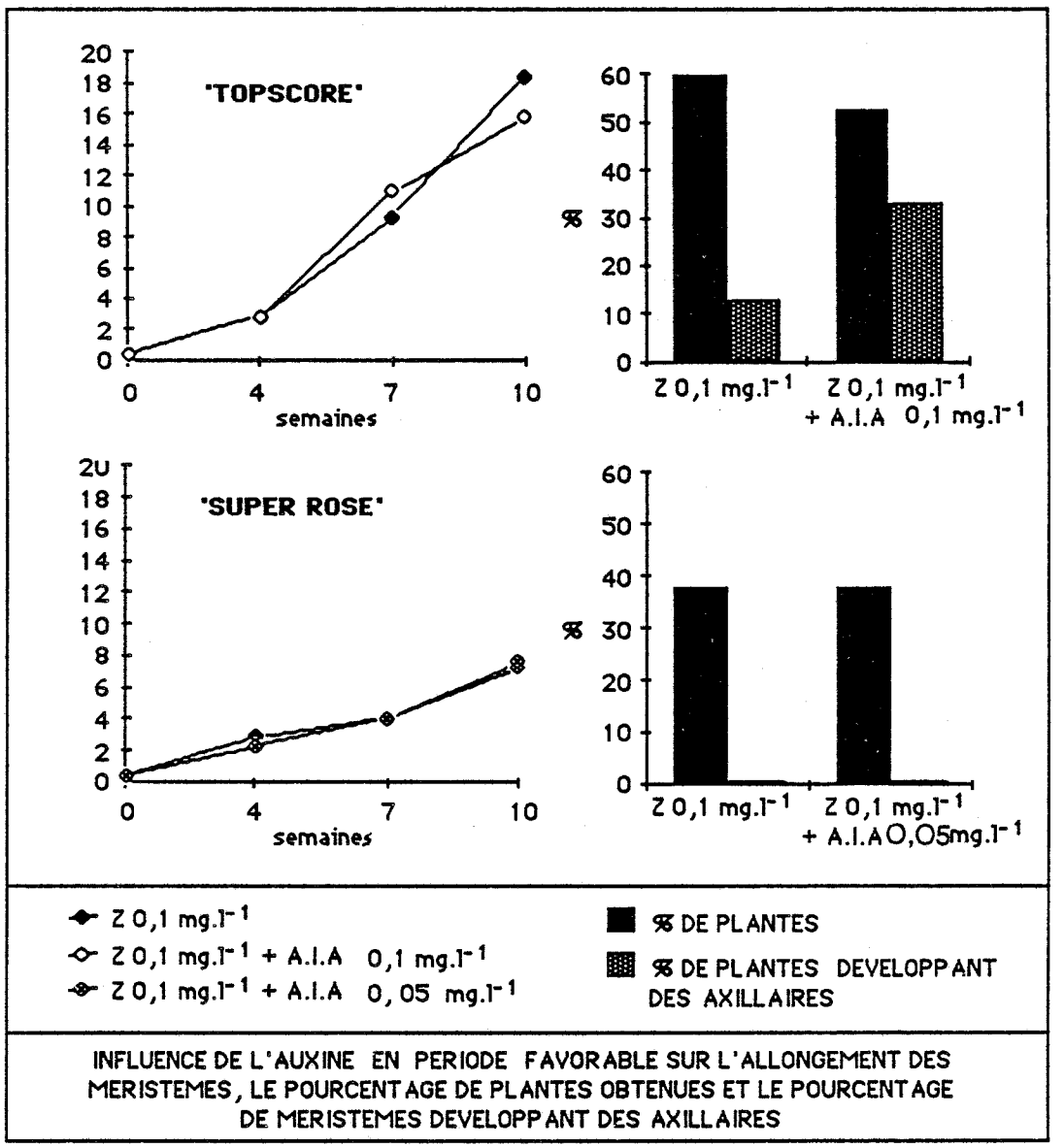
Dès les premières semaines de culture, l'auxine ajoutée au milieu de base se montre favorable au développement des méristèmes et en fin d'expérience on peut constater que la faible concentration à laquelle elle a été utilisée est aussi efficace pour l'obtention de plantes que si l'on multipliait la concentration de zéatine par 5 pour les *P. x hederaefolium* et par 10 pour les *P. x hortorum*. Notons également que l'allongement des plantes est plus important en présence d'auxine, qui favorise l'allongement cellulaire, alors que les cytokinines stimulent la division cellulaire; par contre l'auxine est moins efficace que la zéatine à l'égard du développement des bourgeons axillaires.

b) Rôle de l'auxine en période favorable.

Dans une autre expérience avec des auxines (VI, 2) , en période favorable, il était apparu qu'aux concentrations employées, elles n'étaient pas bénéfiques au développement.

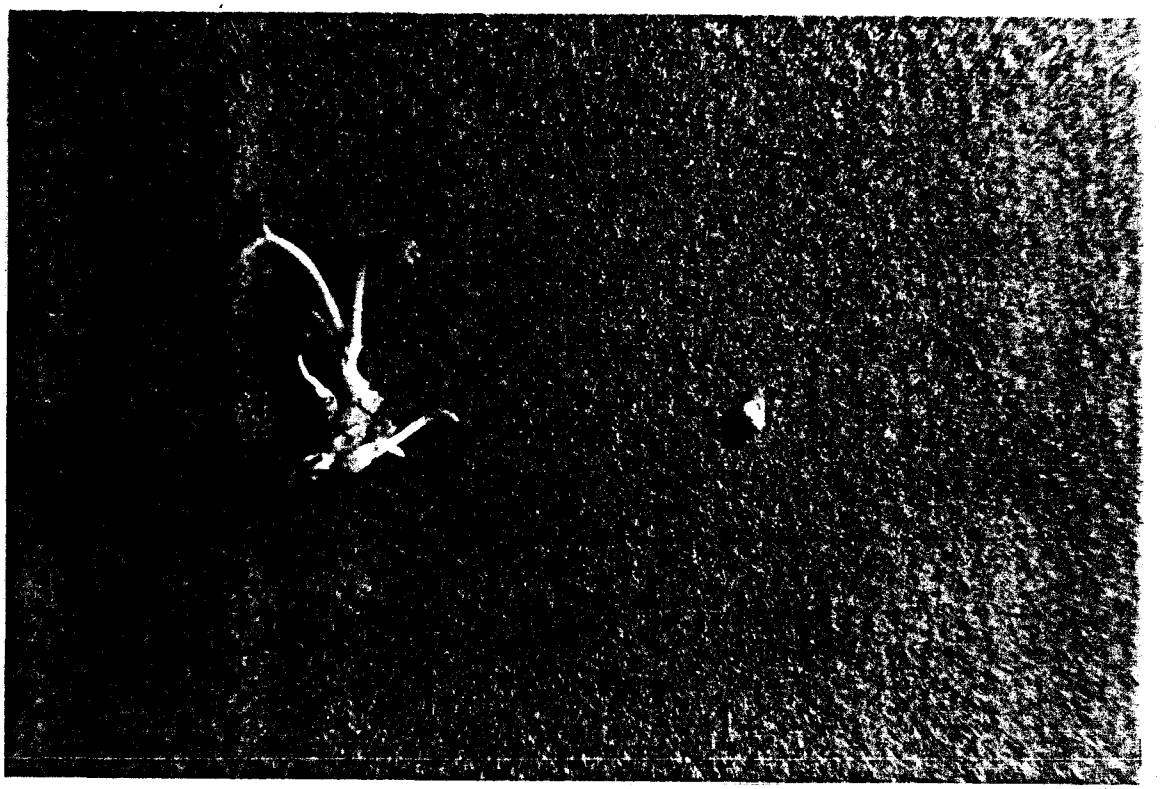
Nous avons donc voulu vérifier si l'auxine est un facteur limitant saisonnier ou permanent, en étudiant son action en début et en pleine saison favorable. Les cultivars 'Topscore' (*P. x hortorum*) et 'Super Rose' (*P. x hederaefolium*) sont ensemencés selon les conditions qui s'étaient révélées les plus favorables, c'est-à-dire immédiatement en présence des régulateurs de croissance pour 'Topscore', et d'abord sur le milieu de base enrichi de charbon actif pour 'Super Rose'.

Les résultats sont rélevés toutes les 3 semaines après 4 semaines de culture.

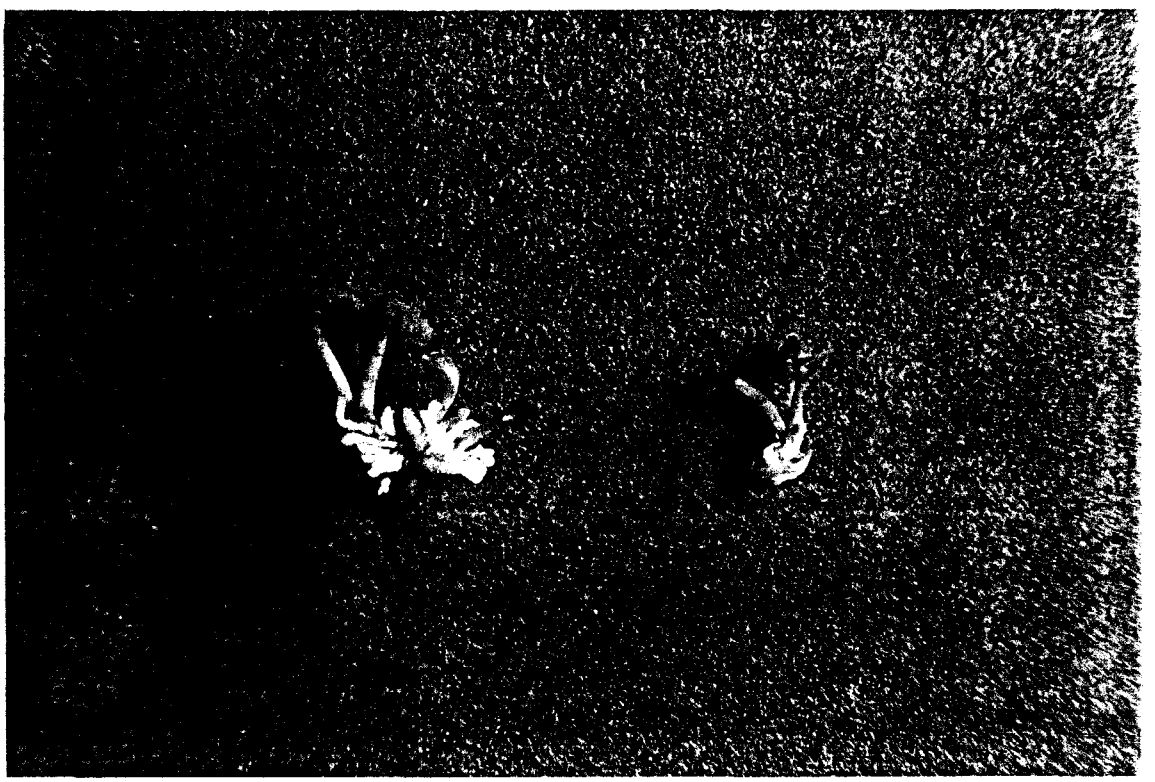


INFLUENCE DE L'AUXINE EN PERIODE FAVORABLE SUR L'ALLONGEMENT DES MERISTEMES, LE POURCENTAGE DE PLANTES OBTENUES ET LE POURCENTAGE DE MERISTEMES DEVELOPPANT DES AXILLAIRES

Contrairement à ce que nous avons observé en période défavorable , l'action de l'auxine est négligeable: les courbes de croissance et le rendement en plantes sont proches.



De gauche à droite: - méristème cultivé en présence d'auxine
- témoin
(var. : 'TOPSCORE')



De gauche à droite: - méristème cultivé en présence d'auxine
- témoin
(var. : 'SUPER ROSE')

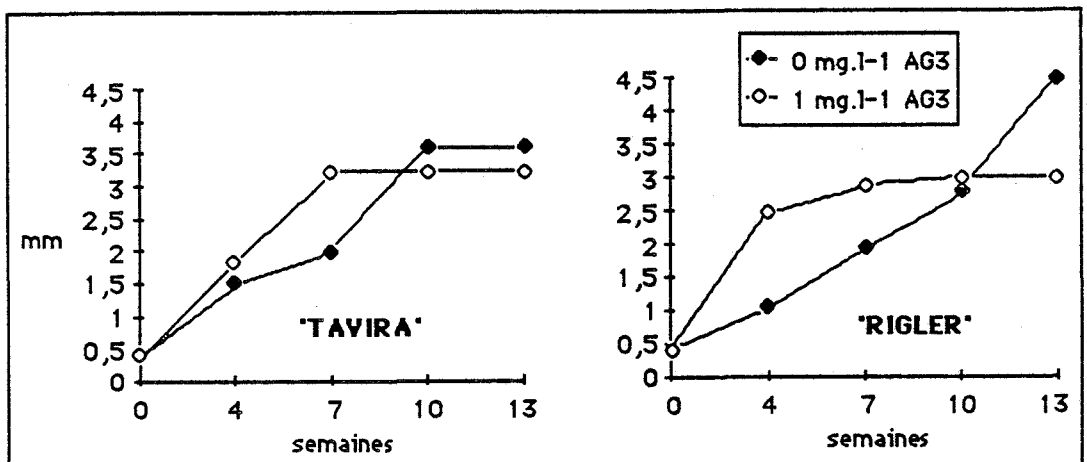
PLANCHE V - INFLUENCE DE L'AUXINE SUR LE DEVELOPPEMENT DES MERISTEMES EN PERIODE DEFAVORABLE

Chez le *P. x hortorum* la présence d'auxine diminue légèrement le rendement au profit d'un développement d'axillaires plus importants.

L'auxine semble donc de moins en moins indispensable au fur et à mesure que la saison devient favorable, ce qui corrobore les expériences qui nous avaient fait abandonner l'emploi d'auxine en pleine saison favorable (V I -2) .

3) Association de l'AG3 a une cytokinine en période défavorable.

Les substances de croissance peuvent parfois présenter des actions en synergie avec d'autres hormones c'est pourquoi nous avons associé l'AG3 (1mg.l^{-1}) à la zéatine (O,1 mg.l^{-1}) dans le milieu de base. Cette expérience se situant en période défavorable il était intéressant de voir si l'AG3 ne pouvait pas provoquer le "réveil" des méristèmes. Les cultivars employés sont 'Tavira' (*P. x hederaefolium*) et 'Rigler' (*P.* x *hortorum*). les résultats sont pris après 4 puis toutes les 3 semaines.



EFFET DE L'ASSOCIATION AG$_3$-ZEATINE SUR L'ALLONGEMENT DES MERISTEMES EN PERIODE DEFAVORABLE

Les résultats rejoignent ceux obtenus antérieurement (VI,C). Dans les premières phases la croissance avec AG3 apparait meilleure que chez les témoins à cause des déformations foliaires. L'introduction de cytokinines dans le milieu permet cependant de poursuivre l'expérience et de constater plus tard que le lot expérimental peut rattraper le témoin. L'AG3, même en présence de zéatine, n'améliore ni le réveil ni le développement des méristèmes. A la concentration utilisée (1 mg.l^{-1}), elle s'avère plutôt toxique puisque les feuilles déformées finissent pas se nécroser, entrainant par la suite un ralentissement de la croissance. Il s'agit peut-être encore d'un problème de spécificité de la gibberelline utilisée.

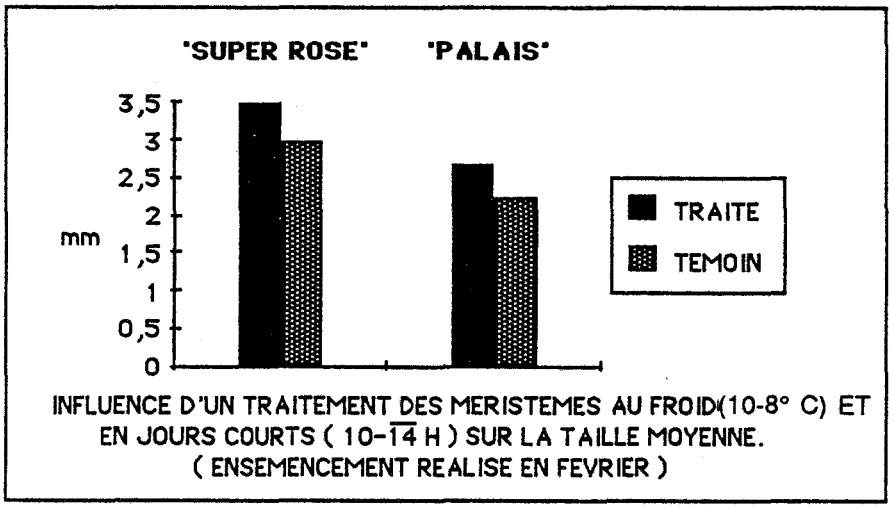
L'activation des méristèmes en période défavorable nécessite donc l'augmentation du taux en cytokinines ou l'addition d'un peu d'auxine. Ces compléments correspondent probablement à des changements dans l'équilibre des substances endogènes du *Pelargonium*. L'addition d'auxine permet un allongement plus important des méristèmes (préférentiellement les *P. x hortorum*) et un débourrement des bourgeons axillaires (plus faible cependant qu'avec une forte concentration de cytokinines).

