

2016-2017

Mention Biologie et Technologie du Végétal



# Rapport de stage Master 1

## Laboratoire Angevin des Plantes

Optimisation de la production de pousses juvéniles sur les pieds mères dans le but de faciliter l'introduction in vitro.

**THUILLIER Léa**

Sous la direction de M. Dominique Ménard

Membres du jury

F. Montrichard | Présidente du jury

C. Veronesi | Tuteur

A. Kwasiborski | Auditeur

D. Ménard | Maître de stage

# ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné(e) Léa THUILLIER  
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une  
partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet,  
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.  
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées  
pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiant(e) le **21/06/2017**

**L'auteur du présent document vous autorise à le partager, reproduire, distribuer et communiquer selon les conditions suivantes :**



- Vous devez le citer en l'attribuant de la manière indiquée par l'auteur (mais pas d'une manière qui suggérerait qu'il approuve votre utilisation de l'œuvre).
- Vous n'avez pas le droit d'utiliser ce document à des fins commerciales.
- Vous n'avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l'adapter.

**Consulter la licence creative commons complète en français :  
<http://creativecommons.org/licences/by-nc-nd/2.0/fr/>**

Ces conditions d'utilisation (attribution, pas d'utilisation commerciale, pas de modification) sont symbolisées par les icônes positionnées en pied de page.



## REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord remercier Dominique Ménard pour le temps qu'il a consacré à me transmettre son savoir concernant la culture *in vitro*, mais aussi concernant l'organisation et la planification des expérimentations. Il a su me guider pas à pas pour cette étude tout en me laissant rapidement une grande autonomie au sein de l'entreprise. Il m'a montré comment rebondir de façon constructive face à des résultats a priori décevants.

Dans cette même logique, je remercie Jean Yves Morel, qui a pris le temps de me faire découvrir divers aspects du fonctionnement d'une serre, en allant du suivi de culture jusqu'au traitement de protection biologique intégrée, en passant par la fertilisation. Katya a également su me montrer les bonnes pratiques qui mènent à un bouturage efficace.

Je remercie également Alexandre Rouinsard pour la formation qu'il m'a fourni au sein du laboratoire pour me permettre de gérer mes expérimentations rapidement par moi-même, mais aussi pour les conseils divers qu'il m'a apporté au cours de ce stage, et l'aide qu'il m'a fourni pour la rédaction de mon rapport. De même, merci à Marie Claire Hamelin, Karine Forget et Sandrine Gohard d'avoir partagé avec moi leur savoir-faire concernant le repiquage et la confection de milieux de culture.

Je suis également reconnaissante envers mon tuteur, Christophe Veronesi, qui a pris le temps de me conseiller sur la rédaction de ce rapport. Enfin, je remercie un autre stagiaire présent lors de mon séjour, Antoine Métivier, pour les informations que nous avons partagées sur nos différents sujets et les réponses qu'il a pu m'apporter.

# Glossaire

**Arbrisseaux** : plante ligneuse de moins de 4 m de hauteur, se ramifiant dès la base et n'ayant pas de tronc. Sa forme est dite « buissonnante ».

**Autotrophie** : production, par un organisme vivant, de matière organique par réduction de matière inorganique et matière minérale.

**Bourgeon axillaire** : bourgeon situé à l'aisselle des feuilles

**Bourgeon terminal** : bourgeon situé à l'extrémité de la tige

**Caduque** : se dit de tout organe qui tombe, annuellement ou au cours de la vie

**Cotylédon** : feuilles primordiales constitutives de la graine. Les graines des plantes monocotylédones comportent un seul cotylédon; celles des dicotylédones en comportent deux. Situés dans la graine, les cotylédons sont chargés de divers types de réserves (protéines, lipides, et sucres).

**Dioïque** : se dit d'une espèce dont les fleurs unisexuées mâles et femelles sont portées par des pieds différents.

**Dominance apicale** : phénomène par lequel l'axe principal d'une plante croît plus vite que ses ramifications. Ce phénomène est expliqué par l'inhibition des bourgeons latéraux par l'auxine, une phytohormone sécrétée par le bourgeon terminal.

**Facteur de transcription** : protéine nécessaire à l'initiation ou à la régulation de la transcription d'un gène.

**Filtre HEPA** : s'applique à tout dispositif capable de filtrer, en un passage, au moins 99,97 % des particules de diamètre supérieur ou égal à 0,3  $\mu\text{m}$ .

**Hotte à flux laminaire** : hotte conçue pour éviter la contamination par des particules, contamination microbienne d'échantillons biologiques ou tout autre objet sensible aux particules. De l'air passe à travers un filtre HEPA, puis est diffusé en un flux laminaire vers l'utilisateur.

**Hétérotrophie** : nécessité pour un organisme vivant de se nourrir de constituants organiques préexistants. La notion d'hétérotrophie s'oppose à celle d'autotrophie.

***Marchantia polymorpha*** : L'hépatique des fontaines est une espèce vivant dans les milieux humides. Au printemps et en été cette plante produit des organes sexuels en forme de parapluie. Sa présence nuit à la production en étouffant les plantes.

**Méristème** : tissu cellulaire spécialisé dans la croissance. Les cellules méristématiques indifférenciées se divisent puis se différencient en acquérant une structure et une fonction.

**Monocotylédone** : plante à fleur dont la graine n'a qu'un seul cotylédon. Présente une tige non ramifiée et des feuilles à nervures parallèles.

**Plante KO** : une plante est dite KO pour un gène lorsque celui-ci est éteint et donc non exprimé.

**RUBISCO** : enzyme clé permettant la fixation du dioxyde de carbone dans la biomasse végétale. Elle participe aux processus de photosynthèse.

**Sarmenteux** : se dit d'une tige ligneuse mais flexible, ayant besoin d'un appui.

**Sénescence** : processus physiologique qui entraîne une lente dégradation des fonctions de l'organisme

## Liste des abréviations

AA: acides aminés

ABA : acide abscissique

ABJP : André Briant Jeunes Plants

AHL : acyl homosérine lactone

AUX : auxine

BAP : 6-benzilaminopurine ou benzyladenine

BRC1 : BRANCHED1

CK : cytokinines

ETH : éthylène

GA : gibbérellines

IAA : acide indole-3-acétique

IBA : acide indole-3-butyrique

LAP : Laboratoire Angevin des plantes

NPK : azote, phosphore et potassium

PIN1 : transporteur d'auxine

PJ : pousse juvénile

PM : pied mère

SL : strigolactones

T1 : taille 1

# Table des matières

<b>1.</b>	<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
1.1.	Présentation de l'entreprise .....	1
1.1.1.	André Briant Jeunes Plants .....	1
1.1.2.	Création du Laboratoire Angevin des Plantes .....	1
1.2.	Objectifs du stage .....	2
1.3.	Etat de la littérature .....	2
1.3.1.	Principe de réitération et obtention de pousses juvéniles.....	2
1.3.2.	Culture <i>in vitro</i> .....	3
1.3.3.	Les auxines .....	3
1.3.4.	Les cytokinines .....	3
1.4.	Stratégie permettant d'obtenir de meilleurs résultats en introduction <i>in vitro</i> .....	4
1.4.1.	Moyens disponibles .....	4
1.4.2.	Contraintes .....	4
<b>2.</b>	<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>5</b>
2.1.	Création du parc de pieds mères .....	5
2.1.1.	Nettoyage des pieds mères .....	5
2.1.2.	Variétés travaillées.....	5
2.1.3.	Tailles des pieds mères.....	6
a)	Premières tailles .....	6
b)	Secondes tailles .....	6
2.1.4.	Fertilisation .....	7
2.2.	Introductions de culture <i>in vitro</i> .....	7
2.2.1.	Prélèvement du matériel végétal .....	7
2.2.2.	Optimisation de l'état sanitaire des souches au sein du laboratoire <i>in vitro</i> .....	8
a)	Traitements existants .....	8
b)	Traitements expérimentaux .....	9
2.2.4.	Approche statistique.....	10
<b>3.</b>	<b>RESULTATS .....</b>	<b>11</b>
3.1.	Effets des tailles sur l'organisation structurale des plantes .....	11
3.1.1.	Premières tailles des pieds mères .....	11
a)	Genre <i>Rubus</i> .....	11
b)	Genre <i>Syringa</i> .....	11
c)	Genre <i>Choisya</i> .....	11
d)	Genre <i>Cotinus</i> .....	12
3.1.2.	Secondes tailles des pieds mères.....	12
3.2.	Introduction de culture <i>in vitro</i> .....	13
3.2.1.	Genre <i>Rubus</i> .....	13
3.2.2.	Genre <i>Syringa</i> .....	13
3.2.3.	Genre <i>Choisya</i> .....	14
3.2.4.	Genre <i>Cotinus</i> .....	15
3.2.5.	Approche statistique de la globalité des variétés introduites <i>in vitro</i> .....	15
3.3.	Optimisation de l'état sanitaire des souches au sein du laboratoire <i>in vitro</i> .....	16
3.3.1.	Traitements existants .....	16
3.3.2.	Traitements expérimentaux .....	16
<b>4.</b>	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>16</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>18</b>
<b>6.</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>21</b>
6.1.	Ouvrages.....	21
6.2.	Ressources en ligne .....	21