B - PAR UN TRAITEMENT AU FROID.

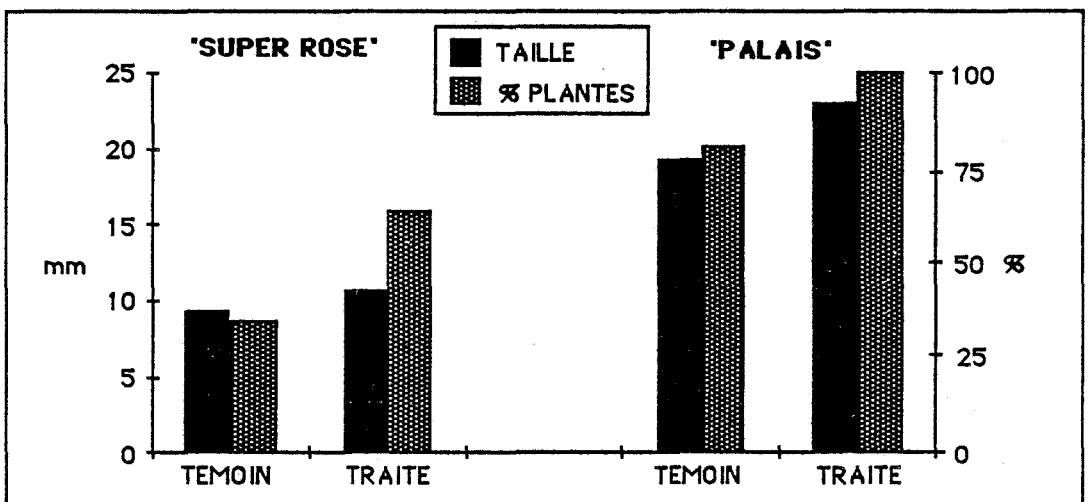
Un premier essai a été effectué sur des méristèmes placés d'abord deux semaines au froid et en jours courts (10-8°C ; 10-$\overline{14}$h) puis en conditions estivales.

Dans un autre essai, le traitement est appliqué aux pieds-mères. Ceux-ci sont ensuite placés 2 semaines en conditions estivales avant le prélèvement des méristèmes.

La culture des méristèmes a lieu à 22 ± 2° C en 12 - $\overline{12}$ h.



INFLUENCE D'UN TRAITEMENT DES MERISTEMES AU FROID(10-8° C) ET EN JOURS COURTS (10-$\overline{14}$ H) SUR LA TAILLE MOYENNE. (ENSEMENCEMENT REALISE EN FEVRIER)



INFLUENCE D'UN TRAITEMENT AU FROID(10-8°C)ET ENJOURS COURTS(10-$\overline{14}$ H) DES PIEDS MERES SUR LA TAILLE MOYENNE DES MERISTEMES ET LE POURCENTAGE DE PLANTES OBTENUES. (ENSEMENCEMENT REALISE EN AVRIL)

Les résultats de la 2ème expérience sont plus intéressants puisqu'on obtient des plantes. Il faut toutefois noter que la 1ère expérience a été réalisée sur les méristèmes en février, c'est-à-dire pendant la période la plus défavorable au développement, alors que l 'ensemencement de la 2ème expérience a été réalisé debut avril, à la fin de la période défavorable. Cela explique sans doute que la première expérience permet seulement une amélioration de la croissance alors que la seconde permet d'augmenter le nombre de plantes obtenues. Il semble donc que le froid et les jours courts augmentent à ces époques la réactivité des méristèmes.

IX - LA VITRIFICATION DU *PELARGONIUM* EN CULTURE *IN VITRO*

La vitrification du *Pélargonium* en culture *in vitro* ne concerne jamais les germinations ni les microplantes avec 2 feuilles et un gros bourgeon non hyperhydrique. Il semblerait que le phénomène résulte d'une alimentation anormale pendant les premiers stades où la microplante n'est pas autonome et ne possède pas de réserve.

En fait il faut considérer 2 types de bourgeons vitrifiés: ceux qui ont une forme normale et ceux qui présentent des malformations. Les premiers peuvent récupérer après 2 mois éventuellement une structure normale, les autres sont irrécupérables.

Notons aussi que le phénomène de vitrification s'accompagne le plus souvent d'un phénomène de callogenèse à la base des explantats. Nous allons passer en revue quelques conditions qui nous ont donné jusqu'à 100 % de vitrification.

A) Le milieu liquide

Tous nos essais d'ensemencement de méristèmes sur ponts de cellulose en milieu liquide ou en milieu liquide agité sont demeurés vains et ont conduit au bout d'un mois à 100 % de vitrification avec apparition d'ébauches filiformes en milieu agité.

Le milieu liquide provoquerait une entrée d'eau trop importante qui entraine le grandissement cellulaire (et non une multiplication des cellules) faisant croire au début à une certaine croissance.

B) Le charbon actif

Au cours de nos premieres tentatives d'ensemencement nous avons utilisé le milieu minéral de MURASHIGE et SKOOG (1962) additionné d'1 g. l^{-1} de charbon actif pendant un mois .Les méristèmes peuvent alors atteindre la taille de 10 mm et sont tous vitreux (mais sans cal) .

Après transfert sur le milieu de MURASHIGE et SKOOG enrichi en kinétine (0,1 ou 0,5 $mg.l^{-1}$) ils se nécrosent. Nous avons obtenu ces résultats avec différentes variétés : 3 *P.* x *hederaefolium* ('Amethyst', 'Balcon Imperial' et 'Tavira') et *3 P. x hortorum* ('Rigler', 'Rubin', 'Topscore').

Ce phénomène de vitrification causé par le charbon actif pourrait être lié à l'adsorption trop importante de phénols notamment ceux conduisant à la lignification puisque avec l' hyperhydricité on dénote une hypolignification (HEGEDUS et al., 1983).

C) La qualité de l'agar et la variété

L'agar très pur (agarose) a été incorporé au milieu de base additionné de zéatine (0,5 mg. l^{-1}). Habituellement, la gélose est employée à la concentration de 6 $g.l^{-1}$ mais l'agarose a dû être utilisé à 10 g. l^{-1} pour offrir la même consistance. Sur 5 variétés après un mois de culture on pouvait discerner les taux de vitrification suivants.

HYBRIDE	Variété	% de vitrification
P. x hortorum	Cherry	72
	Porcelaine	22
P. x hederaefolium	Surcouf	27
	My love	17
	Alpine Glow	44
INFLUENCE DE LA VARIETE SUR LA VITROSITE		

HYBRIDE	Variété	Agarose	Agar-agar
P. x hortorum	Palais	20%	0%
P. x hederaefolium	Tavira	40%	7%
INFLUENCE DE LA QUALITE DE L'AGAR SUR LA VITROSITE			

Le phénomène de vitrosité est donc beaucoup plus prononcé avec l'agarose mais certaines variétés apparaissent plus sensibles que d'autres. La différence entre les 2 types d'agar se situe au niveau de la purification. L'agar normal moins pur pourrait peut être apporter certaines substances empêchant les tissus de devenir hyperhydriques. Quant à l'agarose débarrassé de certains ions il offre peut être un complexe colloïdal permettant des échanges plus importants .

Il faut également prendre en compte le pouvoir de rétention en eau plus faible d'un agar plus pur. Ce qui nous rapproche peut être du phénomène d'hyperhydricité dû à la présence d'un milieu aqueux.

D) La fermeture des tubes

La fermeture hermétique des tubes de culture provoque la saturation en eau de l'atmosphère intérieure. Il est probable qu'elle influe sur la vitrification, cependant nous nous sommes heurté à un double problème : en effet si nous laissons passer l'air, le milieu de culture, qui est en quantité restreinte dans les petits tubes au cours des premiers stades, se déssèche en même temps que le méristème ou la jeune microplante. Or comme ce sont justement les premières phases en petits tubes qui sont sensibles à la vitrosité, il ne nous est pas possible de combattre le phénomène par l'aération.

E) Les hormones

1) Les cytokinines

Au cours de nos expériences sur les variations saisonnières du développement des méristèmes nous constatons que la BA. à O,5mg.l^{-1} sur le cultivar 'Topscore' conduit toujours a plus ou moins brève échéance (selon la saison) à la vitrosité.

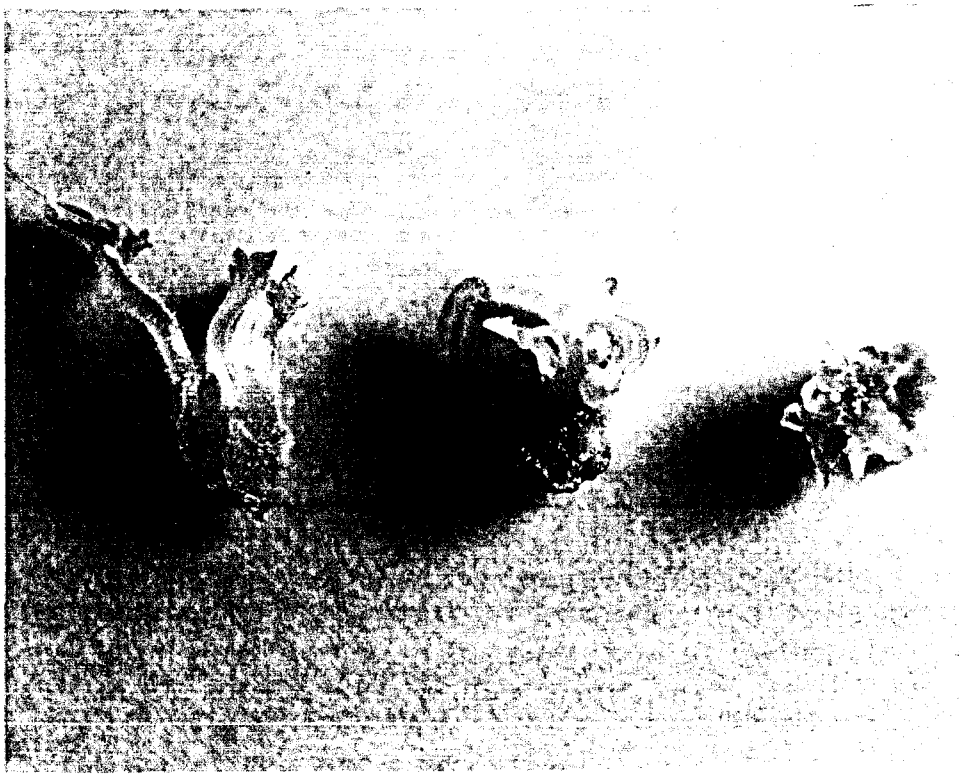
Les méristèmes ensemencés commencent par gonfler puis ils développent des ébauches difformes qui deviennent translucides et finissent par se nécroser.

La BA. entraîne donc le fonctionnement désorganisé du méristème et sa vitrification.(cf **PLANCHE VI**).

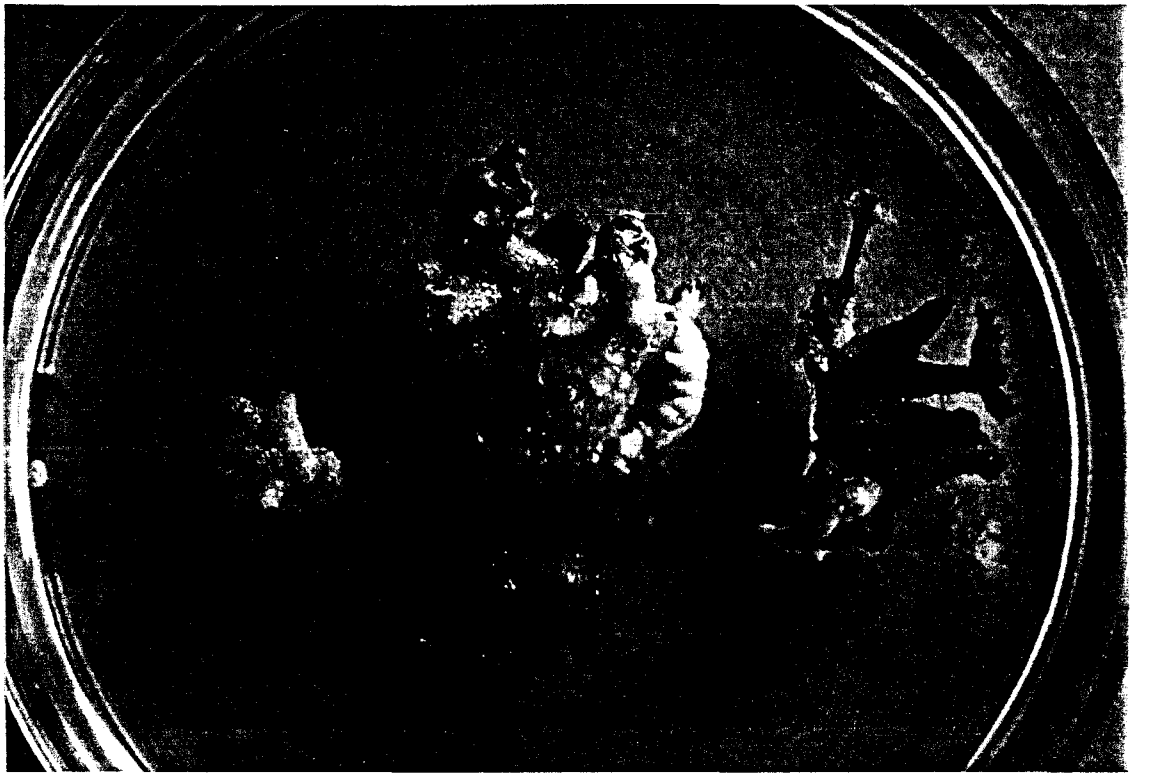
L'ensemencement direct du méristème de *P. x hederaefolium* sur un milieu enrichi en cytokinines est également favorable à la vitrification. Il semble que l'ensemencement sur un milieu hormonal "stresse" la plante.(cf **PLANCHE VI**).

2) L' auxine

L'addition d'auxine à forte concentration en période favorable est également un facteur activant l'hyperhydricité.

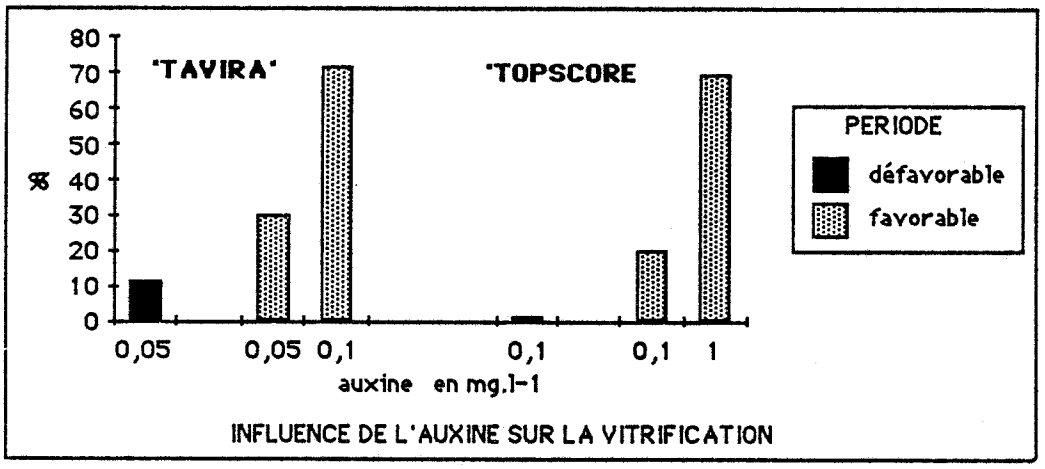


Bourgeons vitreux de forme normale et anormale obtenues par ensemencement du méristème en présence de zéatine
var. : 'SUPER ROSE' (*P.x hederaefolium*)



Différentes étapes de la culture de méristèmes en présence de BA
var. : 'TOPSCORE' (*P.x hortorum*)

PLANCHE VI - MERISTEMES VITRIFIES



INFLUENCE DE L'AUXINE SUR LA VITRIFICATION

Plus la saison favorable s'avance, moins l'auxine est utile; de plus, son utilisation active l'entrée d'eau et favorise sans doute l'hyperhydricité.