# Table des figures

Figure 1 : Photo du laboratoire <i>in vitro</i> d'ABJP.....	1
Figure 2 : Organigramme présentant un cycle de culture chez ABJP. ....	2
Figure 3 : Principe de réitération.....	2
Figure 4 : Pied mère et organisation structurale de <i>Rubus</i> 'MALLING PROMISE' .....	4
Figure 5 : Schémas représentant l'organisation structurale d' <i>Eriostemon myoporoïdes</i> .....	5
Figure 6 : Pied mère et organisation structurale de <i>Syringa</i> 'CALIFORNIA ROSE' .....	5
Figure 7 : Prélèvement d'explants sur <i>Cotinus</i> 'GRACE'. ....	6
Figure 8 : Taille de <i>Rubus</i> 'MALLING PROMISE' .....	6
Figure 9 : Schémas représentant l'organisation structurale du genre <i>Rubus</i> . ....	6
Figure 10 : Prélèvement d'explants de <i>Rubus</i> 'MALLING PROMISE'. ....	7
Figure 11 : Explant de <i>Pachystegia</i> 'DAIZEA'. ....	8
Figure 12 : Conséquences de la taille de <i>Rubus</i> 'HERITAGE' .....	9
Figure 13 : Conséquences de la taille de <i>Syringa</i> 'CALIFORNIA ROSE' .....	9
Figure 15 : Conséquences de la taille de <i>Cotinus</i> 'YOUNG LADY' .....	10
Figure 14 : Conséquences de la taille du Genre <i>Choisya</i> .....	10
Figure 17 : Graphique représentant les résultats des premières introductions <i>in vitro</i> des <i>Rubus</i> 'MALLING PROMISE' et 'HERITAGE' .....	11
Figure 16 : Résultats de l'introduction <i>in vitro</i> de <i>Rubus</i> 'MALLING PROMISE'. ....	11
Figure 18 : Résultats de l'introduction <i>in vitro</i> du <i>Syringa</i> 'NEIGE BRIANT' .....	12
Figure 19 : Graphique représentant les résultats des introductions <i>in vitro</i> du <i>Syringa</i> 'NEIGE BRIANT' ..	12
Figure 22 : Résultats de l'introduction <i>in vitro</i> de <i>Cotinus</i> 'YOUNG LADY' .....	13
Figure 21 : Graphique représentant les résultats des premières introductions <i>in vitro</i> des <i>Choisya</i> 'SNOW FLURRIES' et 'PINK BUD'. ....	13
Figure 20 : Résultats de l'introduction <i>in vitro</i> des <i>Choisya</i> 'PINK BUD' et 'SNOW FLURRIES'. ....	13
Figure 23 : Graphique représentant les résultats des premières introductions <i>in vitro</i> des <i>Cotinus</i> 'YOUNG LADY' et 'GRACE'. ....	14
Figure 25 : Histogramme représentant la répartition (sain ou contaminé) de tous les explants confondus en fonction de la juvénilité. ....	15
Figure 26 : Histogramme représentant la répartition (mort ou repris) de tous les explants confondus en fonction de la contamination ou non des explants. ....	15
Figure 24 : Histogramme représentant la répartition (prise ou non) des explants en fonction de la juvénilité. ....	15
Figure 27 : Organigramme représentant le modèle d'introduction <i>in vitro</i> à partir du matériel végétal de l'acclimatation. ....	16



## Table des tableaux

Tableau I : Recensement des variétés cultivées sur lesquelles sont effectuées les différents traitements et faisant parties du parc de pieds mère n°1.....	3
Tableau II : Recensement des variétés cultivées sur lesquelles sont effectuées les différents traitements et faisant parties du parc de pieds mère n°2.....	4
Tableau III : Composition du milieu MS BAP 0,5 pour un volume total d'un litre et un pH final de 5,8. ....	8



**Figure 1 : Photo du laboratoire *in vitro* d'ABJP** (situé sur le site de la Bouvinerie, source : <http://www.andre-briant.fr/pepiniere-briant/sites-hors-sol/>)

# Optimisation de la production de pousses juvéniles sur les pieds mères dans le but de faciliter l'introduction *in vitro*.

## 1. Introduction

### 1.1. Présentation de l'entreprise

#### 1.1.1. André Briant Jeunes Plants

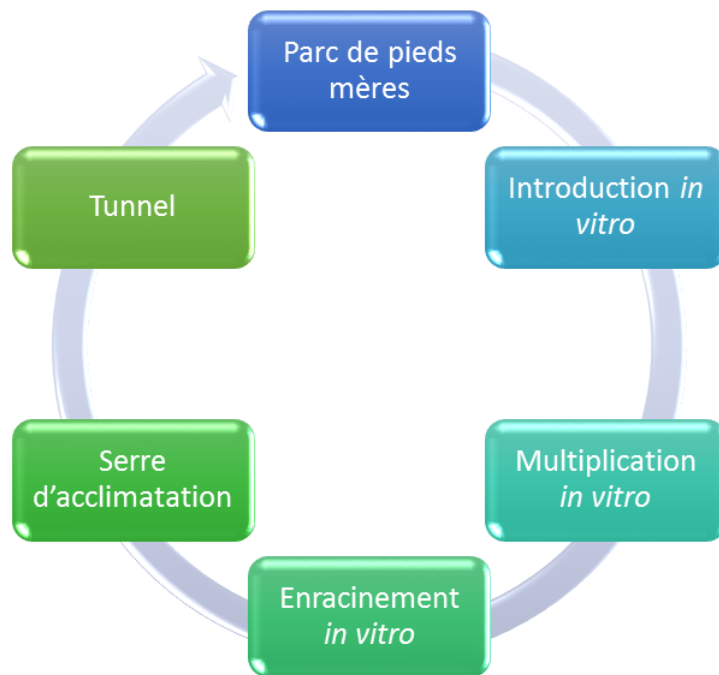
Les Pépinières Charles Briant sont fondées en 1933 à Angers. Elles sont reprises en 1960 par son fils, André Briant, et se développent progressivement. En 1965, André Briant décide de se spécialiser dans la multiplication, l'entreprise s'agrandit donc et acquiert des nouveaux terrains comme Tiercé (le site de production de la pleine terre). A partir de 1983, l'entreprise développe l'innovation variétale et l'exportation, elle est à cette époque le leader incontesté du marché des jeunes plants en France et devient un des leaders européens (<http://www.andre-briant.fr/>).

L'entreprise ABJP est devenue un généraliste du jeune plant de pépinière en ajoutant progressivement aux plantes ligneuses, des nouvelles gammes adaptées aux demandes du marché telles que les vivaces, les graminées, ou les fougères, en ne cessant de miser sur l'innovation. En effet, des contacts sont noués avec des obtenteurs à l'étranger pour introduire de nouvelles plantes intéressantes. Ces nouveaux sujets sont expérimentés suffisamment longtemps avant d'être ajoutés au catalogue (présentant actuellement autour de 1400 références), pour éviter de proposer des plantes qui ne se comporteraient pas correctement.

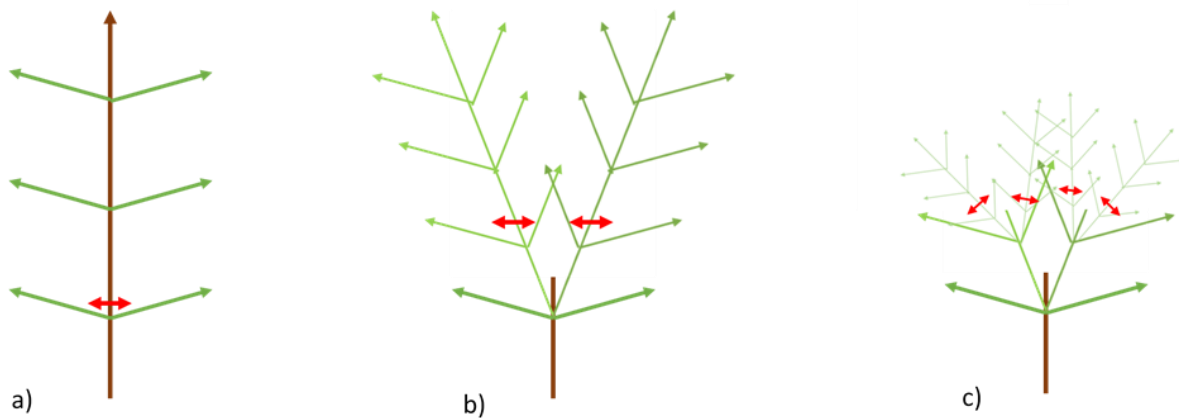
De 2006 à 2014, ABJP est rattachée au groupe Jardiland. Cependant, en 2014 le groupe Jardiland annonce vouloir se séparer de l'entreprise. C'est alors que Gilles Colinet, déjà propriétaire des pépinières Huchet depuis 2006, reprend en novembre 2014 les pépinières ABJP, en vue de relancer celles-ci en profitant de sa notoriété, de sa technicité et de son niveau de qualité. La clientèle sera désormais exclusivement les pépinières européennes d'élevage, et la société ne produira pas de plantes finies comme cela avait pu être le cas d'autres pépinières du groupe Jardiland. ABJP a du faire face à un marché européen en récession, et a donc vu ses ventes baisser de 10 à 15% par an depuis 2012. Le chiffre d'affaire était donc en 2016 de 7 millions d'euros par an, alors qu'il avait atteint les 10 millions auparavant. L'entreprise comprend 60 salariés auxquels s'ajoutent de nombreux saisonniers. La surface de production se répartie désormais sur cinq sites et représente 145 ha, dont 15 ha couverts et plus de 50 ha de pieds mères. De ce fait, l'entreprise est en mesure de fournir plus de 8 millions de boutures et d'effectuer 330000 greffes chaque année (Lien horticole n°965).

#### 1.1.2. Création du Laboratoire Angevin des Plantes

La culture *in vitro* (Figure 1) est une technique qui se développe chez ABJP depuis la création du laboratoire en 1998. Il n'y a alors plus besoin que d'un petit nombre de pieds-mères, et on obtient facilement des plants homogènes. Chez ABJP, ce sont 1,3 millions de plants d'origine *in vitro* étalés sur 180 variétés et 50 genres qui sont produits chaque année. Ce chiffre est atteint grâce au bouturage effectué à partir des 600000 plantes qui sortent directement du laboratoire.



**Figure 2 : Organigramme présentant un cycle de culture chez ABJP.**



**Figure 3 : Principe de réitération.** Les flèches vertes représentent les feuilles (un bourgeon se trouve à l'aisselle de chacune d'elle). Plus le vert est pâle et le trait fin, plus la pousse est juvénile. Les doubles flèches rouges montrent les têtes de coupe. a) Plant à un axe et trois niveaux de feuilles. b) Plant à deux axes de trois niveaux de feuilles. c) Plant à quatre axes de trois niveaux de feuilles. c) est plus ramifié et juvénile que b), lui-même plus ramifié et juvénile que a).

Par an, les *Rubus* représentent 82000 plantes une fois les bouturages effectués, ce qui correspond à 26000 plants directement produits au laboratoire. 100000 *Syringa* sont produits chaque années dans différents formats de godets ou en pleine terre, mais leur production au labo ne s'élève qu'à 34000 plantes. Donc à partir d'une plante issue du laboratoire, ABJP est capable d'en produire trois. Les *Choisya* représentent à eux seuls 280000 plants, dont 90000 issus du laboratoire. Leur multiplication est donc encore meilleure que celle des *Syringa*. Les *Albizia* représentent un total de 75000 plantes, les *Actinidia* atteignent les 95000 avec pour objectif sur l'année suivante d'en produire 120000. Au laboratoire, les *Cotinus* ne représentent que 17000 plants, de plus, leur multiplication est difficile. En effet, compte tenu du temps disponible pour les produire, il n'est possible de faire qu'une seule bouture, soit une production finale de 35000 plants. Les *Nandina*, de par leur structure particulière, ne peuvent pas être bouturés. Ils sont donc exclusivement produits *in vitro* à hauteur de 140000 plants par an. Enfin, l'*Eriostemon myoporoides*, seul représentant de son genre, représente tout de même 30000 plants par an.

Depuis juillet 2016, le laboratoire *in vitro* jusque la partie intégrante d'ABJP, est devenu la société à responsabilité limitée le Laboratoire Angevin des Plantes (LAP), avec toujours à sa tête M. Colinet. Les plants produits rapidement *in vitro* passent ensuite dans la serre d'acclimatation au sein de laquelle ils continueront leur croissance (Figure 2).

## 1.2. Objectifs du stage

L'objectif principal est de mettre en place un protocole (taille : date et type, fertilisation, arrosage) permettant, soit de conserver au cours de l'année des pieds mères présentant du matériel utilisable pour l'initiation *in vitro*, soit d'opérer des manipulations clairement définies afin d'obtenir rapidement des pousses juvéniles qui seront exploitables *in vitro*. Dans les deux cas, l'intérêt est de pouvoir répondre à tout problème de dégradation d'une souche au laboratoire dans les plus brefs délais, afin de relancer rapidement la production de la variété concernée. Ce stage vise à simplifier les prochaines introductions de cultures *in vitro* chez ABJP, ainsi qu'à optimiser le temps et l'espace consacré au parc de pieds mères.

## 1.3. Etat de la littérature

### 1.3.1. Principe de réitération et obtention de pousses juvéniles

Les plantes ornementales appartiennent à la famille des ligneux ou semi-ligneux, lorsque celles-ci sont matures, elles présentent donc un haut niveau de différenciation tissulaire. Cet état lignifié est associé à une réduction de la potentialité de rhizogénèse. *A contrario*, les tissus embryonnaires, correspondant au stade le plus extrême de juvénilité, présentent eux un enracinement facile. Il est également connu que les tissus proches des organes reproducteurs (fleurs) bénéficient de l'influence de la rejuvénilation, de par le processus de formation des gamètes mâles et femelles. Ce processus de rejuvénilation n'est possible que grâce à la capacité des tissus végétaux à se dédifférencier (Galopin et Beaujard, 1998).

En 1998, Galopin et Beaujard introduisent la notion de « principe de réitération » (Figure 3). Ils remarquent en effet en travaillant sur le genre *Hydrangea*, que lorsque l'on opère une taille au-dessus du premier niveau de feuilles (sur une plante présentant trois niveaux de feuilles), on observe un démarrage des deux bourgeons

**Tableau I :** Recensement des variétés cultivées sur lesquelles sont effectuées les différents traitements et faisant parties du parc de pieds mère n°1.

Famille	Genre	Espèce	Variété	Nom vernaculaire
<b>Agavaceae</b>	Phormium		pink stripe	Lin de Nouvelle-Zélande
<b>Anacardiaceae</b>	Cotinus		royal purple	Fustet ou arbre à perruque
	Cotinus		young lady	
<b>Astéracées</b>	Pachystegia	insignis	daizea	Marguerite de Nouvelle Zélande
<b>Berberidaceae</b>	Nandina	domestica	fire power	Bambou sacré
	Nandina	domestica	gulf stream	
	Nandina	domestica	obsessed	
	Nandina	domestica	wood's dwarf	
<b>Betulacées</b>	Betula	pendula	purpurea	Bouleau
	Betula	utilis	doorenbos	
<b>Caprifoliacées</b>	Sambucus	nigra	black tower eiffel	Sureau
	Sambucus	racemosa	sutherland gold	
<b>Hydrangeaceae</b>	Hydrangea	aspera	villosa	Hortensia
	Hydrangea	semiola	inovalaur	
<b>Mimosacées</b>	Albizia	julibrissin	ombrela	Albizia ou Arbre à soie
	Albizia	julibrissin	rouge de tuilière	
	Albizia		summer chocolate	
<b>Moracées</b>	Morus	platanifolia	fruitless	Murier platane
<b>Oléacées</b>	Syringa	vulgaris	prince wolkonsky	Lilas
	Syringa	hyacinthiflora	california rose	
	Syringa	Hyacinthiflora	maiden's blush	
	Syringa	Hyacinthiflora	neige briant	
	Syringa	hyacinthiflora	pocahontas	
<b>Rosacées</b>	Amelanchier		obelisk	Amélanchier
	Rubus	idaeus	autumn bliss	Framboisier ou Ronces
	Rubus	idaeus	fallgold	
	Rubus	idaeus	héritage	
	Rubus	idaeus	mallng promise	
	Rubus	idaeus	zeva	
<b>Rutacées</b>	Choisya	ternata	sundance	Choisya
	Choisya		pink bud	
	Eriostemon	myoporoides		Eriostemon
<b>Salicacées</b>	Populus	tremula	erecta	Peuplier tremble
<b>Thymelaeaceae</b>	Daphne	odora	aureomarginata	Daphné
	Daphne	odora	perfume princess	
	Daphne	odora	sweet amethyst	
	Daphne	Transatlantica	eternal fragrance	
	Daphne	transatlantica	Spring Pink Eternal Fragrance	
<b>Verbenacées</b>	Caryopteris		grand bleu	Caryopteris

axillaires situés à l'aisselle de chacune des feuilles restantes. Ils ont ensuite répété l'opération sur les deux jeunes pousses issues des bourgeons axillaires, c'est-à-dire une taille au-dessus du premier niveau de feuilles. Ils notent alors que les nouvelles pousses issues de cette seconde taille sont plus juvéniles que les pousses précédentes. Cela est remarquable par l'aspect cotylédonaire des nouvelles feuilles qui se développent. En effet, l'état de juvénilité se définit notamment par une forte capacité d'enracinement des boutures, une grande vigueur, mais surtout par son aptitude à la ramification spontanée et sa faible aptitude à la floraison (Galopin et Beaujard, 1998).

### 1.3.2. Culture *in vitro*

Pour exploiter au mieux la culture *in vitro*, il est essentiel de prendre connaissance des besoins en divers minéraux et hormones des végétaux. Les phytohormones interviennent tout le long de la vie d'une plante, leurs effets peuvent être semblables ou antagonistes. Il est bon de se rappeler que les principaux régulateurs de croissance (AUX, CK, GA, ABA, ETH, JA, BR, STR) interagissent pour produire un effet physiologique final. Les AUX et les CK sont considérées comme les hormones les plus importantes concernant la régulation de la croissance et de l'organisation cellulaire. À noter cependant que la réponse des cellules, tissus, et organes à ces hormones peut varier en fonction des conditions de culture, du type d'explant introduit, et bien entendu du génotype de la plante (Gaspar et al, 1996).