F - Les sels minéraux

Des concentrations trop fortes en sels minéraux augmentent le taux de vitrification.

	témoin	[K] x 2	[N] x 2	[N] = NH_4 seulement
'Palais'	11%	37%	50%	100% de vitrification
'Tavira'	0%	29%	36%	100% de vitrification

Certains éléments comme l'azote facilitent ce phénomène notamment lorsqu'il est fourni sous forme ammoniacale.

En effet lorsque l'azote total du milieu de base est remplacé par le NH_4, l'ensemble des méristèmes se vitrifie avant de se nécroser. (Notons cependant que le milieu n'avait pas été tamponné et s'est donc acidifié mais nous ignorons l'action de l'ion NH_4 sur les méristèmes en présence d'un milieu au pH stabilisé à 5,6).

G - Nature du sucre

Nous avons comparé l'action du fructose et du saccharose sur la vitrification, le milieu est le Macrolabo (FEUTRY, 1976) additionné d' AIA. (O,1 mg. l^{-1}) et de BA. (O,1 mg. l^{-1}).

	témoin saccharose 3O g. l^{-1}	fructose 2O g. l^{-1}	4O g. l^{-1}
'Topscore'	0 %	0 %	13 % de vitrification
'Tavira'	0 %	20 %	100 % de vitrification

'Tavira' s'avère ici plus sensible au fructose que 'Topscore' et réagit vivement à 4O g. l^{-1} par un phénomène d'hyperhydricité. La vitrification apparaîtrait ici comme une réaction à la toxicité du produit.

X - APPLICATION ET TENTATIVE DE GENERALISATION DE NOS PREMIERS RESULTATS AUX VARIETES DE LA COLLECTION DES ETS PHILIOMEL.

Dans la méthode que nous avons mise au point avec "Super Rose' (*P.* x *hederaefolium*) et 'Topscore' (*P. x hortorum)* , les méristèmes sont ensemencés sur le milieu de base additionné de charbon actif (1 g. l^{-1}) puis repiqués toutes les 3 semaines sur un milieu enrichi en zéatine (O,1 g. l^{-1}). Il était intéressant de vérifier si elle pouvait être généralisée.

L'ensemble de notre expérimentation peut se décomposer en 2 séries :

- la **première série** porte sur 2O variétés mises en culture à 2 reprises en juin et en septembre,
- la **deuxième série** porte sur 35 variétés ensemencées de janvier à mars.

C'est-à-dire que la 1ère série a été réalisée en période favorable à l'inverse de la seconde qui s'est déroulée en période défavorable.

Les résultats sont les suivants :

Hybride	Variété	% de plantes
P .x hederaefolium	Alpine glow	28
	Balcon Desrumeaux	11
	Colmar 1	17
	Colmar 2	5
	Colmar 3	5
	Enchanteresse	6
	Isidel	44
	My love	100
	Nono	33
	Philiomel	83
	Snow drift	5
	Stadt vilach	44
	Surcouf	33
P. x peltato-zonale	Pretty girl	6
P x hortorum	Alex	100
	Alexandra	28
	Bundess	22
	Cherry	11
	Garten	11
	Génie	67
	Goëtz	33
	Graffin	83
	Isabelle	100
	Jubileum	0
	Lachsball	11
	Normandie	0
	Olavie	17
	Porcelaine	100
	Rotlicht	33
	Schön burn	100
	S N 7	39
	S N 17	17
	Stéva berni	11
	Véronica	100
	vésuve	100

2ème série

Hybride	Variété	% de plantes
P. x hederaefolium	Barbe bleue	40
	Décora impérial	20
	Mahogany	100
	Old lady	100
	Perle d'Alsace	100
	Renée Ross	100
	Rhodamant	37
	Super Alice	32
P. x peltato-zonale	Crosy	100
P . x hortorum	Camélia	15
	Flirt	10
	Honsil	100
	Karl	45
	Orange Ricard	37
	Osna	100
	Penny	100
	Rospen	47
	Springtime	25
	Summer Cloud	85

1ère série

Première série

La première série expérimentale, conformément à notre attente, a donné de meilleurs résultats par suite de la date de prélèvement des explantats. Dans l'ensemble toutes les variétés ont répondu avec de bons pourcentages. Notons cependant le comportement plus satisfaisant des *P. x hederaefolium* par rapport aux *P. x hortorum* ce qui est en accord avec nos expériences concernant les variations saisonnières. Il est en effet probable que les rendements obtenus avec *P. x hortorum* auraient été sérieusement améliorés si nous avions introduit les hormones dès l'ensemencement.

Mais nous ne connaissions pas encore les résultats concernant les variations saisonnières et nous avons continué à employer le charbon actif en première phase de culture. Pourtant en septembre comme en juin le démarrage très difficile des *P. x hortorum* nous a incité après plus d'un mois de culture à augmenter le taux de zéatine ce qui a permis de compenser un peu le mauvais départ.

De façon générale nous avons constaté des différences de rendement entre les différentes variétés. Elles peuvent être imputées à différents facteurs :

- génétiques :
  - . une variété donnée est plus ou moins apte à régénérer des plantes à partir de méristèmes.
  - . la réactivité du méristème dans le temps est plus ou moins large et peut-être plus ou moins décalée.
- la taille et la nature des méristèmes prélevés.

Il est assez difficile de déterminer ces facteurs: il aurait en effet fallu ensemencer chaque variété chaque mois afin de suivre son comportement au cours du temps ; ce qui n'était évidemment pas possible dans le cadre de nos recherches.

Deuxième série

La deuxième série d'expériences s'est déroulée pendant la période où la réactivité des méristèmes est la plus faible, ce qui implique que les comparaisons entre les deux séries expérimentales sont difficiles. Dans cette seconde série, après un passage en présence de charbon actif, nous avons utilisé une dose d'hormone plus élevée pour essayer de stimuler la réactivité des méristèmes (0,5 mg. l^{-1} de zéatine pour les *P. x hederaefolium* et 1 mg. l^{-1} de zéatine pour les *P. x hortorum*). Cela n'a pas toujours suffit et 2 variétés sont demeurées sans réponse.

Ces nouveaux résultats expriment qu'il y a des variétés qui se sont mieux comportées que d'autres mais cela ne veut pas forcément dire que les autres variétés resteront toujours sans réponse. Ces prélèvements ont été effectués pendant l'hiver, une seule fois : ils ne sont donc pas représentatifs.

En plus de ces 2 séries expérimentales, nous avons également réalisé des essais, à différents moments, sur 10 autres variétés qui nous ont donné les résultats suivants :

P x hederaefolium	% de plantes
tavira	65
Super rose	84
Balcon impérial	35
Améthyst	45
Rouletta	70

P x hortorum	% de plantes
Topscore	100
Rubin	62
Rigler	55
Palais	100
Silipen	80

Par conséquent sur les 65 variétés essayées, 2 seulement n'ont pas fourni de plantules mais elles correspondent à la série d'ensemencements effectués seulement pendant l'hiver. Le milieu mis au point s'avère donc convenir à l'ensemble des variétés, le pourcentage de réussite semblant beaucoup plus dépendre de la période de prélèvement que de la variété . D'autre part, une partie des expériences entreprises pour tenter de généraliser notre méthode, ont été effectuées avant de connaître l'ensemble des résultats fournis par l'étude de variations saisonnières. Les conclusions auxquelles ont abouti les essais devraient encore permettre d'améliorer les rendements que nous avons obtenus.

XI - CULTURE *IN VITRO* DES MICROPLANTES

A - Action du charbon actif

Nous avons voulu déterminer si l'addition de charbon actif au milieu de culture favorisait la reprise des plantes en intervenant au niveau de la rhizogenèse d'une part et d'autre part en évitant, à la transplantation l'oxydation des phénols dont les Pelargoniums sont riches.

Nous avons mis en culture des microboutures de même taille 'd'Amethyst' (P. x *hederaefolium)* et de 'Rubin' (*P. x hortorum*) formées d'un bourgeon terminal et de 2 feuilles sur du milieu de base seul et avec charbon actif (1 g. l^{-1}). Nous avons mesuré la taille, le nombre de feuilles développées et desséchées, la présence de racines et de cal à la base après un 2ème repiquage ayant pour but d'accentuer les différences provoquées par les 2 milieux.

	MILIEU DE BASE		MILIEU DE BASE + CHARBON ACTIF	
	'AMETHYST'	'RUBIN'	'AMETHYST'	'RUBIN'
TAILLE EN mm	31.40	41.00	27.00	32.00
NOMBRE DE FEUILLES DEVELOPPEES	3.33	3.83	3.20	3.42
NOMBRE DE FEUILLES DESSECHEES	0.00	0.16	0.00	0.83
QUANTITE DE RACINES	++	++	-	++
PRESENCE DE CAL	-	-	++	+

L'incorporation de charbon actif au milieu de repiquage n'améliore pas la croissance des microboutures qui ont même tendance à être plus petites. Le développement des feuilles et même la formation de racines sont inhibées chez 'Amethyst' qui dans ces conditions manifeste des phénomènes de callogenèse. Chez 'Rubin', le charbon actif n'influe pas sur la rhizogenèse mais il provoque la formation d'un petit cal à la base des microboutures.

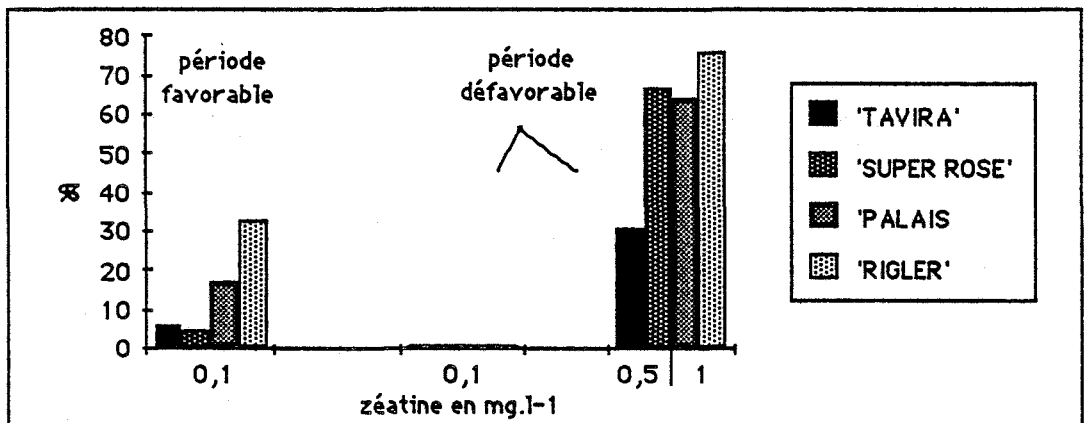
On a donc l'impression que le charbon actif augmente l'activité auxinique à la base des microboutures qui se manifeste chez les *P. x hederaefolium* par la formation de cal sans racines et chez les *P. x hortorum* par la formation de racines et d'un peu de cal.

Le charbon actif aurait également tendance à accélérer le dessèchement des feuilles de certaines variétés. Par conséquent le milieu de base seul convient mieux tant à la caulogenèse qu'à la rhizogenèse.

B - Multiplication par développement des bourgeons axillaires

1) Le développement spontané

Au cours de la phase de développement, le débourrement des bourgeons axillaires a lieu spontanément au cours de l'évolution des méristèmes en microplante. Nous allons donc examiner la proportion des méristèmes qui peuvent donner plus d'une microplante grâce au développement des bourgeons axillaires en fonction de la variété et de la saison, étant bien entendu qu' en saison défavorable il faut augmenter la concentration en cytokinines. Le milieu employé est le milieu de base avec zéatine, après un passage d'une semaine des méristèmes en présence de charbon actif 1 g. l^{-1} . Les résultats sont relevés après 13 semaines de culture.



EFFET DE LA CONCENTRATION EN ZEATINE SUR LE DEVELOPPEMENT DES AXILLAIRES SELON L'EPOQUE DU PRELEVEMENT

L'augmentation de la concentration en cytokinines, nécessaire en période défavorable, provoque toujours un débourrement des bourgeons axillaires plus important, aux dépens d'un allongement plus faible. Ce phénomène semble donc plus lié au taux d'hormone employé qu'à la saison. Cependant certaines variétés comme 'Tavira' semblent davantage inhiber leurs bourgeons axillaires.

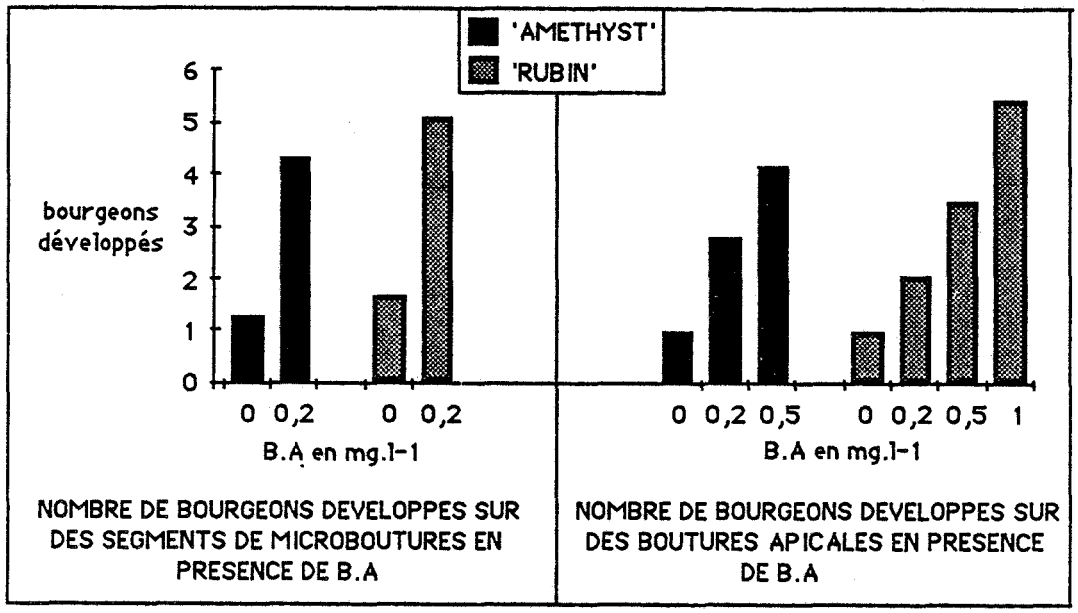
2) Rôle de la BA. dans la multiplication induite

Lorsque les microplantes ne nécessitent plus l'adjonction de zéatine (O,1 mg. l^{-1}) pour croître, si elles sont placées en présence de cette substance de croissance elles peuvent à nouveau débourrer leurs bourgeons axillaires. Mais cette hormone naturelle assez onéreuse peut être remplacée par une substance de croissance de synthèse moins spécifique la BA.

Nous avons donc utilisé plusieurs doses de BA. sur des boutures apicales 'd'Amethyst ' (*P. x hederaefolium)* et de 'Rubin(*P. x hortorum*) munies de 2 feuilles

ainsi que des segments de tiges effeuillés d'environ 1,5 cm prélevés sur des microboutures cultivées *in vitro* sur du milieu de base sans hormones depuis au moins 2 mois.

Les résultats sont relevés après 1 mois de culture.



L'efficacité de la BA. sur le débourrement des bourgeons axillaires est proportionnelle à la concentration employée et à la présence ou l'absence d'un apex. En effet O,2 mg.l^{-1} de BA. provoque un débourrement approximativement aussi important sur les segments de tige décapitées que 1 mg.l^{-1} ou 0,5mg. l -1 sur les boutures apicales d' 'Amethyst' et 'Rubin' .Ce phénomène résulte d'interactions entre le bourgeon apical et les bourgeons axillaires ce qui explique qu'il faille mettre davantage d'hormones pour faire débourrer un même nombre de bourgeons axillaires en présence d'apex que sur un segment de tige débarrassée de son sommet.

C - Enracinement

Les microplantes produites à partir de méristèmes nécessitent jusqu'à une certaine taille (environ 25 mm) la présence de cytokinine pour se développer. Il est par conséquent probable qu'elles demandent encore, simultanément un milieu minéral riche. C'est pourquoi nous avons toujours conservé le milieu de base pour toutes les phases de repiquage. De plus l'enracinement ne pose aucune difficulté il suffit de supprimer les substances de croissance lorsque les microplantes possèdent un beau bourgeon avec une paire de feuilles bien développées. Il n'y a donc aucune raison de modifier le milieu de base, sur lequel les plantes sont laissées jusqu'au moment de l'acclimatation c'est-à-dire quand les plantes ont atteint 3O à 4O mm.