### 1.3.3. Les auxines

Les auxines (structures en Annexe I) interviennent au cours de l'élongation cellulaire, de l'acidification des parois cellulaires, de l'initiation des divisions cellulaires ou encore au niveau de l'organisation des méristèmes en tissus non organisés (cal) ou organisés comme les racines. Au sein des tissus organisés, cette hormone est connue pour maintenir la dominance apicale, induire la formation de racines et retarder la sénescence. La plus communément retrouvée au sein des plantes est l'IAA, bien que sa concentration au sein d'un individu ne dépende de l'espèce, de l'âge de la plante et des conditions de croissance. Dans les cultures, l'IAA peut également être employée sous forme conjuguée (avec des alcools, des AA ou des sucres), ce qui protège la molécule du stress oxydatif et stabilise le niveau d'auxine libre dans la plante (Gaspar et al, 1996). Pour les entreprises, l'IAA et l'IBA peuvent être préparées de façon synthétique pour être intégrées dans les milieux de culture. Ces composés sont généralement dénaturés dans le milieu et rapidement métabolisés par les plantes, ce qui a tendance à favoriser la formation de cals et de tiges (Maeda et Thorpe, 1979, cités par Gaspar et al, 1996).

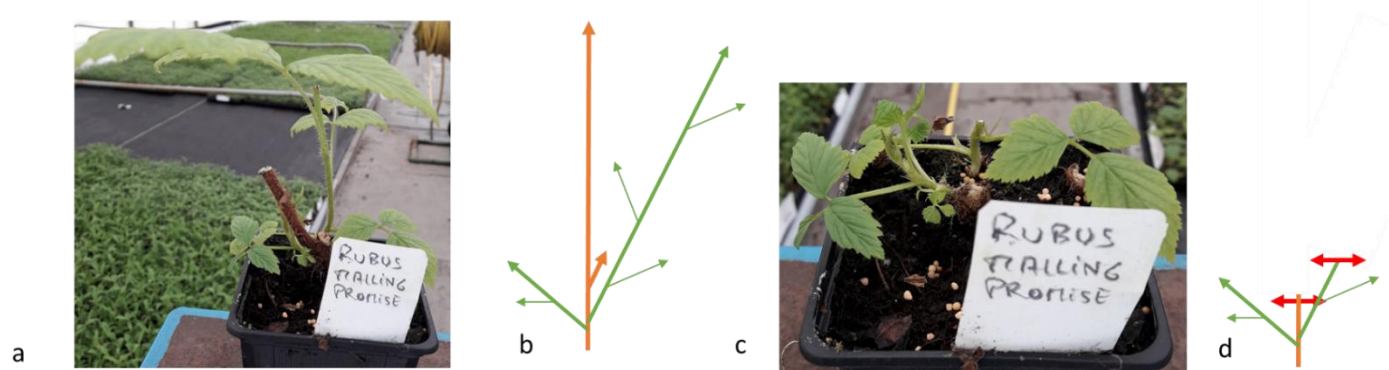
### 1.3.4. Les cytokinines

L'intérêt d'employer des CK (structures en Annexe II) dans les milieux de culture, est qu'elles favorisent la division cellulaire et inhibent la dormance des bourgeons latéraux. Parmi les CK naturelles qui peuvent être utilisées en laboratoire, on retrouve entre autre la zéatine. Par ailleurs, il existe des régulateurs de croissance qui agissent de façon similaire aux CK comme la kinétine ou la BAP (Gaspar et al, 1996). Une étude affirme que ces deux derniers régulateurs de croissance améliorent le taux de survie des explants, et favorisent la croissance des bourgeons et des feuilles. D'un autre côté, la zéatine permettrait le débourrement d'un plus grand nombre de bourgeons par explant, ainsi que des pousses plus vigoureuses avec des feuilles bien vertes. Malgré ses propriétés, la zéatine reste peu utilisée par les entreprises du fait de son coût très élevé. Elle est



**Tableau II :** Recensement des variétés cultivées sur lesquelles sont effectuées les différents traitements et faisant parties du parc de pieds mère n°2.

Famille	Genre	Espèce	Variété	Nom vernaculaire
<b>Actinidiacées</b>	Actinidia	deliciosa	hayward ♀	Kiwi
	Actinidia	deliciosa	hayward <i>sofruileg</i>	
	Actinidia	deliciosa	solissimo	
	Actinidia	deliciosa	solo ♂♀	
	Actinidia	deliciosa	tomuri ♂	
<b>Anacardiaceae</b>	Cotinus	x	young lady	Fustet ou arbre à perruque
	Cotinus	x	grace	
<b>Hydrangeaceae</b>	Hydrangea	paniculata	pink diamond	Hortensia
	Hydrangea	quercifolia	alice	
	Hydrangea	quercifolia	snow queen	
	Hydrangea	quercifolia	snowflake	
<b>Lamiacées</b>	Lavandula	angustifolia	grosso	Lavande
<b>Malvacées</b>	Lavatera	thuringiaca	white angel	Lavatère
<b>Oléacées</b>	Syringa	vulgaris	amethyst	Lilas
<b>Oléacées</b>	Syringa	x	lavender lady	
<b>Oléacées</b>	Syringa	x	rosenrot	
<b>Oléacées</b>	Syringa	x	ruhm von horstenstein	
<b>Rosacées</b>	Prunus	incisa	kojo no mai	Cerisier à fleur nain du Japon
<b>Rutacées</b>	Choisya	ternata	snow flurries	Choisya
<b>Rutacées</b>	Choisya	ternata	aztec gold	
<b>Rutacées</b>	Choisya	ternata	aztec pearl	
<b>Rutacées</b>	Choisya	ternata	goldfinger	
<b>Rutacées</b>	Choisya	ternata		
<b>Rutacées</b>	Eriostemon	myoporoides		Eriostemon
<b>Thymelaeaceae</b>	Edgeworthia	chrysantha		Buisson papier



**Figure 4 : Pied mère et organisation structurale de *Rubus* 'MALLING PROMISE'** a) Photo d'un plant avant la taille. b) Schéma représentant l'organisation structurale avant la taille. c) Photo d'un plant après la taille. d) Schéma représentant l'organisation structurale après la taille. Les traits oranges représentent les parties lignifiées, les traits verts les parties non lignifiées, la double flèche rouge montre la taille.



cependant nécessaire à l'introduction *in vitro* de certaines plantes, comme le genre *Vaccinium* (Silva et al, 2006 et Debnath & Mcrae, 2002, cités par Oliveira et al, 2010). De nombreux aspects de la croissance cellulaire, de la différenciation et de l'organogénèse sont régulés par l'interaction entre les AUX et les CK. Il est alors important d'être vigilant quant aux quantités de chacune de ces phytohormones que l'on apporte au milieu, car l'AUX peut inhiber l'accumulation de CK, et inversement, les CK peuvent inhiber l'action de l'AUX (Gaspar et al, 1996).

Après des années de mise au point de la technique *in vitro*, il a été constaté notamment chez ABJP, qu'en absence de BAP il y a induction de l'enracinement, ainsi qu'un ralentissement de la multiplication. C'est d'ailleurs pour cela qu'en fin de cycles, les milieux dits « d'enracinement » sont généralement supplémentés d'AUX, voire même dépourvus d'hormones.

## 1.4. Stratégie permettant d'obtenir de meilleurs résultats en introduction *in vitro*

### 1.4.1. Moyens disponibles

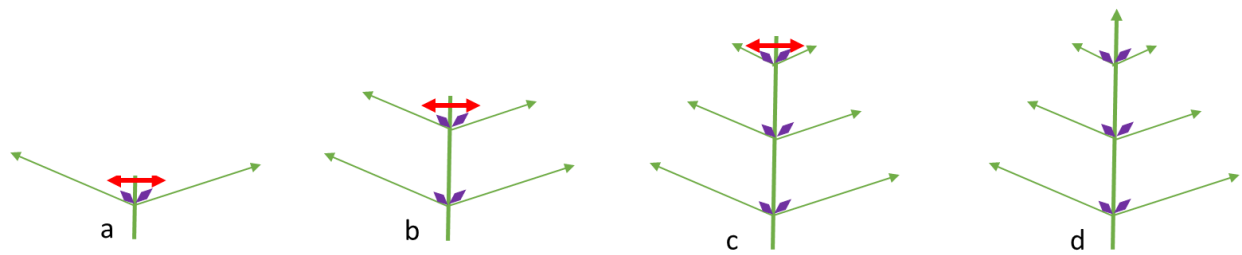
Le premier avantage à la culture *in vitro* est l'obtention rapide d'un grand nombre de plantes (cycle de l'ordre du mois au lieu de l'année). Il est en effet possible avec cette technique d'obtenir un jeune plant en 4 à 5 semaines de culture. Grâce à la méthode de culture *in vitro*, qui met en place de nombreuses précautions d'hygiène, il est plus aisé de faire face aux problèmes d'ordre sanitaire, tels que les infestations par des ravageurs de type cochenille, pucerons etc. Enfin, il a également été observé une obtention facilitée d'un port trapu chez les plantes (très recherché en ornement) car la ramification est facilitée (informations fournies par Dominique Ménard).