D - Acclimatation

L'acclimatation a été réalisée dans les serres des Ets Philiomel. Au moment du rempotage, les jeunes plantes de 30 à 40 mm possèdent quelques pointes racinaires, et sont suffisamment vigoureuses pour être autonomes mais leur surface foliaire ne doit pas être trop importante pour limiter la transpiration.

Les racines formées sont plus efficaces si elles sont courtes. En effet trop longues elles se cassent plus facilement, et sont dépourvues de poils absorbants (elles finissent par se nécroser). Un chevelu racinaire trop dense nuit également à la complète élimination de la gélose, ce qui favorise la contamination ultérieure des racines par des champignons ou des bactéries pouvant entrainer la mort de la plante.

L'acclimatation des plantes aux Ets Philiomel ne semble pas poser de difficultés mais les rendements pourraient sans doute être accrus si l'on passait par une opération intermédiaire consistant à fortifier les plantes en les repiquant sur de la laine de roche imbibée du milieu de base liquide permettant la formation de racines fonctionnelles.

On peut également au cours de cette étape assécher peu à peu l'atmosphère des tubes de culture en remplaçant les bouchons en plastique par des bouchons de cellulose pressée puis enfin en retirant ces derniers. Les plantes ainsi "endurcies" subiraient moins le choc de la transplantation.

DISCUSSION

I - PRELEVEMENT DES MERISTEMES

Le *Pelargonium* peut mettre en place 4 formes de méristème de type uniquement végétatif (1 dôme, 1 primordium, 2 stipules ou 1 dôme, 2 primordiums, 3 stipules) ou de type inflorescentiel et végétatif (1 dôme, 1 primordium, 1 inflorescence et 2 stipules ou 1 dôme, 2 primordiums, 1 inflorescence et 3 stipules) mais jamais uniquement inflorescentiel. Ils peuvent donc tous être mis en culture en totalité ou en partie selon leur stade de développement.

La taille de l'explant influence l'allongement du méristème mais il n'est pas impossible que les ébauches florales alors plus riches en auxine (GASPAR et al., 1980) interviennent également sur le développement plastochronique. Dès lors tout méristème peut être prélevé. La littérature ne mentionne pourtant jamais toutes des structures différentes, excepté MAMET, (1983), mais elle ne distingue que 2 types à un stade de développement déjà avancé.

La taille (0,2-0,5 mm) des méristèmes ensemencés varie selon le stade de développement et la variété concernée. Les *P. x hederaefolium* et en particulier le groupe des 'Balcon ' ont des méristèmes plus petits. Mais les explants utilisés sont toujours suffisamment petits pour correspondre à de véritables cultures de méristèmes (MARGARA, 1982).

La petite taille des explants favorise aussi les conditions aseptiques . Pourtant certains auteurs , avec des explantats de 0,25 à 0,5 mm, peuvent constater jusqu'à 10 % d'infection (MENARD et al., 1985). Au cours de nos expérimentations, les contaminations ont toujours eu un caractère exceptionnel.

II - ENSEMENCEMENT

L'excision du méristème provoque une blessure qui laisse échapper des phénols qui s'oxydent au contact du milieu. Leur toxicité a amené certains auteurs à employer des substances antioxydantes ou adsorbantes. MAMET (1983) trempe les méristèmes dans une solution de D.I.E.C.A. (diethyldithiocarbamate de sodium) au risque d'augmenter les contaminations et MENARD (1985) ajoute dans le milieu d'ensemencement du P.V.P. (Polyvinylpyrollidone).

Une autre technique consiste à laisser les méristèmes pendant 2 semaines sur un milieu sans hormones (DEBERGH et al., 1977), nous avons d'ailleurs constaté qu'un taux élevé d'hormones, qui augmente la perméabilité cellulaire, favorise la formation d'un halot violacé à la base des explantats.

On peut aussi réduire plus simplement le taux de phénols secrétés en réalisant une coupe franche et nette à la base des méristèmes et en entreposant ces derniers dans un endroit peu éclairé. En fait l'oxydation des phénols est certes un problème important, mais secondaire dans la mesure où la réactivité des méristèmes est davantage liée à la nature du milieu de culture. Par exemple l'hybride de *P. x hortorum* se développe incomparablement mieux lorsque la phase d'ensemencement sans hormones (1 semaine) pour éliminer les phénols est supprimée.

En fait la toxicité des phénols se manifeste surtout lorsque le développement du méristème est trop lent.

L'ensemencement est une étape clé, dans la culture du méristème de *Pelargonium*, elle conditionne leur développement ultérieur. :

Les méristèmes s'allongent davantage s'ils sont ensemencés dans des tubes proportionnels à leur taille.

L'ensemencement des *P. x hederaefolium* doit être différent des *P. x hortorum* ; en effet les *P. x hederaefolium* manifestent un pouvoir callogène beaucoup plus important. Ce qui pourrait être lié à un taux de substances de croissance endogènes plus élevé chez les *P.* x *hederaefolium* que chez les *P. x hortorum.* Par conséquent l'application immédiate de phytohormones même à faible concentration produirait un phénomène d'addition avec les hormones endogènes qui favoriserait la callogenèse aux dépens d'un développement caulogène.

C'est pourquoi, il est nécessaire de procurer aux méristèmes de *P.* x *hederaefolium* venant d'être prélevés une phase de repos d'environ une semaine sans substances de croissance, de préférence avec charbon actif (1 g. l^{-1}), peut être à cause de ses propriétés adsorbantes permettant une meilleure régulation de l'équilibre hormonal du méristème.

Les *P. x hortorum* peuvent supporter, dès l'ensemencement, des concentrations assez élevées en hormones sans doute par suite d'un taux d'auxine endogène plus faible lié à une activité peroxydasique plus faible (MAMET, 1983). p. 74

III - MILIEU MINERAL

Il est difficile de définir le milieu minéral le plus favorable pour une espèce donnée. Celui qui s'est révélé le plus intéressant pour l'ensemble des cultures que nous avons effectuées est celui de MURASHIGE et SKOOG (1962) ; il a permis d'obtenir à la fois plus de plantes et une croissance plus rapide. Mais si l'on accroît encore la concentration en azote ou en potassium en période favorable on peut augmenter le développement des P. *x hortorum.*

Il n'est pas impossible que ces éléments puissent agir sur le métabolisme hormonal dans la mesure où chez *Solanum sp.*, un taux élevé d'azote, en particulier de NO_3, active la formation de cytokinines dans les racines (YOSHIDA et al., 1974), de même en culture *in vitro*. La présence de nitrates favorise la formation de cytokinines dans les cultures de tissus de *Vinca sp.* (PETERSON et al., 1972). De plus chez d'autres plantes comme *Lycopersicum sp* et *Pea sp.* une déficience en sels minéraux entraîne une baisse du taux en auxine (GUSTAFSON, 1946).

Cela pourrait expliquer notamment le phénomène de synergie bénéfique ou excessive rencontré lors de l'encemencement des méristèmes. En effet les méristèmes de *P. x hortorum* ensemencés sur un milieu hormonal riche en éléments minéraux se développent en plante alors qu'au contraire les *P. x hederaefolium* s'orientent vers la callogenèse.

Ce comportement a donc amené plusieurs auteurs à appauvrir leur milieu minéral et hormonal (BEAUCHESNE, 1970 ; DALLOT 1981 ; FEUTRY, 1976 ; FEUTRY, 1976 et MAMET, 1983), mais travaillant sur le *P. x hortorum* en même temps, ils ont conservé pour les 2 types d'hybrides la même balance ionique et hormonale faible, excepté MAMET (1983) qui constate l'effet positif d'un milieu enrichi en azote pour les *P. x hortorum.*

Notons cependant que l'apport de concentrations minérales plus élevées n'est pas suffisante pour améliorer le rendement en plantes pendant l'hiver.

L'effet "dormance" prédomine toujours sur l'effet "concentration ionique", ce qui est en accord avec les résultats de MAMET (1983). En fait les modifications de la composition de la solution minérale doivent être réalisées très prudemment pour empêcher les risques d'hyperhydricité.

Il est donc possible d'appliquer pour les *P. x hortorum* et les *P.* x *hederaefolium* la solution minérale de MURASHIGE et SKOOG (1962) à condition d'éviter à l'ensemencement la synergie qui peut exister entre nutrition minérale et métabolisme hormonal et en soumettant d'abord, pendant une semaine, les explants de *P . x hederaefolium* à une phase sans hormone (selon technique au II p72).

IV - VITAMINES ET SUCRES

Nous avons comme de nombreux auteurs utilisé un mélange vitaminique classique. Sans avoir fait une étude systématique de l'effet de chacune des vitamines,il s'avère que seul le mésoinositol semble strictement indispensable.

Parmi les sucres utilisés, le saccharose à 30 g. l^{-1} a permis le meilleur développement des méristèmes. Toutefois il est un peu accéléré en période favorable si au cours de la 1ère phase, le saccharose est remplacé par du glucose sans doute par suite d'une métabolisation plus rapide à ce stade ou parce que ce dernier s'intègre mieux dans un métabolisme déjà très actif.

Les sucres exerceraient une action métabolique, énergétique, morphogène et osmotique. En effet WELANDER (1978) constate que s'il réduit la concentration en sucre et le remplace par du mannitol de façon à conserver la même pression osmotique, il perd l'effet morphogène manifesté par les cals de Pelargonium . Dans le cas du Pelargonium , les sucres exerceraient donc une action sur la morphogenèse.

V - CYTOKININES ET AUXINES

La culture de méristème ne nécessite parfois aucune hormone (ex. protocormes d'Orchidées MOREL, 1963) quelquefois seulement de l'auxine (SMITH, 197O) ou encore à la fois de l'auxine et de la cytokinine (SHABDE et al., 1972).

En principe, chez le *Pelargonium,* la cytokinine suffit mais suivant sa nature elle doit être employée à des concentrations différentes (ex. zéatine O,1 mg.l^{-1} équivaut à environ O,25 mg.l^{-1} de 2 iP). Selon les auteurs, la nature des cytokinines et des auxines utilisées est très variable (Kin, BA., 2 iP, AIA, ANA, AIB), peu de chercheurs utilisent la zéatine (THEILER, 1977 et MENARD, 1985). Nous avons cependant constaté que dans le cas du *Pelargonium* c'était la cytokinine la plus efficace même à faible dose et pouvant même agir sans auxine exogène tant sur les *P. x hederaefolium* que les *P.* x *hortorum.*

C'est un élément capital du milieu de culture. THEILER (1977) l'inclue en présence d'AIB dans son milieu mais MENARD (1985) l'incorpore seule à la concentration de 2 mg. l^{-1} en période favorable. Cette quantité semble très élevée pour la saison et il semble douteux que dans ces conditions il n'y ait pas formation de bourgeons néoformés. C'est pourquoi nous avons toujours appliqué la zéatine à la concentration la plus faible possible pour avoir une prolifération satisfaisante mais limiter au maximum la formation de bourgeons adventifs.

VI - VARIATIONS SAISONNIERES

Bien que les chambres climatisées permettent de maintenir les cultures de méristèmes en conditions estivales, leur capacité de développement continue à refléter l'état physiologique du pied-mère (démontré chez le *Citrus* par ALTMAN et al., 1974).

La période optimale au prélèvement se situe de mai à septembre aussi bien pour *P.* x *hortorum* que pour *P. x hederaefolium.* Cela se traduit par des besoins plus faibles en substance de croissance (O,1 mg. l^{-1}) de zéatine). Mais au fur et à mesure que l'on s'éloigne de cette période, l'allongement des explants nécessite des concentrations de plus en plus élevées en cytokinines et/ou en auxine pour rééquilibrer le rapport des régulateurs de croissance endogènes.

Nous savons en effet que le taux d'auxine diminue l'hiver et augmente l'été pendant la plus forte végétation (mis en évidence chez le Pêcher par BLOMMAERT 1974) le phénomène pouvant être contrôlé par la présence plus ou moins abondante d'auxines-oxydases (démontré chez la Vigne par SHAEFFER, 1983) et par l'activité de l'ABA qui est inversement proportionnelle à celle de l'auxine (étudié chez le *Prunus persica.* par DAVIDSON et al. 1974).

Ces différents faits, nous permettraient d'expliquer pourquoi l'addition d'une faible quantité d'AIA (combinée a O,1 mg. l^{-1} de zéatine) qui maintiendrait un certain niveau d'inhibiteurs (ELIASSON , 1975) activerait le développement méristématique en période encore défavorable.Nous avons également constaté en période défavorable que mettre beaucoup de cytokinines (O,5 - 1 mg. l^{-1}) revient à mettre un peu de

zéatine (O,1 mg. l^{-1}) et un peu d'auxine (O,O5 - O,1 mg. l^{-1}). Or, GASPAR et al., (1967), LEE (1971), SCHNEIDER et al. (1974) pensent que les cytokinines peuvent modifier l'activité AIA.-oxydase qui régule le taux d'auxine. HEMBERG (1972) a prouvé que des bourgeons de *Coleus* excisés et traités avec de la kinétine augmentaient considérablement leur teneur en auxine. Les cytokinines pouvaient réguler non seulement l'activité auxinique mais également celle de l'ABA. (ALVIM et al., 1976).

De plus, des analyses de HARISSON (1975) sur le Bouleau stipulent que l'ABA. actif diminue au cours de l'hiver en même temps que la dormance. Ceci est en relation avec la monté de la sève riche en cytokinines au printemps (HEWETT et al., 1973).

Dans le cas du *Pelargonium* on peut imaginer qu'au fur et à mesure qu'on se rapproche de la période la plus favorable, l'inhibition des méristèmes est de plus en plus faible et que la quantité d'hormones pour la combattre pourra être de plus en plus faible (jusqu'à O,1 mg. l^{-1} de zéatine et peut être O. mg. l^{-1} d'AIA). Il faut souligner toutefois qu'au cours de l'année 1986, la méthode la plus favorable a consisté à faire précéder la culture (proprement dite) des méristèmes par un passage sur un milieu sans hormone en présence de charbon actif pour les *P. x hederaefolium* alors que pour les *P. x hortorum* ce passage n'était pas nécessaire.

Cependant au cours de l'année 1985 nous avions eu des exigences identiques pour les 2 hybrides. Ce qui laisserait à supposer que les plantes renfermaient un taux en hormones endogènes plus élevé qu'en 1986. Ceci tendrait à montrer que les plantes en dehors des variations saisonnières peuvent aussi présenter des variations annuelles. Ce phénomène déjà décrit par MAMET (1983) pourrait s'expliquer par les différences d'intensité lumineuses reçues par les plantes : on a en effet constaté que la production de boutures était fortement dépendante de la quantité d'ensoleillement reçue par les pieds mères (VIDALIE , 1980).

Ce phénomène de variations saisonnières est cependant rarement abordé par les auteurs (BEAUCHESNE et al., 1977 ; HAMMERSCHLAG, 1978) qui ne font guère varier la dose d'hormones au cours de l'année. La plupart d'entre eux d'ailleurs, omettent d'indiquer la période où ils effectuent les ensemencements.

Il est probable que certaines variétés ont une réactivité plus limitée dans le temps que d'autres ou requièrent plus d'hormones exogènes. Toutefois en période très favorable (juillet-août) toutes devraient être capables de se développer sur un même milieu. C'est pourquoi les discordances apparentes entre les milieux proposés par les différents auteurs peuvent peut-être s'expliquer par l'époque différente à laquelle ils ont réalisé leurs expériences.

VII - ESSAIS DE LEVEE DE DORMANCE

Nous avons vu précédemment que nous pouvions combattre la dormance par l'apport exogène de phytohormones (AIA ; zéatine), ou parfois en modifiant la photopériode et/ou la température.

Nous avons soumis à ces modifications d'environnement soit les pieds mères, soit les méristèmes après leur prélèvement. Les essais réalisés avec les explants (2 semaines : 1O-14 h ; 1O-8 ° C) n'ont pas donné de plantes. On peut supposer que la durée du traitement était insuffisante pour supprimer une dormance trop forte. Le maintien des pieds mères en conditions estivales est inutile (MAMET, 1983), par contre en les

soumettant aux jours courts et au froid pendant 2 semaines (10-14 h ; 10 8°C) puis aux jours longs et au chaud (16-8 h ; 20° C) nous avons pu augmenter le rendement en microplantes. Cette expérience était toutefois plus tardive, l'encemencement ayant débuté en avril lorsque la dormance commence à se résorber .

Il est en effet fort probable que ce traitement soit insuffisant et demande à être prolongé sur des pieds mères pris en janvier et en février.

CASSELS et al., (1983) notent également une meilleure reprise des méristèmes après un séjour au froid et en jours courts mais ne précisent pas la date du prélèvement .

L'efficacité du traitement pourrait résulter du fait que le froid et les jours courts entraînent la destruction des peroxydases (AIA.- oxydases) (QUOIRIN et al., 1975) et diminuent l'activité de l'ABA. (PERRY et al. ,1973 ; LE-PAGE-DEGIVRY, 1973), ce qui aurait pour effet d'augmenter le taux d'auxines.

Notons également que les gibberellines qui peuvent quelquefois remplacer un séjour à basses températures se sont révélées inefficaces sur le *Pelargonium* .

VIII - PROBLEMES DE VITROSITE

Les méristèmes de *Pelargonium* manifestent souvent *in vitro* des phénomènes de vitrification. Celle-ci affecte essentiellement les explantats de petite taille. Nous avons remarqué qu'elle était directement liée à la richesse du milieu employé (minéraux, hormones), certaines substances (charbon actif, agar trop purifié, milieu aqueux) ou encore à la variété.

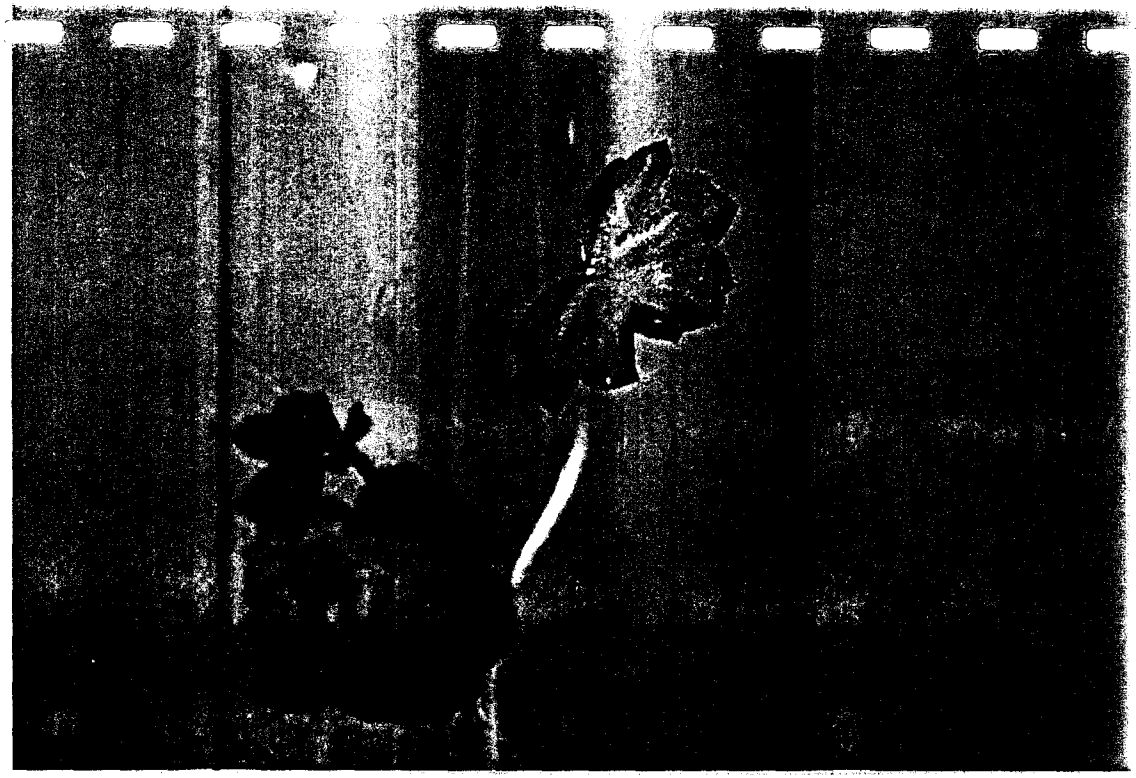
Il semble que sur un milieu performant les méristèmes sont toujours à la limite du stress qui engendre l'hyperhydricité. Il faut donc souvent choisir entre un milieu riche qui accélère la croissance avec des risques de vitrification et un milieu plus pauvre où les méristèmes se développent plus difficilement.

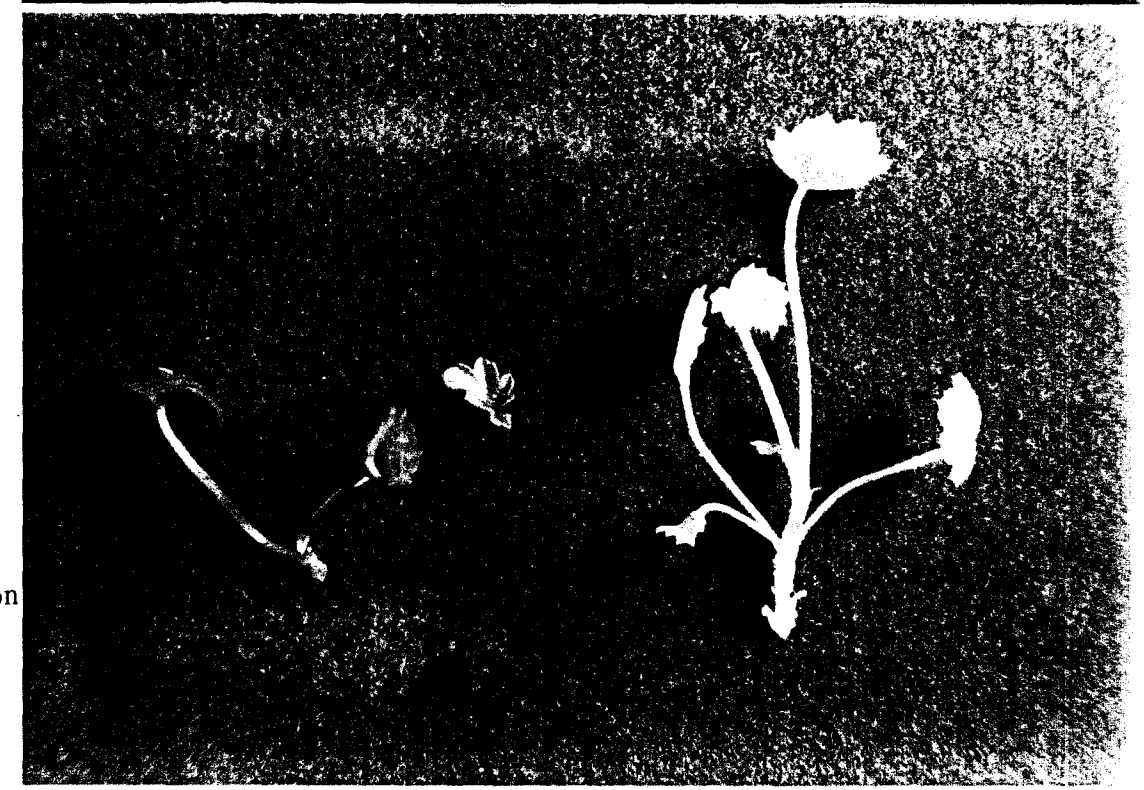
L'hyperhydricité se manifeste par une montée d'éthylène (KEVERS et al.,1984) mais également par une lignification faible et abérante, limitée à la bordure interne des vaisseaux et trachéides (VIETH et al.,1983).

Ce désordre physiologique se traduit par une croissance anormale, la plante devient crassulante, translucide, cassante et cela la conduit le plus souvent à se nécroser. Seuls certains bourgeons ayant conservé une forme normale peuvent être sauvés. On peut quelquefois combattre la vitrosité par l'aération des tubes de culture mais cela est difficilement applicable aux microplantes et aux explantats de *Pelargonium* souvent trop petits qui risquent pour cette raison de se dessécher. HEGEDUS et al., 1983, traitent des microplantes de Pommier avec de la phloridzine afin de provoquer la lignification ; personnellement nous n'avons obtenu aucun résultat avec cette substance.

Forme panachée normale obtenue par régénération directe d'un méristème
var. : 'DECORA IMPERIAL'

Variant panaché obtenu par néoformation
var. : 'TAVIRA'





Variants vert et albinos obtenus par néoformation
var. : 'DECORA IMPERIAL'

PLANCHE VII - CHIMERES

IX - PROBLEMES DE CONFORMITE

Certaines variétés selon la période où elles sont ensemencées manifestent une réactivité plus faible, ce qui nous a amené parfois à augmenter la dose d'hormones et par conséquent les risques de non conformité.

En effet les méristèmes développés en présence de O,1 mg. l^{-1} de zéatine ne ressemblent pas à ceux cultivés en présence de 1 ou 2 mg. l^{-1} de cette même hormone. Ces derniers sont boursouflés et leurs bourgeons axillaires se développent aux dépens de l'axe principal et ils présentent souvent à leur base un cal avec éventuellemnt néoformation de bourgeons.

Ces bourgeons adventifs constituent un certain risque de non conformité surtout pour les *Pelargonium* présentant des structures de chimère (CASSELS et al., 198O-1983 ; SKIRVIN et al. 1976). Ces phénomènes peuvent être décelables à l'oeil lorsque les Pelargoniums sont constitués de tissus de couleur différente (ex. 'Décora Impérial' à feuilles panachées vert foncé et vert clair) mais la plupart du temps elles sont insoupçonnées et seule une analyse cytologique pourrait les révéler. En effet les bourgeons néoformés peuvent provenir de tissus de ploïdie différente.(cf **PLANCHE VII**) .

La variabilité peut également se traduire par des modifications au niveau des feuilles et/ou des fleurs car il est souvent difficile de trier et de distinguer les bourgeons axillaires des bourgeons néoformés au cours des premiers stades.

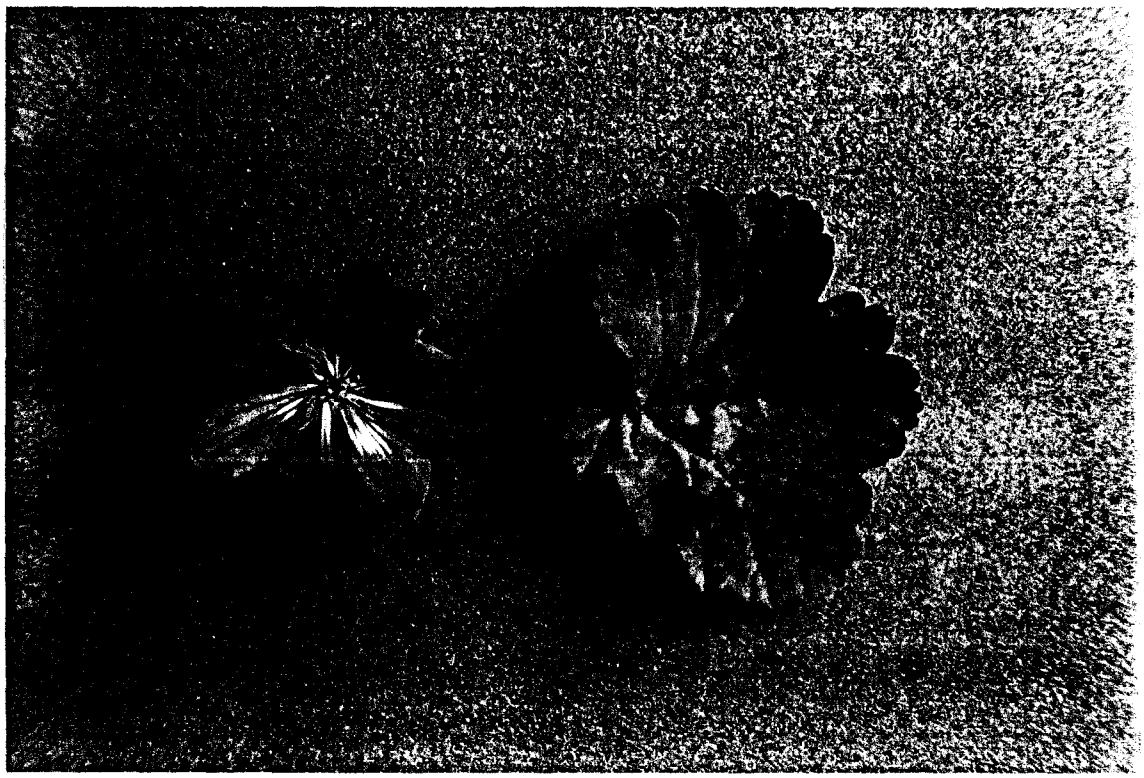
Ainsi 'Karl', variété peu réactive "forcée" en période défavorable avec 2 mg. l^{-1} de zéatine ne nous a donné que des plantes à feuilles et à fleurs déformées (cf **PLANCHE VIII**). 'Balcon Impérial' ne présente pas de malformations mais peut retourner facilement, tout comme 'Crosy', à sa couleur d'origine rose, et prendre des formes albinos ou panachées. Soulignons cependant la possibilité de tirer parti des variants par la création variétale par exemple pour obtenir des cultivars panachés. Pour les variétés qui ont tendance à faire retour vers leur forme d'origine, il est vain de penser que la culture *in vitro* puisse l'empêcher (cf **PLANCHE VII**).

Ce phénomène est déjà courant en multiplication végétative classique et démontre l'instabilité de certains cultivars qui ne doivent leur existence qu'à une perpétuelle sélection.

Un autre problème concerne les *Pelargonium* à fleurs panachées dues à la présence d'un virus ('Rouletta' - ' Mahogany'). Le but de la culture de méristèmes étant d'éliminer les virus, il est évident que les plantes obtenues par cette méthode perdent leur panachure.

Si nos expériences ont bien confirmé la validité de la micropropagation par culture de méristèmes, il faut bien être conscient des limites de cette méthode. Il faut éviter d'utiliser des concentrations trop élevées d'hormones surtout pour les variétés peu stables ou peu réactives ('Balcon Impérial',.. 'Karl'..). Ceci est possible si l'on attend la période favorable pour les ensemencer. De même cette méthode ne peut pas s'appliquer aux variétés panachées par suite de la présence de virus.

Feuille et fleur d'une plante normale
var. : 'KARL'



Déformation foliaire et florale dûe à un excès de zéatine
var. : 'KARL'

PLANCHE VIII - DEFORMATIONS

X - CONTROLE SANITAIRE

Il n'est pas encore possible de se prononcer sur la fiabilité de notre méthode pour enrayer les virus. En effet, les tests sur Chenopode n'ont pas encore été réalisés aux Ets PHILIOMEL, car les virus ne s'expriment qu'à certains moments de l'année.

Cependant, des variétés panachées par l'existence de virus dans leurs tissus comme 'Mahogany' ou 'Rouletta' perdent leur panachure après culture de méristème.

Nous avons donc toutes les raisons de penser que notre technique permet l'éradication des virus.

RESUME

Jusqu'à présent, peu de résultats avaient été obtenus par régénération directe de méristèmes de *Pelargonium*, il s'agissait en effet le plus souvent de néoformations génératrices de problèmes de conformité.

Notre travail concernant la multiplication végétative du *Pelargonium* a permis de mettre en évidence l'influence de l'hybride, du milieu nutritif et des fluctuations saisonnières sur le développement du méristème.

Influence de l'hybride

Pour les variétés faisant partie du groupe des *P. x hederaefolium*, il est nécessaire de les ensemencer sur un milieu de base dépourvu d'hormones (1 semaine, de préférence avec charbon actif) si l'on ne veut pas qu'ils évoluent en cal ou se vitrifient.Ils pourront ensuite être repiqués sur du milieu de base contenant des régulateurs de croissance .

Les variétés du groupe des *P. x hortorum* doivent au contraire être ensemencées immédiatement sur un milieu contenant des hormones si l'on veut éviter qu'elles entrent en repos.

C'est donc l'ensemencement qui détermine l'évolution ultérieure du méristème. De plus cette distinction entre les 2 hybrides dans la phase d'ensemencement leur permet ensuite d'avoir les mêmes exigences culturales. Cela rend donc possible l'utilisation pour toutes les variétés d'un même milieu de culture standard.