### 1.4.2. Contraintes

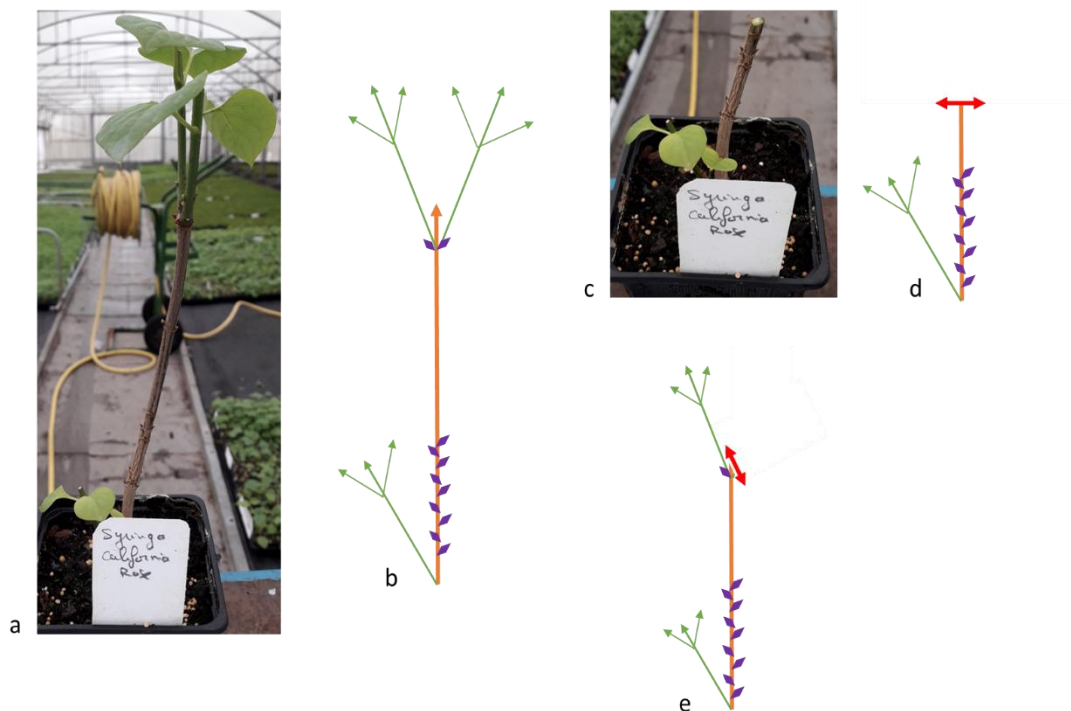
Les difficultés de cette technique sont en partie liées à sa fragilité. Le passage du laboratoire à la serre d'acclimatation peut être délicat, car les plantes sont transférées dans un environnement où les micro-organismes sont présents en plus grande quantité. De plus, elles doivent passer de l'hétérotrophie à l'autotrophie (elles doivent produire leur propre matière carbonée), elles vont devoir développer des racines pour puiser les éléments, ainsi que s'adapter aux changements de température, de lumière ou encore d'humidité, qui sont moins contrôlés qu'au sein du laboratoire.

Par ailleurs, au LAP on dénombre environ 180 variétés multipliées *in vitro*. Cela implique un nombre de milieux de culture considérable, car à chaque plante requiert son propre équilibre hormonal, minéral etc. Il est également nécessaire de compléter le milieu en sucre, car les explants sont incapables de faire de la photosynthèse, notamment parce qu'ils se retrouvent enfermés dans des boîtes où la concentration en CO<sub>2</sub> est insuffisante pour faire tourner l'enzyme RUBISCO (Ribulose 1,5 bis phosphate carboxylase oxygenase).

Enfin, cette technique n'est possible que si l'on a des pieds mères à sa disposition : ceux-ci constituent une ressource en explants (bourgeons axillaires ou terminaux) qui permet l'introduction d'une variété en culture *in vitro*. C'est ici que se pose la principale difficulté. Les pieds mères sont envoyés à l'entreprise par ses clients



**Figure 5 : Schémas représentant l'organisation structurale d'*Eriostemon myoporoides*.** a) Taille au-dessus du premier niveau de feuilles. b) Taille au-dessus du second niveau de feuilles. c) Taille au-dessus du troisième niveau de feuilles (taille des têtes) d) Pas de taille. La double flèche rouge montre la taille, les losanges violets sont les bourgeons.



**Figure 6 : Pied mère et organisation structurale de *Syringa* 'CALIFORNIA ROSE'** a) Photo d'un plant avant la taille. b) Schéma représentant l'organisation structurale avant la taille. c) Photo d'un plant après la taille de type 1 (basse). d) Schéma représentant l'organisation structurale après la taille 1. e) Schéma représentant l'organisation structurale après la taille de type 2 (haute). Les traits oranges représentent les parties lignifiées, les traits verts les parties non lignifiées, la double flèche rouge montre la taille, les losanges violets sont les bourgeons.

sous différents formats, l'état des plantes est donc variable en terme d'âge des tissus et de degré de lignification, en revanche, pour permettre l'introduction *in vitro*, il est mieux de disposer de matériel végétal relativement juvénile. A l'arrivée d'une nouvelle variété il est donc généralement nécessaire de pratiquer diverses opérations pour remettre le pied mère dans l'état souhaité.

## 2. Matériel et Méthodes

### 2.1. Création du parc de pieds mères

#### 2.1.1. Nettoyage des pieds mères

Afin de commencer l'étude dans les meilleures conditions, le parc de pieds mères existant (Tableau I) a été nettoyé : démaoussage (notamment pour éliminer le *Marchantia* qui étouffe les plants), taille superficielle dans le but de réduire la végétation pour empêcher les plantes de s'envahir les unes les autres, et élimination des plantes trop affaiblies pour être exploitées. A noter que ce parc de PM se trouve sous un tunnel et bénéficie donc de conditions plus favorables que s'ils étaient placés en extérieur.

En parallèle de ce parc de PM, nous avons mis en place un nouveau parc exclusivement constitué de jeunes pousses (Tableau II), la plupart ne présentant encore aucune partie lignifiée. Ces pousses, tout droit sorties de la serre d'acclimatation, présentent des bourgeons issus de l'année n, à la différence des pieds mères du premier parc, qui présentent eux des bourgeons de l'année n-1, voire n-2.

Le but étant de comparer la capacité d'un parc de PM que l'on pourrait qualifier de mature, à fournir du matériel exploitable *in vitro*, par rapport à un parc reconstitué chaque année à partir des jeunes plants qui sortent de la serre d'acclimatation. Il est tout de même nécessaire de relativiser et de garder à l'esprit que ce que nous considérons ici comme étant mature par rapport aux plants tout juste sortis de l'acclimatation, reste tout de même des plants jeunes qui n'ont en fait que quelques mois, ou au maximum une à deux années.

#### 2.1.2. Variétés travaillées

Les deux parcs de pieds mères réunis contiennent une soixantaine de variétés différentes. Certaines sont représentées dans les deux parcs, mais à des stades de croissance différents. Cela va nous permettre de comparer au sein d'une même variété, l'influence de la juvénilité sur la croissance *in vitro*.

Certains genres sont fortement représentés comme les *Rubus*, les *Syringa* ou encore les *Choisya*. Les *Rubus* sont des plantes ligneuses et épineuses de la famille des Rosacées comprenant notamment les framboisiers (à ne pas confondre avec les *Morus* de la famille des Moracées). Les *Rubus* forment généralement des arbrisseaux à port sarmenteux à souche vivace ligneuse. Les *Syringa*, plus connus sous le nom de Lilas, sont des Oléacées qui forment des arbustes à feuilles caduques simples. Les *Choisya* ou Orangers du Mexique, quant à eux, appartiennent aux Rutacées et forment des buissons aromatiques au feuillage persistant vert ou jaune selon les variétés (J. Briant, 2001).

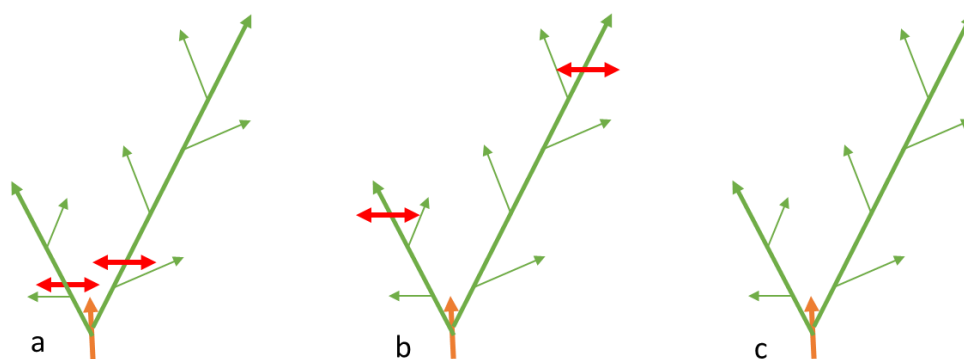
Mais on retrouve également les genres *Albizia*, *Actinidia*, *Cotinus*, *Nandina* ou encore *Eriostemon*. Les *Albizia* sont également connus sous le nom d'arbres à soie et regroupent une centaine d'espèces caduques. Les *Actinidia* sont des plantes caduques originaires d'Asie. La plupart des variétés étant dioïques, des pieds



**Figure 7 : Prélèvement d'explants sur *Cotinus* 'GRACE'.** a) Plante avant le prélèvement des explants, le carré jaune est agrandi en b) Portion du plant sur lequel on a prélevé des explants dont la taille est montrée par le rectangle rouge. c) Plant suite au prélèvement, deux niveaux de feuilles sont laissés, la flèche rouge montre un bourgeon jusque-là réprimé par l'apex.



**Figure 8 : Taille de *Rubus* 'MALLING PROMISE'** a) Photo d'un plant suite au prélèvement d'explants destinées à l'initiation *in vitro*. b) Photo du même plant auquel on n'a laissé qu'une seule tige. Les doubles flèches rouges représentent les lieux de taille pour prélever les explants, les flèches jaunes montrent la tige conservée.



**Figure 9 : Schémas représentant l'organisation structurale du genre *Rubus*.** a) Taille au-dessus du premier niveau de feuilles. b) Taille des têtes uniquement. c) Pas de taille.

mâles et femelles sont nécessaires à la fructification. Les pieds femelles sont alors capables de fournir des fruits ovoïdes, brun verdâtre à peau duveteuse : les kiwis. Le genre *Cotinus* réunit des espèces caduques connues pour leurs inflorescences en panache. Les *Nandina*, originaires d'Asie, présentent un faux air de bambou nain à feuilles persistantes. Leurs feuilles sont vertes teintées de rouge au moment du débourrement, puis deviennent ocres et pourpres. Enfin, *Eriostemon* est un arbuste australien au port naturellement compact et arrondi. Son feuillage vert foncé est persistant et dense, il est apprécié pour sa longue floraison qui dégage un parfum rappelant la fleur d'Oranger (J. Briant, 2001). La liste des différentes variétés ainsi que leur nom vernaculaire est présentée en Tableau I. Le temps de reprise de la végétation variant d'une variété à l'autre, les introductions de culture seront étalées sur plusieurs semaines car il est nécessaire d'attendre que suffisamment de matériel se soit développé depuis la taille. Les genres *Rubus*, *Cotinus*, *Choisya* et *Syringa* se développant rapidement, ce seront les variétés qui seront introduites les premières.

### 2.1.3. Tailles des pieds mères

Dans cette partie de l'étude, nous cherchons à comparer l'état physiologique et l'organisation structurale de nos pieds mères en fonction de différents types de tailles. L'analyse consistera en des observations de l'architecture de divers pieds mères. Au vu des aspects très différents des plants au sein d'une même variété, nous ne prendrons pas de mesures, mais nous mettrons en avant la façon dont répondent les plantes à la première et la seconde taille (ramification, rejets etc).

#### a) Premières tailles

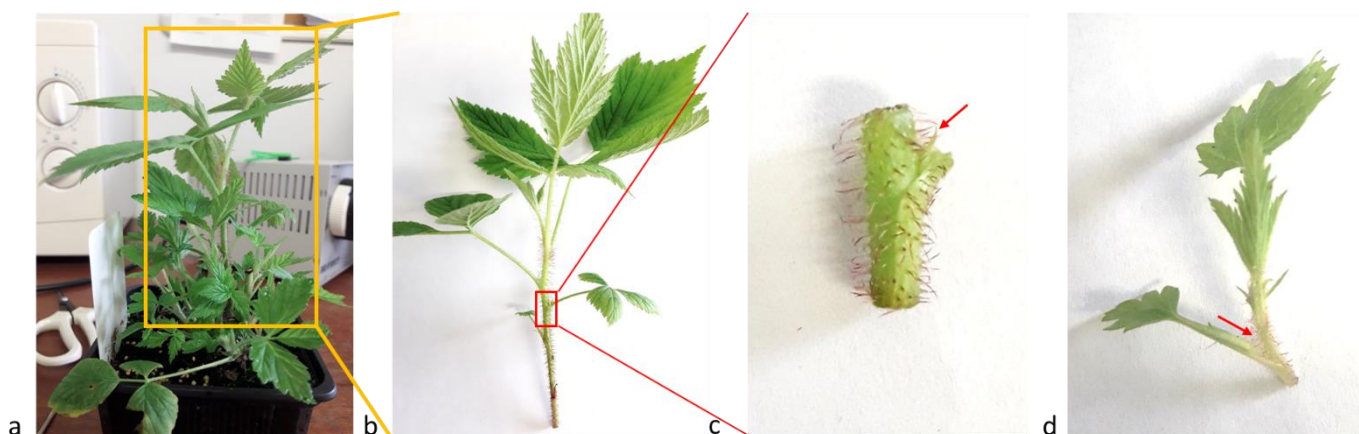
Nous avons ensuite effectué des tailles cette fois-ci stratégiques (semaine 15) dans le but de favoriser le débourrement des bourgeons dormants, et donc la croissance de pousses juvéniles. Pour la majorité des variétés, la taille correspond simplement à une suppression de l'apex de la plante, dans d'autres cas il est possible de supprimer également des parties lignifiées. Enfin, dans le cas par exemple des *Rubus* (Figure 4), une taille à ras des parties lignifiées est favorable au débourrement de nombreux bourgeons et à la croissance de rejets.

Au niveau du jeune parc de PM, *Eriostemon myoporoides*, de par son organisation structurale très régulière d'un plant à l'autre, nous permet de faire des essais de tailles variées. Sur les huit plants disponibles, deux plants sont taillés au premier niveau de feuilles, deux autres au second, deux au niveau des têtes, et les deux derniers ne sont pas taillés (Figure 5). L'évolution de ces plants d'*Eriostemon* est présentée en Annexe III.

#### b) Secondes tailles

A la suite de la première taille qui se voulait peu sévère, nous avons pratiqué des nouvelles tailles en semaine 19 sur le genre *Syringa*. Nous avons en effet effectué des tailles hautes (figure 6e) sur six des huit plants pour chaque variété, et des tailles basses (figures 6c et 6d) sur les deux autres plants. En taillant peu sévèrement, nous nous assurons de voir démarrer les points végétatifs qui semblaient évidents. En suivant l'évolution des *Syringa* nous avons réalisé que certains bourgeons, qui pouvaient paraître latents, ont débourrés eux aussi. C'est pour cela que nous sommes cette fois-ci passés sur une taille basse pour l'ensemble des plants. Sur le même principe, les *Sambucus* ont également été rabaissés. Sur certaines variétés de





**Figure 10 : Prélèvement d'explants de *Rubus* 'MALLING PROMISE'.** a) Plante avant prélèvement, le cadre jaune montre le tronçon qui va être prélevé et est agrandi en b) Tronçon prélevé sur lequel un explant est encadré en rouge et agrandi en c) Explant (coupe au-dessus et au-dessous de l'aisselle d'une feuille), la flèche rouge montre le bourgeon axillaire dormant. d) Explant juvénile, la flèche rouge montre là où est censé se trouver le bourgeon axillaire.

*Choisya*, comme 'GOLDFINGER', ou encore chez les *Cotinus* avec la variété 'GRACE', il a été nécessaire de tailler au-dessus du premier ou second niveau de feuilles (figure 7), ou au niveau des têtes pour permettre le débourrement des bourgeons axillaires. Pour le genre *Rubus*, il a été décidé que suite à une introduction *in vitro*, nous ne conserverions qu'une seule tige sur laquelle des explants ont été prélevés, le reste est taillé à ras aux ciseaux (figure 8). Sur les six plants restants après que deux aient été utilisés pour les initiations, nous avons opéré de nouvelles coupes pour observer l'influence de la hauteur de la taille sur le développement de pousses juvéniles : deux plants ont été taillés au-dessus du premier niveau de feuilles, sur deux plants nous avons uniquement taillé les têtes, enfin les deux derniers ne sont pas taillés (figure 9).

Les *Daphnés* n'avaient jusque-là pas été taillés car leur état ne le permettait pas. Nous pouvons maintenant effectuer une taille des têtes et des fleurs dans le cas où il y en aurait.

#### 2.1.4. Fertilisation

Dans le but d'aider nos plantes à redémarrer après les tailles qui peuvent être traumatiques, nous avons choisi d'appliquer l'engrais TopDress (fiche technique en Annexe IV). L'Osmocote TopDress est un engrais enrobé qui a été spécialement mis au point pour le surfaçage des plantes en pépinières hors-sol. Il contient du NPK et du magnésium ainsi que tous les oligoéléments essentiels. Il peut être utilisé pour obtenir un reverdissement rapide ou pour corriger des symptômes de carences. Sa version FT (Fusion Technology) contient un composant spécial permettant à l'engrais de « coller » au substrat après son application. Cela signifie qu'il n'y a aucune perte de granules si les pots sont renversés.