Influence du milieu nutritif:

Pour obtenir un développement optimal il faudra que les éléments suivants soient réunis :

- le milieu minéral sera riche en potassium et en azote (M.B.), l'ion NH_4 se montrant indispensable dans la régénération

- la concentration en saccharose sera de 3O g. l^{-1}

- le conditionnement des méristèmes en petits tubes augmente la croissance dans la première phase de culture mais il permet également de réaliser des économies de place et de milieu

- l'hormone employée sera la zéatine, car c'est la seule cytokinine, qui aux plus basses concentrations, provoque le débourrement des méristèmes, ce qui limite donc au maximum les problèmes de conformité.

Influence des variations saisonnières

La reprise des méristèmes de *Pelargonium* varie selon la saison : l'été (période favorable) la croissance est plus grande qu'en hiver, lorsque les méristèmes sont entrés en dormance.

Par conséquent en été, cela se traduit par des exigences moindres et O,1 mg. l^{-1} de zéatine suffit au développement. Mais au fur et à mesure que l'on s'enfonce dans l'hiver il faut pour maintenir les méristèmes en activité :

- mettre davantage de zéatine (O,1 à O,5 mg. l^{-1} pour les *P. x hederaefolium* et O,1 à 1 mg. l^{-1} pour les *P. x hortorum*

ou

- ajouter de l'auxine (O,O5 mg. l^{-1} pour les *P. x hederaefolium* et O,1 mg. l^{-1} pour les *P. x hortorum*), ce qui est plus économique .

Il est également possible de réveiller les méristèmes en faisant subir aux pieds mères un traitement au froid et aux jours courts(2 semaines : 10- 8° C : 1O - 14h) .

Etapes ultérieures au développement:

Lorsque les méristèmes ont régénéré des plantes il n'est pas difficile de les multiplier ou de les enraciner.

. Multiplication

Les microplantes développées ne nécessitent plus de zéatine, il devient donc possible d'utiliser pour cette opération une hormone de synthèse moins onéreuse : la B.A.

. L'ensemencement:

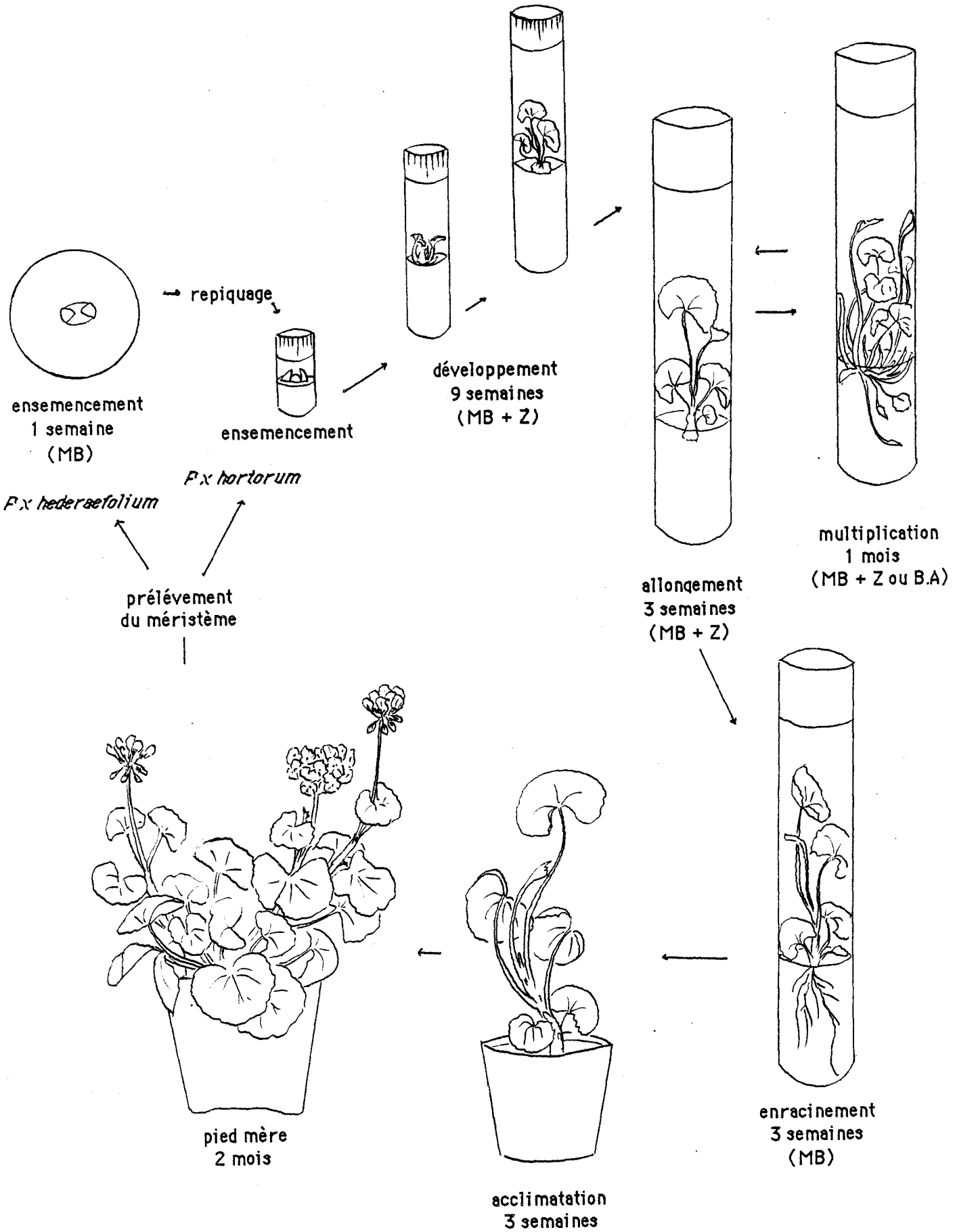
Il se produit lorsque l'on repique les microplantes sur le milieu de base dépourvu d'hormones.

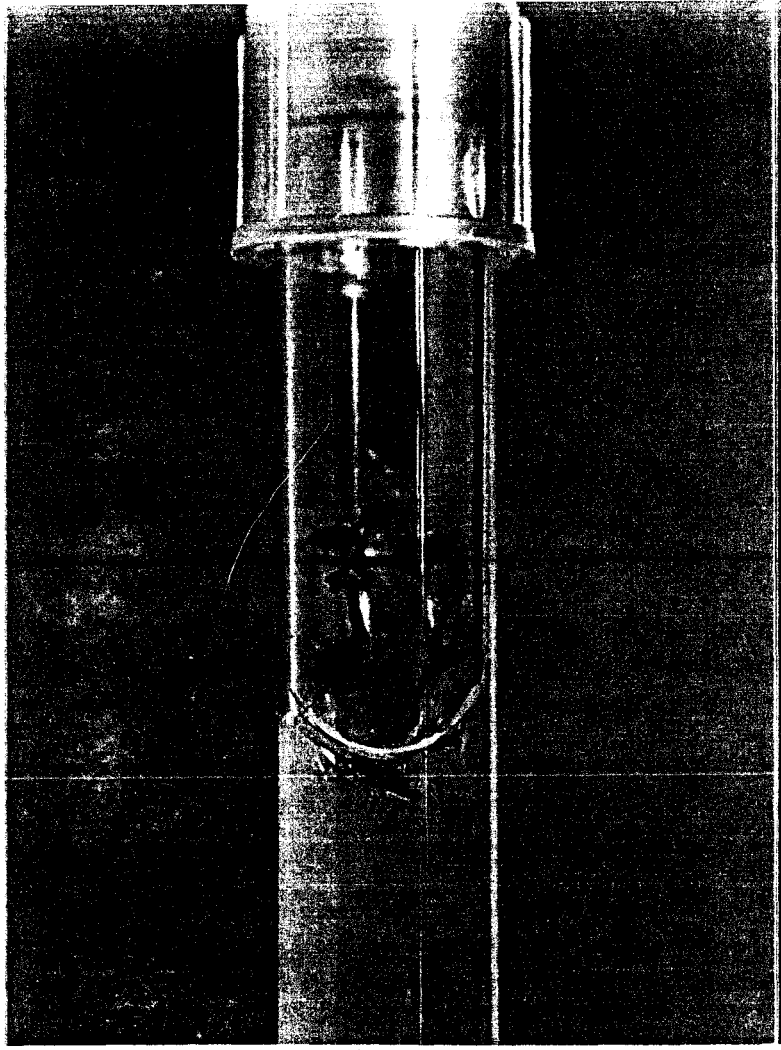
. L'acclimatation:

Elle a lieu lorsque les microplantes racinées mesurent environ 4 cm.

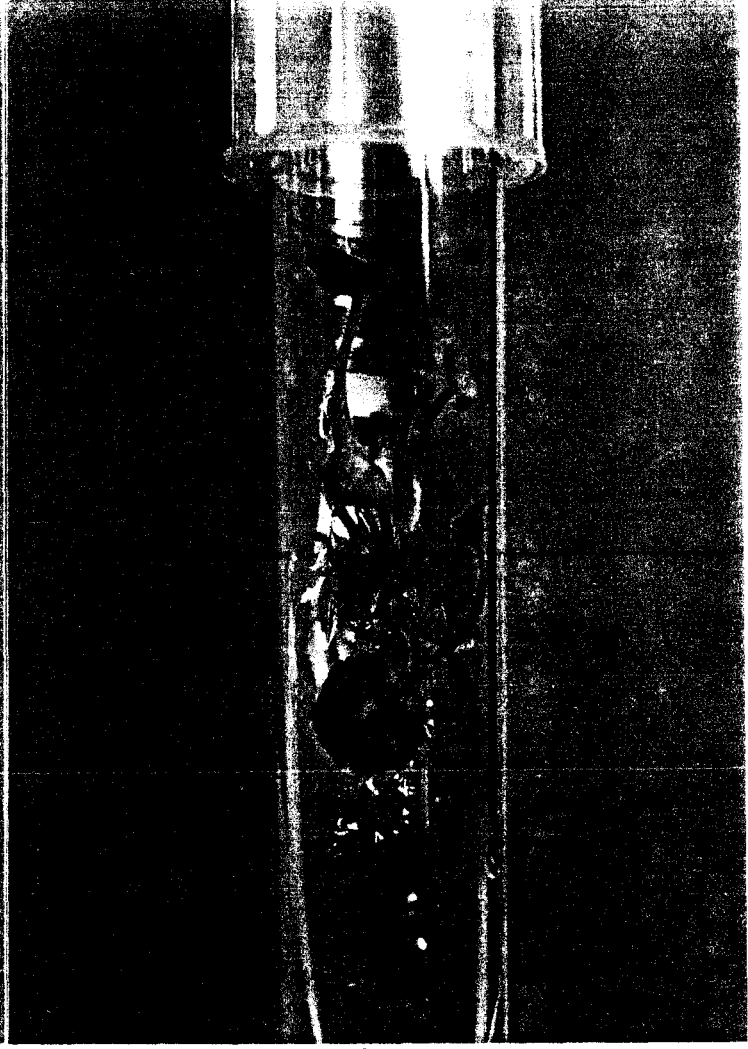
(cf CYCLE DE CULTURE p 84 et **PLANCHE IX-X**)

DIFFERENTES PHASES DE LA CULTURE DU MERISTEME
DE PELARGONIUM

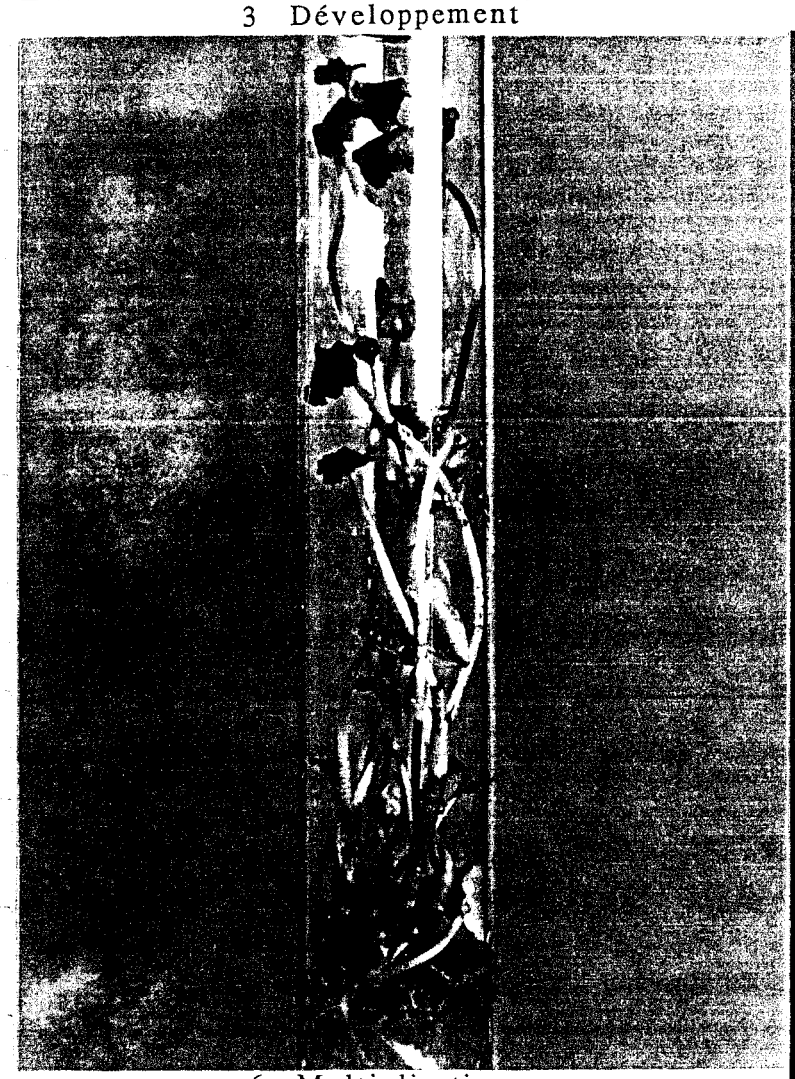




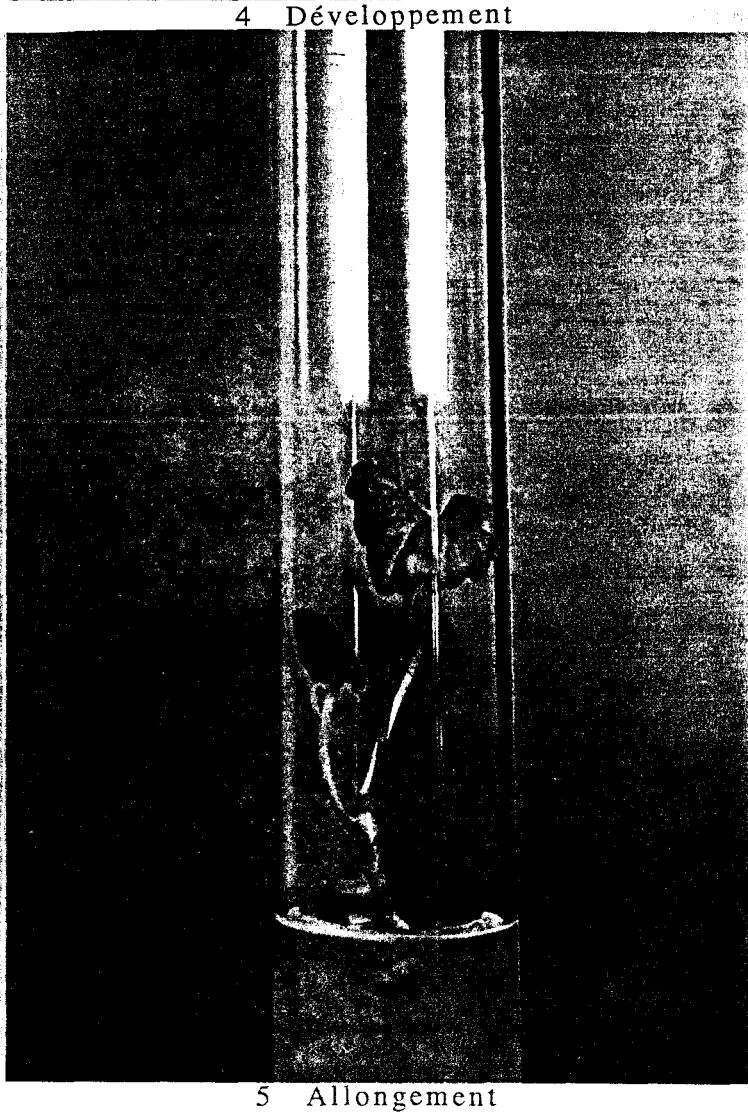
3 Développement



4 Développement



6 Multiplication



5 Allongement

BIBLIOGRAPHIE

ABO EL-NIL M.M. et HILDEBRANDT A.C., 1971. - Differenciation of virus-symptomless *Geraniums* plants from anther callus.
Plant Disease Reporter, 55 (11) 1017-1020.

ABO EL-NIL M.M. et HILDEBRANDT A.C., 1973. - Origin of androgenetic callus and haploïd *Geranium* plants.
Can. J. Bot., 51, (11), 2107-2109

ABO EL-NIL M.M., HILDEBRANDT A.C. et EVERT R.F., 1976. - Symptoms induced on virus-free *Geranium* seedlings by Tobacco ringspot and Cucumber mosaic viruses.
Phyton, 34 (1), 61-64.

ABO EL-NIL M.M., HILDEBRANDT A.C. et EVERT R.F., 1976. - Detection of viruses on *Geranium* plants by serological indexing.
Phyton, 34 (1), 65-69.

ABO EL-NIL M.M., HILDEBRANT A.C.et EVERT R.F., 1976. - Effect of auxin-cytokinin intereaction on organogenesis in haploïds callus of *Pelargonium hortorum.*
In Vitro : 12 (8) 602-604.

ALBOUY J. et MORAND J.C., 1976. - Les viroses du *Pelargonium* en France. Etat des recherches et possibilités de sélection sanitaire.
P.H.M., 168, 57-59.

ALBOUY J., MORAND J.C. et POUTIER J.C., 1979. - Effet de 3 virus de type Ringspot sur la végétation et la floraison de *Pelargonium x hortorum* issus de semis.
P.H.M., 193, 29-33.

ALBOUY J. et POUTIER J.C., 1980. - Adaptation de la méthode immunoenzymatique à la détection des viroses du *Pelargonium*..
Ann. Phytopathol., 12 (1), 71-75.

ALBOUY J., MORAND J.C. et POTIER J.C., 1980. - Les méthodes de mise en évidence des virus du *Pelargonium* (Plantes indicatrices et ELISA) dans le cadre d'une production de plantes saines.
Med. Fac. Landbouww, Rijksuniv. Gent, 45 (2), 359-367.

ALBRECHTOVA L., CHOD J. et ZIMANDL B., 1975. - Identification of Tomato bushy stunt virus in leaves of Cherry trees suflering from detrimental canker.
Phytopath Z. 82 (1), 25-34.

ALTMAN A. et GOREN R., 1971 - Promotion of callus formation by abscissic acid in *Citrus* bud cultures.
Plant. Physiol., 47, 844-846.

ALVIM R., HEWETT E.W., SAUNDERS P.F., 1976. - Seasonal variation in the hormone content of willow. I. Changes in abscissic acid content and cytokinin activity in the xylem sap.
Plant. Physiol., 57, 474-476.

ANKER L. , 1975. - Auxin-synthesis inhibition by abscissic acid and its reversal by gibberellic acid.
Acta Bot. Neerl., 24, 339-347.

ARMITAGE A.M., CARLSON W.H. et FLORE J.A., 1981. - The effect of temperature and quantum flux density on the morphology, physiology and flowering of hybrid *Geraniums*. J. Am. Soc. Hort. Sci., 106 (5), 643-647.

BAILEY WARD H. et DWAIN VANCE B., 1968. - Effects of monochromatic radiations on growth of *Pelargonium* callus tissues. Journal of Experimental Botany, 19 (58), 119-124.

BEAUCHESNE G., ALBOUY J., MORAND J.C. et DAGUENET J., 1977. - Multiplication de clones de *Pelargonium hortorum* et *Pelargonium peltatum* à partir de méristèmes pour l'obtention de plantes saines. Acta Horticulturae, 78, 397-402.

BEAUCHESNE G., 1980 - La multiplication végétative du *Pelargonium* en culture *in vitro* à partir du méristème. In : "Le Pelargonium" (Acquisition nouvelles), INRA, Angers, 67-69.

BENNICI A., 1974. - Cytological analysis of roots, shoots and plants regenerated from suspension and solid *in vitro* cultures of haploid *Pelargonium*. Z. Pflanzenzücht, 72, 199-205.

BIGOT C., 1983. - Multiplication végétative *in vitro* à partir de plantules d'hybride F1 de *Pelargonium* x *Hortorum* Bailey. Acta Horticulturae, 131, 61-70.

BLOMMAERT K.L.J. 1974. - Cité dans : Phytohormones and related compounds. "A comprehensive treatise " 1978, Vol. II, LETHAM D.S., GOODWIN, P.B. et HIGGINS T.J.V., 432.

BOETTCHER A.D., HILDEBRANDT, A.C., 1964. - Growth and differenciation of *Geranium* apical meristems *in vitro*. Annual meeting abstracts. Phytopath., 54 (8), 889.

BRUANT, 1894. - Cité dans : Origine et Histoire des *P. x hortorum* et *P. x hederaefolium*. VIDALIE H. , In : Le *Pelargonium* (Acquisitions nouvelles), INRA. Angers (1980) 9-15.

BURMAN, 1706-1779. - Cité dans : Origine et Histoire des *P. x hortorum* et *P. x hederaefolium*. VIDALIE H. , In : Le *Pelargonium* (Acquisitions nouvelles), INRA. Angers (1980) 9-15.

BURROWS W.J. et CAN D.J., 1969. - Effects of flooding the root system of Sunflower plants on the cytokinin content in the xylem sap. Physiol. Plant., 22, 1105-1112.

BUVAT R, 1952-1955. - Le méristème apical de la tige. Année Biologique, 31, 204-241.

CARRE M., 1978. - Culture de méristèmes du Framboisier et multiplication végétative *in vitro*. Application à d'autres ligneux. Thèse, INRA. Station de Physiopathologie végétale, DIJON, 60 p.

CASSELS A.C., 1979. - The effect of 2, 3, 5 triodobenzoic acid on caulogenesis in callus cultures of Tomato and *Pelargonium*. Physiol. Plant., 46, 159-164.

CASSELLS A.C., MINAS G. et LONG R., 198O. - Culture of *Pelargonium* hybrids from meristems and explants : chimeral and beneficially infected varieties.
in "Tissue culture Methods for Plant Pathologists"
INGRAM DS et HELGESON J.P., Blackwell scientific Ed., Oxford, 125-13O.

CASSELLS A.C. et MINAS G., 1983 - Plant and *in vitro* factors influencing the micropropagation of *Pelargonium* cultivars by bud-tips culture.
Scienta horticulturae, 21, 53-65.

CASSELLS A.C. et MINAS G., 1983 - Beneficially infected and chimeral *Pelargonium* implications for micropropagation by meristem and explant culture.
Acta Hortiticulturae, 131, 287-298.

CHEN H.R. et GALSTON A.W., 1965-1967. - Growth and development of *Pelargonium* pith cells *in vitro*.
I : induction of cells division
II : initiation of organized development.
Physiologia Plantarum 18, 454-461 (1965)
2O, 533-539 (1967)

DALLOT D., 1981. - Essais de régénération de plantes entières par l'isolement *in vitro* de méristèmes, sur deux espèces florales du genre *Pelargonium*.
D.E.A. d'Agronomie, option Phytotechnie. U.S.T.L. de Montpellier, 75 p.

DARTIGUES A. et LEMAIRE F., 198O. - Besoins en éléments minéraux du pied-mère de *Pelargonium* x *hortorum*.. Conséquence de la nature de l'azote sur la qualité des boutures.
In "Le Pelargonium" (Acquisitions Nouvelles) I.N.R.A., Angers, 41-5O.

DAVIDSON R.M., YOUNG H., 1973. - Abscissic acid content of xylem sap.
Planta, 1O9, 95-98.

DEBERGH P., MAENE L., 1977. - Rapid clonal propagation of pathogen free *Pelargonium* plants starting from shoot tip and apical meristems.
Acta Horticulturae, 78, 449-454.

DEBERGH P., HARBAOUI Y. et LERNEUR R., 1981. - Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scoiymus*) : Evaluation od differents hypotheses to overcom vitrification with special reference to water potenential.
Physiol. Plant., 53, 181-187.

DEBERGH P., 1983. - Effects of agar brand and concentration on the tissue cultures medium.
Physiol. Plant., 59, 27O-276.

DEMARNE F., 1979. - Essais préliminaires de culture *in vitro* de souches de *Geranium rosat* (*Pelargonium sp.*).
I. R.A.T., Rapport annuel, 75-76.

DIGAT B., 1978. - Selection sanitaire des boutures de *Pelargonium* et de *Begonia* x *Elatior* "Rieger" vis-à-vis de bactérioses par utilisation de l'immunofluorescence.
Ann. Phytopathol., 1O (1), 67-78.

DIGAT B. et VIDALIE H., 1982. - Aspects phytotechniques et phytosanitaires liés à la production du *Pelargonium* F 1 de semis.
P.H.M., 223, 29-37.

DRUART P, KEVERS C. et GASPAR T., 1982. - *In vitro* promotion of root formation by apple shoots through darkness effect on endogenous phenols and peroxidases.
Z. Pflanzenphysiol., Bd 1O8 S, 429-436.

ELIASSON L., 1975. - Effect of indoleacetic acid on the abscissic acid level in stem tissue.
Physiol. Plant., 34, 117-12O.

EMBERGER, L. 196O. - Traité de Botanique, Systématique, Les Végétaux Vasculaires.
MASSON et Cie, Ed. II, 863-867.

FEUTRY A., 1976. - Culture de *Pelargonium in vitro* à partir de prélèvement de méristèmes et ses perspectives d'amélioration sanitaire.
Mémoire de fin d'étude (E.N.I.T.H.) Angers, 62 p.

FOSTER, A.S. 1938. - Structure and growth of the shoot apex in *Ginkyo biloba* .
Bull. Torr. Bot. Club., 65, 531-536.

GAMBORG O., MILLER R. et OJIMA. K., 1968 .-Nutrient requirement of suspension cultures of Soybean root cells.
Exp. Cell. Res.,50, 151-158.

GASPAR T., 198O. - Rooting and flowering two antagonistic phenomens from a hormonal point of view. Aspects and Prospects of plant growth regulators.
Manograph. 6, B. Jeff. Coat ed., Wantage, 39-49.

GASPAR T., XHAUFFLAIRE A., 1967. - Effect of kinetin and growth, auxin catabolism, peroxidase and catalase activities.
Planta, 72, 252-257.

GIFFORD, E.M. ,1954. - The shoot apex in Angiosperms.
The Botanical Review, 2O, 477-529.

GIPPERT R. et SCHMELZER K., 1973.- Erfahrungen mit Spitzenmeristemkulturen von *Pelargonium* (*Pelargonium zonale*- hybrides).
Arch. Phytopathol.u Pflanzenschutz. Bd, 9 (6), 353-362.

GRAIFENBERHG A. et GUSTINIANI L., 1978. - Propagazione del pelargonio attraverso coltura *in vitro* di apici vegetativi.
Riv. Ortoflorofrutt. It., 62, 141-146.

GRUNEWALDT J., 1981. - Züchtungsforschung an *Pelargonium* zonale und *Pelargonium peltatum* hybriden. I. Regeneration von *Pelargonium* Hybriden *in vitro*.
Gartenbauwissenschaft, 46 (6), 25O-252.

GUSTAFSON F.G, 1946., - Cité dans :Phytohormones and related compounds.
"Comprehensive treatise ", 1978 ,Vol. II, LETHAM D.S., GOODWIN, P.B. et HIGGINS T.J.V., 65.

GUIGNARD J.L.,1983 .-Abrégé de Biochimie Végétale.
Masson et Cie, Editeurs, 1- 214.

HAKKAART F.A. et HARTEL G., 1979. - Virus eradication from some *Pelargonium* zonale cultivars by meristem-tip-culture.
Neth. J. Pl. Path., 85, 39-46.

HAMDORF G., 1976. - Propagation of *Pelargonium* varieties by stem-tip culture.
Acta Horticulturae, 59, 143-151.

HAMMERSCHLAG F.A., 1978. - Influence of light intensity and date of explantation on growth of *Geranium* callus.
Hort. Science, 13 (2), 153-154.

HAMMERSCHLAG F.A. et BOTTINO P., 1981. - Effect of plant age on callus growth, plant regeneration, and anther culture of *Geranium* .
J. Am. Soc. Hort. Sci., 1O6 (1), 114-116.

HANSTEIN J., 187O. - Die Ent Wickelnng der Keimes der Monocotylen und Dicotylen.
Bot. Abh. Bonn, 1.

HARISSON M .A . et SAUNDERS P. F.,1975.- Cité dans: Phytohormones and related compounds, "A comprehensive treatise". 1978, Vol. II. Eds. LETHAM D.S., GOODWIN P.B. et HIGGINS T.J.V , 433 .

HEGEDUS P . ET PHAN C . T ., 1983 .-Action de phénols sur les malformations observées chez les porte-greffes de Pommiers M-26 et O-3 cultivés *in vitro*.
Rev. Can . Biol . Exptl , 42 (1) 33-38 .

HELLER R., 1953. - Recherches sur la nutrition minérale de tissus végétaux cultivés *in vitro*.
Ann. Sci. Nat. Bot. et Biol. Vég., série II, 1-233.

HEMBERG J., 1972 ., - The effect of kinetin on the occurence of auxin in *Coleus blumei* .
Physiol Plant 26 : 98 -103.

HENDERSON, 1863. - Cité dans : Origine et Histoire des *P. x hortorum* et *P. x hederaefolium*.
VIDALIE H. , In : Le *Pelargonium* (Acquisitions nouvelles), INRA. Angers (1980), 9-15.

HEWETT E.W. et WARRING P . F . , 1973 . - Cytokinins in*Populus x robusta* : changes during chilling and bud burst .
Physiol .plant . 28, 393 - 399 .

HOFMEISTER, W. , 1851. - Vergleichende untersuchung des Keimung Entfalhung und frucht bildung der hoherer Kryptogamen und der Samenbildung der Coniferen. Leipzig.

HOLLINGS M. et STONE M.O., 1975. - Serological and immunoelectrophoretic relationships amoung viruses in the Tombus virus group.
Am. Appl. Biol., 8O (1), 37-48.

HORST R.K., SMITH S.H., HORST H.T. et OGLEVEE W.A., 1976. - *In vitro* regeneration of shoot and root growth from meristematic tips of *Pelargonium x hortorum* Bailey.
Acta Horticulturae, 59, 131-142. Virus diseases of ornamentals.

JANICK J., SKIRVIN R.M. et SANDERS R.B., 1977. - Comparison of *in vitro* and *in vivo* tissue culture systems in scented *Geranium*.
The Journal of Heredity, 68, 62-64.

JELASKA S., JELENCIE B., 198O. - Plantlet regeneration from shoot tip culture of *Pelargonium zonale* hybrid.
Acta Bot. Croat, 39, 59-63.

JONES R . L. et PHILIPS I.D.J. -1966 - Cité dans : Phytohormones and related compounds "A comprehensive treatise". 1978, Vol. II. Eds. LETHAM D.S., GOODWIN P.B. et HIGGINS T.J.V, 56

KATO M. et TOKUMASU S., 1983. - Characteristics of F1 hybrids produced by ovule culture in ornamental *Pelargonium*.
Acta Horticulturae, 131, 247-252.

KEVERS C., COUMANS M.F., COUMANS G. et GASPAR Th., 1984. - Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured *in vitro*.
Physiol. Plant., 61, 69-74 .

KIPLINGER D.C., 1973. - Oedema on Geraniums. A review.
Ohio Florist's Assn, Bulletin 519, 6-7.

KIVILAAN A. et SHEFFER R.P., 1958. - Factors affecting development of bacterial stem rot of *Pelargonium*.
Phytopath., 48, 185-191.

KIVILAAN A. et SHEFFER R.P., 1959. - Dectection, prevalence and significance of latent viruses in *Pelargonium*.
Phytopath., 49, 282-286.

KOCH L., 1891. - Ueber bau und wachsthum der Sprosspitze der Phanerogamen . I. Die Gymnospermen. Jahrb.
Wiss Bot., 22, 491-68O.

KORODY E., 1937. - Studien am Spross-vegetationspunkt von *Abies concolor, Picea excelsa,* und *Pinus montana*.
Beitrage zur biologia der Pflanzen, 25, 23-59.

LEE T.T., 1971. - Cytokinin controlled indoleacetic acid oxidase isoenzymes in Tobacco callus cultures.
Plant Physiol., 47, 181-186.

LEE T . T., STARRAT A. N et JEVNIKAR J .J., 1982 ., - Regulation of indole -3- acetic acid by phenols :structure - activity relationships .
Phytochem : 21 (3) , 517 - 523 .

LEGRAND B., 1975. - Action du fer et de l'E.D.T.A. sur la néoformation des bourgeons par les fragments de feuilles d'Endive cultivés *in vitro*.
C. R. Acad. Sc. Paris, 28O, 2215-2218.