Cet engrais doit être utilisé à 2g/L. Nous déterminons donc la quantité nécessaire pour fertiliser le parc de PM de la façon suivante :

$$\text{nombre de plaques} \times \text{nombre de godets/plaque} \times \text{volume d'un godet} \times 10^{-3} = \text{engrais g/L}$$

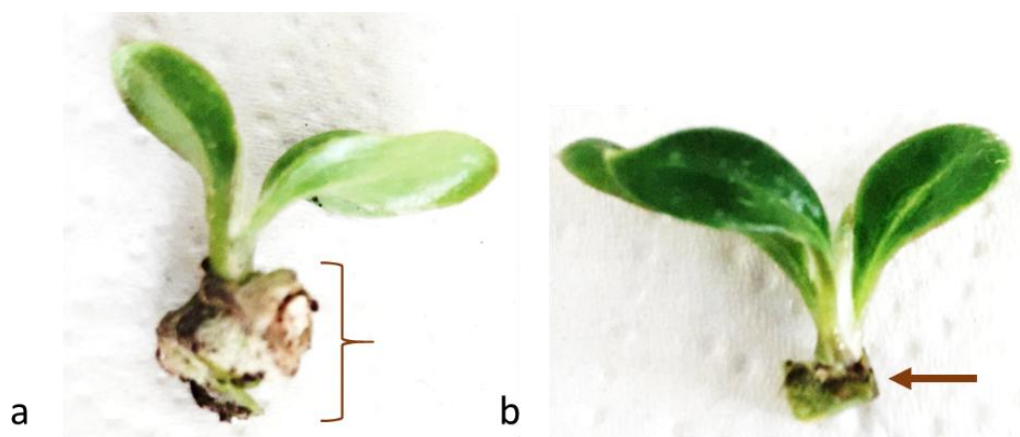
Les godets classiques sont de dimension 9cm x 9cm x 8cm, ce qui équivaut à un volume de 648 cm<sup>3</sup>, soit 0,648 L. L'avantage de cet engrais est qu'il est sous forme de grains très fins (1,0-2,5mm), et donc sa dispersion est aisée, les billes se répartissent de façon homogène sur toute la surface à fertiliser. Il est nécessaire d'arroser la culture suite à la fertilisation pour faire tomber l'engrais des feuilles qui pourrait entraîner des brûlures.

## 2.2. Introductions de culture *in vitro*

La culture *in vitro* vise à produire rapidement une très grande quantité de jeunes plants, ceux-ci devant être de bonne qualité physiologique mais également sanitaire. Au sein du laboratoire, les jeunes plantes sont stockées dans des chambres de culture à photopériode et température contrôlée : la période de jour est mimée grâce à des néons de 17H à 9H (pour un souci d'économie, l'électricité étant moins chère la nuit), et les néons sont éteints de 9h à 17H pour mimer la nuit. Les plantes sont donc soumises à 16H de nuit et 8H de jour. Enfin, la température des chambres doit être maintenue à 22°C (+/- 2°C).

#### 2.2.1. Prélèvement du matériel végétal

Pour initier la culture *in vitro* d'une nouvelle variété, la technique générale consiste à prélever un certain nombre de bourgeons sur les plantes mères. Le prélèvement des bourgeons est à adapter à chaque espèce en fonction de l'anatomie de la plante, même si le principe reste fondamentalement le même : on prélève un



**Figure 11 : Explant de *Pachystegia* 'DAIZEA'.** a) Explant juvénile, l'accolade marron montre la partie lignifiée sur laquelle s'est développée la pousse juvénile. b) Explant juvénile, la flèche marron montre la partie lignifiée restante après le découpage au scalpel.

**Tableau III :** Composition du milieu MS BAP 0,5 pour un volume total d'un litre et un pH final de 5,8.

<b>Minéraux</b>	FeNaEDTA	10 ml
	Macros éléments	40 ml
	CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	40 ml
	Micros éléments	1 ml
<b>Vitamines</b>		10 ml
<b>Sucres</b>	Saccharose	30 g
<b>Divers</b>	Agar	6 g
<b>Produit phytosanitaire</b>	PPM	0,5 ml
<b>Hormones</b>	BAP (6-benzylaminopurine)	0,5 mg



tronçon d'environ 1cm que l'on a sectionné juste sous un nœud et juste au-dessus de ce même nœud (figure 10b). De cette façon, on a prélevé le bourgeon (parfois invisible) qui se trouve inéluctablement à l'aisselle d'une feuille (figures 10c et d). Il faut prendre soin de couper le pétiole de la feuille le plus près possible du bourgeon sans léser celui-ci. Le but est de ne garder que le matériel végétal strictement nécessaire à la croissance d'une nouvelle plante, car plus la surface végétale mise en culture est importante, plus le risque de contamination par des bactéries, champignons et autres insectes tels que les thrips est important. C'est pourquoi, sur les plantes qui le permettent, nous incisons la tige de sorte à ne garder que le bourgeon (cas du Bambou du genre *Fargesia*).

Lors du prélèvement, l'idéal est de pouvoir prendre du matériel suffisamment juvénile pour redémarrer rapidement sur le milieu de culture, mais suffisamment résistant pour survivre aux désinfections et au prélèvement (figure 10c).

Pour cette étude, nous introduirons dix explants par essais. Nous ne pouvons malheureusement pas en introduire plus, car nous sommes limités par la quantité de matériel végétal disponible. Au moment du premier repiquage, c'est-à-dire environ trois semaines après l'introduction, nous déterminerons le nombre d'explants ayant redémarrés, parmi lesquels nous distinguerons ceux étant sains et ceux étant contaminés (champignons ou bactéries). Nous comptabiliserons également le nombre d'explants non redémarrés de la même façon, et nous conterons également parmi eux, ceux qui ont été brûlés par l'hypochlorite de sodium (Annexe IV). Enfin, à partir du nombre d'explants sains et ayant redémarrés, en sachant que nous démarrons à partir de dix explants, nous pourrions déterminer un taux de multiplication :

$$\text{Taux de multiplication} = \frac{\text{nombre d'explants redémarrés}}{\text{nombre d'explants au départ}}$$

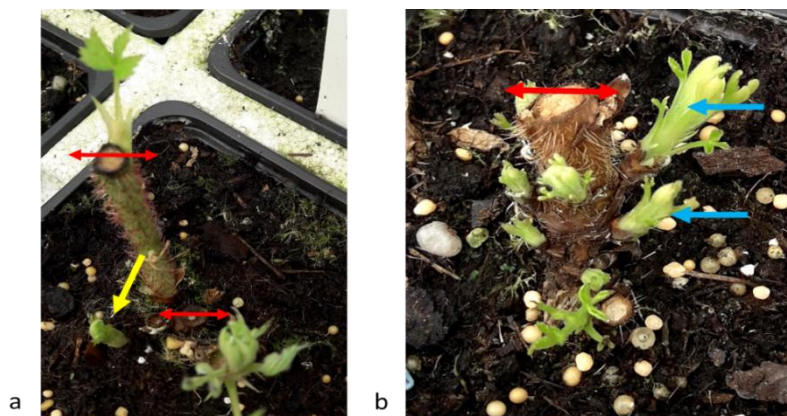
## 2.2.2. Optimisation de l'état sanitaire des souches au sein du laboratoire *in vitro*

### a) Traitements existants

Les plantes mères - du fait de leur état mature - possèdent un microbiote très développé que l'on ne souhaite pas introduire dans les cultures *in vitro*. Diverses méthodes sont donc mises en œuvre pour réduire au maximum les populations bactériennes, fongiques et autres ravageurs avant de déposer les explants sur les milieux de culture.

Tout d'abord, avant chaque prélèvement d'explant sur une nouvelle variété, les outils sont désinfectés au désinfectant de surface pour éviter de propager des pathogènes d'une plante à une autre. Ils sont ensuite placés dans des boîtes stériles, puis transportés dans le laboratoire *in vitro* (car le prélèvement sur les plantes mères se fait à l'extérieur du laboratoire).

L'objectif étant de limiter les diverses contaminations (Annexe V), chaque initiation de culture *in vitro* se fait sous une hotte à flux laminaire, préalablement désinfectée au désinfectant de surface contenant de l'éthanol, du chlorure de didécyldiméthylammonium ainsi que du chlorhydrate de polyhexaméthylène biguanide. Ce produit est utilisé pour ses propriétés bactéricide, levuricide, fongicide et virucide. Les contenants des désinfectants ainsi que le stérilisateur à billes de quartz sont également nettoyés. Les accessoires (pinces, scalpel et portoir) ont été passés à l'autoclave, mais sont tout de même à nouveau stérilisés dans le stérilisateur à billes (1 minute à 250°C). Les explants peuvent être déposés sur un plateau lui aussi passé à



**Figure 12 : Conséquences de la taille de *Rubus* 'HERITAGE'** a) Plant duquel un rejet a démarré suite à la première taille (flèche jaune). b) Plant sur lequel de nombreux bourgeons dormants ont débouffés (flèches bleues). Les doubles flèches rouges indiquent la taille. Les photos ont été prise 3 jours après la taille.