LEMATTRE M., 1963. - Centres de prolifération et de nécrose induits par *Xanthomonas pelargoni* (Brown) Starr et Burk dans les tissus de *Pelargonium zonale* : detection, nature, genèse.
C. R. Acad. Sc., Paris, 256, 4494-4497.

LEMATTRE M., 1966. - Etude histologique et histochimique des réactions déclenchées par *Xanthomonas pelargonii* dans les tissus de *Pelargonium zonale*.
Ann Epiphyties, 17 (2), 215-228.

LE-PAGE-DEGIVRY M.T., 1973. - Intervention d'un inhibiteur lié dans la dormance embryonaire de *Taxus baccata*.
C. R. Acad. Sc. Paris, série D, 277, 177-18O.

LESAINT C. et COIC Y., 1983. - Cultures hydroponiques. Flammarion.
La Maison Rustique, Paris, 119 p.

LESCHEM Y., PHILISOPHS S. et WUYBURGER J., 1974. - Cité dans : Phytohormones and related compounds. "A comprehensive treatise ", 1978 , Vol. II, LETHAM D.S., GOODWIN, P.B. et HIGGINS T.J.V., 434.

L'HERITIER DE BRUTELLE , 1746-18OO. - Cité dans : Origine et Histoire des *P. x hortorum* et *P. x hederaefolium*. VIDALIE H. , In : Le *Pelargonium* (Acquisitions nouvelles), INRA. Angers (1980), 9-15.

LOISEAU J.E., 1954. - Suppression expérimentale d'une hélice foliaire chez *Impatiens roylei* Walp.
C.R. Acad. Sc., 238, 149-151.

LIMA AM.L.P., HAAG H.P., 1981. - Nutriçao mineral de plantas ornamentals. Sintomas de carencias de macro-nutrientes, Boro e Ferro em *Pelargonium zonale*.
O, Solo, Piracicaba, Sp, 73 (1), 4O-43.

LINNE, 17O7-1778. - Cité dans : Origine et Histoire des *P. x hortorum* et *P. x hederaefolium*.
VIDALIE H. , In : Le *Pelargonium* (Acquisitions nouvelles), INRA. Angers (1980), 9-15.

LOAEC M.H., 1977. - Mise au point sur la culture de *Pelargonium*.
P.H.M., 181, 55-59.

MADER M. et AMBERG-FISHER V., 1982. - Role of peroxidase in lignification of Tobacco cells.
Plant Physiol., 7O, 1128-1131.

MAMET H., 1981. - Essais de régénration *in vitro* de plantes entières à partir de méristèmes de deux variétés de *P. x peltatum* .
D.E.A. d'Agronomie. Option Phytotechnie. U.S.T.L. de Montpellier, 66 p.

MAMET H., 1983. - Contribution à l'étude de la régénération *in vitro* de plantes saines et conformes à partir d'apex de 3 espèces du genre *Pelargonium : P. x hortorum, P. x peltatum, P. peltato x zonale*.
Thèse en Sciences Agronomiques. Option Phytotechnie, 2OO p.

MAMET H. et JONARD R., 1983. - Différences des réponses varietales vis-à-vis des besoins nutritifs en phytohormones et en azote, d'apex isolés in vitro à partir de 3 variétés de *Pelargonium*.
C.R. Acad. Sc. Paris, 296, Série III, 381-388.

MAMET H. et JONARD D. R., 1986. - L'influence de l'époque du prélèvement et de la teneur en azote du milieu sur le développement d'apex isolés *in vitro* à partir de 3 espèces de *Pelargonium : P. hortorum, P. peltatum* et *P. peltato x zonale*.
C. R. Acad. Sci. Paris, 3O2, série III, 381-388.

MARGARA J., 1978. - Mise au point d'une gamme de milieux minéraux pour les conditions de culture *in vitro*.
C.R. Acad. Agr. france, 8, 654-661.

MARGARA J., 1982. - Bases de la multiplication végétative. Les méristèmes et l'organogenèse.
I.N.R.A., Ed., 262 p.

MENARD D., COUMANS, M. et GASPAR Th. 1985. - Micropropagation du Pelargobium à partir de méristèmes.
Med. Fac. Landbouw. Rijksuniv. Gent. 5O / 2a,327-331.

MESSEGUER J., 1981. - Cultivars *in vitro* de apices meristematicos de *Pelargonium hortorum.*
Communicaciones I.N.I.A., Série Produccion vegetal, 34, 26 p.

MINIER R., 198O. - Applications de la multiplication *in vitro* dans l'horticulture ornementale.
C.R. Acad. Agr. France, 66 (8), 67O-68O.

MONCOUSSIN C., 1978. - *Pelargonium x hortorum* et cultures tissulaires.
Technicum Horticole, 1254, Lullier, Suisse, 367-37O.

MOREL G. et MARTIN C., 1952 . - Guérison de Dalhias atteints d'une maladie à virus.
C. R. Acad. Sciences, 235, 1324-1325.

MOREL G. et MARTIN C., 1955 .-Guérison de Pommes de terre atteintes d'une maladie à virus.
C. R. Acad. Agr. Fr., 41, 472-475.

MOREL G., 1963. - Producing virus free *Cymbidiums*.
Amer. Orch. Soc. Bull., 29, 495-497.

MOREL G. et MULLER J.F., 1964. - La culture *in vitro* du méristème apical de la Pomme de terre.
C.R. Acad. Sc., Paris, 258 (11), 525O-5252.

MOSTAFA B. et HORN W.1972. - Contribution to the breeding of *Pelargonium x hortorum* Bailey.
Z. Pflanzenzuecht, 66 (4), 278-292.

MULLIN R.H., SMITh S.H., FRAZIER N.W., SHLEGEL D.E. et Mc CALL S.R., 1974. - Meristem culture free Strawberries of mild yellow edge, paellidosis and mottle diseases.
Phytopath., 64, 1425-1429.

MUNNECKE D.E., 1956. - Development and production of pathogen-free *Geranium* propagative material.
Plant Disease Reporter, 238, 93-95.

MURASHIGE T., 1974. - Plant propagation through tissue cultures.
Ann. Rev. Plant Physiol., 25, 135-166.

MURASHIGE T. et SKOOG F., 1962. - A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissues cultures.
Physiol. Plant., 15, 473-497.

NAEGELI C., 1845. - Wachstumgeschichte der Laub und Lerbermose.
Zeitschrift für wissenchaftlichte Botanik (Von M.J. SCHLEIDEN und C. NAEGELI).
2, 138-212.

NEWHART S.R. et ROMAINE C.P., 1980. - A rapid method for virus indexing the florist's *Geranium*.
Hortscience, 15 (6), 811-813.

PALUDAN N., 1980. - Chrysanthemum stunt and chlorotic mottle stablishment of healthy chrysam plants and storage et low temperature of Chrysanthemum, Carnation, Campanula and *Pelargonium* in tube.
Acta Horticulturae, 110, 303-313. Virus diseases of ornamentals.

PENNAZIO S. et RUDOLFI P., 1974. - Potato virus x eradication in cultured potato meristem tips. Potato Res., 17, 333-335.

PERRY T.O. et HELLMERS H., 1973. - Cité dans : Phytohormones and related compounds. "A comprehensive treatise " 1978, Vol. II, LETHAM D.S., GOODWIN, P.B. et HIGGINS T.J.V., 437.

PETERSON J. et MILLER C.O., 1976. - Cité dans : Phytohormones and related compounds "Comprehensive treatise" 1978, Vol. II, LETHAM D.S., GOODWIN P.B. et HIGGINS T.J.V., 12.

PILLAI S.K. et HILDEBRANDT A.C., 1968. - Origin and development of *Geranium* callus from stem tip, internode, pith and petiole *in vitro*.
Phyton, 25 (2), 89-95.

PILLAI S.K. et HILDEBRANDT A.C., 1968. - *In vitro* differenciation of *Geranium* (*Pelargonium hortorum*, Bailey) plants from apical meristems.
Phyton, 25 (2), 81-87.

PILLAI S.K. et HILDEBRANDT A.C., 1968.- *Geranium* plants differenciated *in vitro* from stem tip and callus cultures.
Plant Disease Reporter, 52 (8), 600-601.

PILLAI S.K. et HILDEBRANDT A.C., 1969. - Induced differenciation of *Geranium* plants indifferenciated callus *in vitro*.
Amer. J. Bot., 56 (1), 52-58.

PLANTEFOL L, 1947. - Hélices foliaires, point végétatif et stèle chez les Dicotylédones.
Rev. Gén. Bot., 54, 49-80.

QUOIRIN M., 1974. - Premiers résultats obtenus dans la culture *in vitro* du méristème apical de sujets porte-greffe de pommier.
Bull. Rech. Agron. Gembloux, 9 (2), 189-192.

QUOIRIN M., GASPAR T. et BOXUS F., 1975. - Susbtance de croissance endogènes liées à la reprise des méristèmes de *Prunus accolade* en culture *in vitro*.
C.R. Acad. Sci. Paris, 281, 1309-1312.

REINERT R.A., HILDEBRANDT A.C. et BECK G.E., 1962. - Characterization of five *Geranium* virus isolated and *in vitro* growth of *Geranium* stem tips.
Annual Meeting Abstracts. Phytopath., 52, 74.

REUTHER G., 1975. - Untersuchungen zur vermehrung von Pelargonienvarietäten durch gewekekultur.
Gartenbauwissenschaft, 40 181-187.

REUTHER G., 1983. - Propagation of disease free *Pelargonium* cultivars by tissue culture.
Acta Horticulturae, 131, 311-319.

ROMAINE C.P., NEWHART S.R. et ANZOLA D., 1980. - Enzyme linked immunosorbent assay for plant viruses in intact leaf tissue disks.
Phytopath., 71, 308-312.

SCARBOROUGH B., 1974. - The effects of Tobacco Ringspot virus and Tomato Ringspot virus on growth and flowering quality of *Pelargonium x hortorum* Bailey.
Thesis in Plant Pathology Pennsylvania State University, 63 p.

SCARBOROUGH BA. et SMITH S.M., 1977. - Effects of Tobacco and Tomato Ringspot viruses on the reproductible tissues of *Pelargonium x hortorum*.
Phytopath., 67, 202-297.

SCHAEFFER H., 1983. - Jahreszeitlicher verlauf und vermultliche bedentung der peroxidase in verholzten organen von *Vitis*.
Vitis, 22, 1-8.

SCHNEIDER E.A., WIGHTMAN F., 1974. - Metabolism of auxin higher plants.
Ann. Rev. Plant. Physiol., 25, 487-513.

SCHMIDT A, 1924. - Histologische studien on Phanerogamen vegetationspunkten.
Bot. Arch., 9, 345-404.

SEMENINK P.et TAYLOR R., 1970. - Effects of growth retardants on growth of *Geranium* seedlings anf flowering.
Hort. Science, 5 (5), 393-394.

SHABDE M. et MURASHIGE T., 1977. - Cité dans : Phytohormones and related compounds "A comprehensive treatise" 1978, Vol. II, LETHAM D.S., GOODWIN P.B. et HIGGINS T.J.V., 53.

SKIRVIN R.M. et JANICK J. , 1976. - Tissue culture induced variation in scented *Pelargonium* sp.
J. Am. Soc. Hort. Sci., 101 (3), 281-290.

SKIRVIN R.M. et JANICK J. ,1976. - 'Velvet rose' *Pelargonium*, a scented *Geranium*.
Hortscience, 11 (1), 61-62.

SKOOG F. et MILLER C.O., 1957. - Cité dans : Phytohormones and related compounds "A comprehensive treatise" 1978, Vol. II, LETHAM D.S., GOODWIN P.B. et HIGGINS T.J.V., 20.

SMITH S.H., HORST R.K. et OGLEVEE W.A., 1974. - Rooting of *Geranium* meristem-tip cultures reduced by virus infection.
North Eastern Abstracts.
Phytopath., 64, 285-286.

SNOW M. et SNOW R., 1947. - On the determination of leaves.
New Phytol., 46, 5-19.

SMITH S.H. et OGLEVEE O'DONOVAN W.A., 1977. - Meristem-tip culture from virus-infected plant material and commercial implication.
In : plant cell and tissue culture Ohio State University Press, Columbus Ohio. Edited by W.R. SHARP, P.O. LARSEN, E.F. PADDOCK., 453-460.

STEWART R.N., SEMENINK P. et DERMEN H., 1974. - Competition and accomodation between apical layers and their derivation in the ontogeny of chimeral shoots of *Pelargonium x hortorum.*
Amer. J. Bot., 61 (1), 54-67.

STONE O.M. et HOLLING M., 1973. - Some properties of *Pelargonium* flower break virus.
Annals of applied Biology, 75 (1), 15-23.

STONE O. M., 1980. - Nine viruses isolated from *Pelargonium* in the United Kingdom.
Acta Horticulturae, 110, 177-182. .

TENDILLE C. et LECERF M., 1974. - La multiplication végétative de l'Asperge. (*Asparagus officinalis* L.) action de divers facteurs, en particulier de la nutrition minérale, sur le développement des méristèmes d'asperge, sur la croissance de plantules issues de ces méristèmes et sur la production de plantes adultes.
Ann. Amelior. Plantes, 24 (3), 269-282.

THEILER R., 1977. - *In vitro* culture of shoot tips of *Pelargonium* species.
Acta Horticulturae, 78, 403-414.

VAN DER MAST C.A., 1970. - The influence of membrane-bound peroxidases on the degradation of IAA by the specific IAA degrading protein complexes in homogenates of Pee roots.
Acta Bot. Neerl. 19 (5), 727-736.

VIDALIE H., 1980. - Influence de l'âge du pied mère et des conditions climatiques sur le rendement en boutures du *Perlargonium x hortorum* (après 3 ans de culture).
In : "Le *Pelargonium*" (Acquisition Nouvelles) INRA, Angers,France, 61-70.

VIDALIE H., 1980. - Origine et histoire des *Pelargoniums x hortorum* et *Pelargonium x hederaefolium.*
In :" Le *Pelargonium* " (Acquisitions Nouvelles) INRA, Angers, France, 9-15.

VIDALIE H. et BRICHETAU J., 1976. - Premiers résultats de 18 mois d'expérimentation sur une culture de pieds mères de *Pelargonium.*
P.H.M., 168, 37-41.

VIDALIE H., 1978. - 3 années d'expérimentation sur une culture de pieds-mères de *Pelargonium x hortorum.*
P.H.M., 184, 15-19.

VIETH J., MORISSET C. et LAMOND M., 1983. - Histologie de plantules vitreuses de *Pyrus malus* cv : "M. 26" et de *Pelargonium peltatum* cv 'Chester Frank', issues de la culture *in vitro.*
Rev. Can. Biol. Exper., 42 (1), 29-32.

WAINWRIGHT S.H. et NELSON P.E., 1972. - Histopathology of *Pelargonium* species infected with *Xanthomonas pelargonii.*
Phytopath., 62, 1337-1347.

WELANDER T., 1978. - Influence of nitrogen and sucrose in the medium and of irradiance of the stock on root formation in *Pelargonium* petioles grown *in vitro*.
Physiol. Plant., 43, 136-141.

WETMORE R.H., 1953. - Cité dans : Phytohormones and related compounds "A comprehensive treatise" 1978, Vol. II, LETHAM D.S., GOODWIN P.B. et HIGGINS T.J.V., 52.

WETZSTEIN H.Y. et ARMITAGE A., 1983. - Inflorescence and floral development in *Pelargonium x hortorum*.
J. Am. Soc. Hort. Sci., 108 (4), 595-600.

WILBUR F.H. et RIOPEL J.L., 1971. - The role of cell interaction in the growth and differentiation of *Pelargonium hortorum* cells *in vitro*.
I : Cell interaction and growth.
II. Cell interaction and différenciation.
Botanical Gazette, 132 (3), 183-202.

WHITE P., 1934. - Multiplication of the viroses of Tobacco and Aucuba mosaïc on growing excised Tomato roots.
Phytopath., 24, 1003-1011.

WHITE R., 1943. - Nutrient deficiency studies and an improved inorganic nutrient medium for cultivation of excised Tomato roots.
Growth, 7, 53.

WHITE R., 1951. - Nutritional requirements of isolated plant tissues and organs.
Ann. Rev. Plant. Physiol., 2, 231.

YOSHIDA R. et ORITANI T., 1974. - Cité dans : Phytohormones and related compounds "A comprehensive treatise" 1978, Vol. II, LETHMAN D.S., GOODWIN P.B. et HIGGINS T.J.V., 20.