**Figure 13 : Conséquences de la taille de *Syringa* 'CALIFORNIA ROSE'**. a)b)c) Photos prises 15 jours après la première taille (haute pour a) et c), basse pour b)). Les doubles flèches rouges indiquent la taille, les flèches bleues montrent des bourgeons ayant débouffés, les flèches pointillées rouges montrent des bourgeons dormants, les flèches jaunes montrent des rejets. d) Photo prise 22 jours après la taille haute. e)f)g) Photos prises 24 jours après la taille, haute pour e), basse dans un second temps pour f), et basse dès la première taille pour g).

l'autoclave, sur lequel on dépose tout d'abord une feuille de papier sulfurisé (pour imperméabiliser le plateau), puis une feuille de papier blanc également passée à l'autoclave. Enfin, avant toute manipulation, il est nécessaire de se munir d'un masque, d'une charlotte, et de se laver au savon jusqu'au coude en prenant soin de se nettoyer les ongles à l'aide d'une brosse. Après s'être vêtu d'une blouse, les mains sont désinfectées avec du gel hydro alcoolique aux propriétés similaires au désinfectant de surface, à l'exception près qu'il comporte des agents épaississants. Avant de déposer les explants sur un milieu de culture, nous les passons dans trois bains successifs :

- Domestos à 10% pendant 10 minutes avec agitateur (liquide visqueux soluble dans l'eau)
  - o Hypochlorite de sodium 1-5%
  - o c12-18 alkyl dimethylamine oxide 1-5%
  - o hydroxyde de sodium <1%
- Javel à 0,2% pendant 10 minutes (dilution à 5% de la solution mère concentrée à 4%)
- Oxee back à 0,5% pendant 10 minutes

Les explants sont ensuite transférés dans un bain d'eau stérile, déposés sur le papier blanc pour éliminer l'eau en surface des tissus, puis déposés dans des tubes de culture individuels.

## **b) Traitements expérimentaux**

Certaines espèces comme *Pachystegia* 'DAIZEA' sont naturellement recouvertes d'un velours sur leurs tiges et feuilles. Celui-ci abrite des pathogènes, et les rend peu accessibles aux produits lors des bains de désinfection, d'où le constat d'un fort taux de contamination des cultures *in vitro* de *Pachystegia*. Pour parer à ce problème, nous avons comparé deux modalités : d'une part la méthode de désinfection classique sur un premier lot. D'autre part, nous avons tenté une digestion enzymatique des explants du second lot avant de les passer dans les bains à l'aide d'un produit utilisé en agroalimentaire : BIOREM BF 10% pendant 15 minutes. Ce produit est un détergent enzymatique permettant de dégrader les biofilms et agents pathogènes tels que *listeria*, *salmonelle* et *campylobacter*. Les explants sont ensuite passés 10 minutes dans le Domestos, puis 15 minutes dans la javel et l'Oxee back.

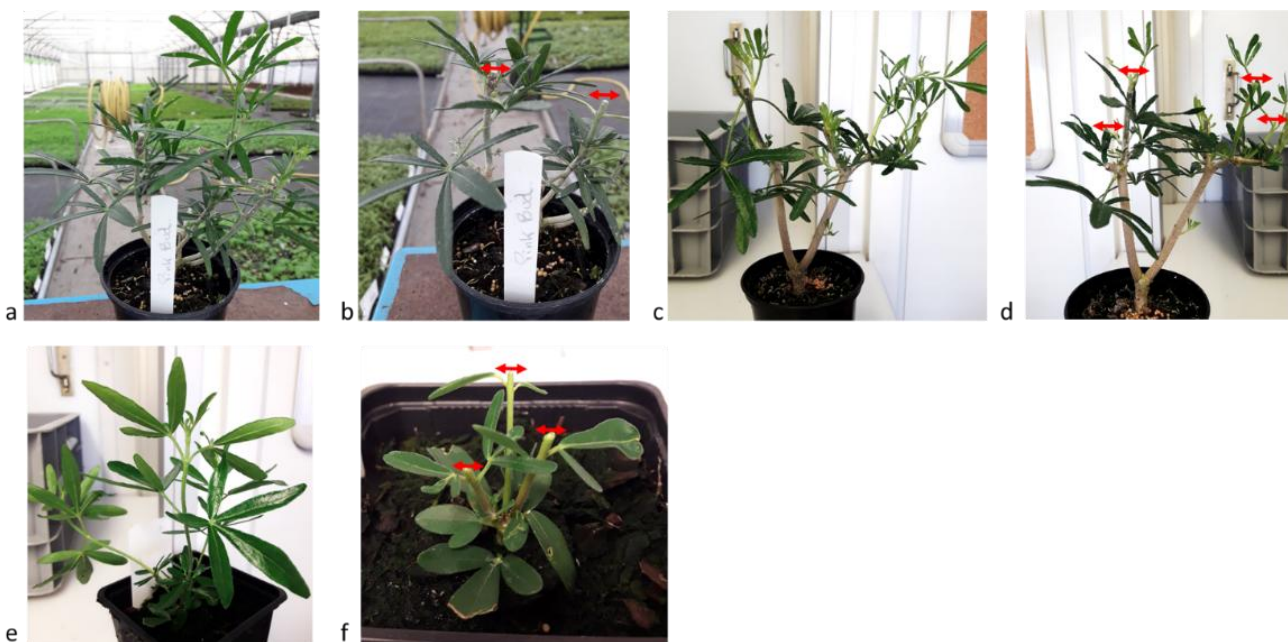
Une autre méthode sera testée pour faire face à ce problème lié au velours : le prélèvement d'explants très juvéniles, et donc encore dépourvus de velours. Il s'agit de venir prélever au scalpel un écusson comportant donc une infime partie lignifiée (qui sera posée sur le milieu de culture) et quelques très jeunes feuilles (figure 11).

Pour faire face au problème récurrent de contamination bactérienne, divers traitements sont régulièrement testés. Jusqu'ici aucun ne s'est avéré efficace, soit les bactéries sont éliminées mais les plantes ne supportent pas le traitement, soit le traitement n'a pas d'impact sur la prolifération bactérienne.

### **2.2.3. Milieux de culture**

Pour les initiations de cultures classiques, soit pour la plupart des variétés (à l'exception des *Fargesia* : milieu base MS mais liquide), le milieu de culture utilisé est le milieu MS BAP 0,5. Sa composition est détaillée en Tableau III. La BAP est une molécule de synthèse appartenant à la famille d'hormones végétales des CK. La BAP, en jouant un rôle similaire à celui des CK naturelles, favorise la division cellulaire. Cependant certaines





**Figure 14 : Conséquences de la taille du Genre *Choisya*.** De a) à d), *Choisya* 'PINK BUD' du parc de pieds mères le plus âgé. a) Photo prise avant la première taille. b) Photo prise après la première taille c) Photo prise 24 jours après la première taille. d) Photo prise suite au prélèvement des explants pour l'initiation. e) et f) *Choisya* 'SNOW FLURRIES' du parc de pieds mères plus jeune. e) Photo prise avant l'initiation. f) Photo prise suite au prélèvement des explants pour l'initiation (équivalent à la première taille) Les doubles flèches rouges indiquent la taille et les flèches pointillées rouges montrent des bourgeons dormants.



**Figure 15 : Conséquences de la taille de *Cotinus* 'YOUNG LADY'.** De a) à d), plants du parc de pieds mères le plus âgé. a) Photo prise avant la première taille. b) Photo prise après la taille. c) Photo prise 24 jours après la première taille. d) Photo prise suite au prélèvement des explants pour l'initiation. e) et f) Plants du parc de pieds mères plus jeune. e) Photo prise avant l'initiation. f) Photo prise suite au prélèvement des explants pour l'initiation (équivalent à la première taille) Les doubles flèches rouges indiquent la taille et les flèches pointillées rouges montrent des bourgeons dormants.

plantes comme les *Vaccinium* ne parviennent pas à se développer en présence de BAP, il faut donc utiliser une CK naturelle. Les plantes sont repiquées sur des nouveaux milieux de culture environ toutes les trois semaines. Cependant, si certaines plantes se sont rapidement multipliées, ou présentent des signes de carence (liseré rouge sur le bord des feuilles des *Vaccinium* 'COLIBRI'), il peut être décidé de les repiquer plus précocement.

A noter qu'il est toujours ajouté lors de la préparation des milieux une faible quantité de PPM, produit appartenant aux biocides qui permet notamment de réduire les contaminations fongiques. D'autres éléments tels que le charbon actif peuvent être ajoutés à certains milieu. En effet celui-ci permet de capter les exsudats (observés par exemple chez les *Cotinus* ou les *Phormium*) pour éviter la phytotoxicité.

#### 2.2.4. Approche statistique

Pour pouvoir effectuer une analyse statistique avec une quantité de données suffisante, nous travaillerons sur l'ensemble des résultats recueillis jusqu'ici. Cela implique que nous élargissons l'étude à d'autres genres que les *Rubus*, *Syringa*, *Choisya* et *Cotinus*. Nous allons en effet prendre en compte les genres suivants : *Actinidia*, *Amelanchier*, *Betula*, *Carpinus*, *Caryopteris*, *Daphne*, *Eriostemon*, *Hydrangea*, *Lavandula*, *Lavatera*, *Morus*, *Pachystegia*, *Prunus* et *Sambucus*.

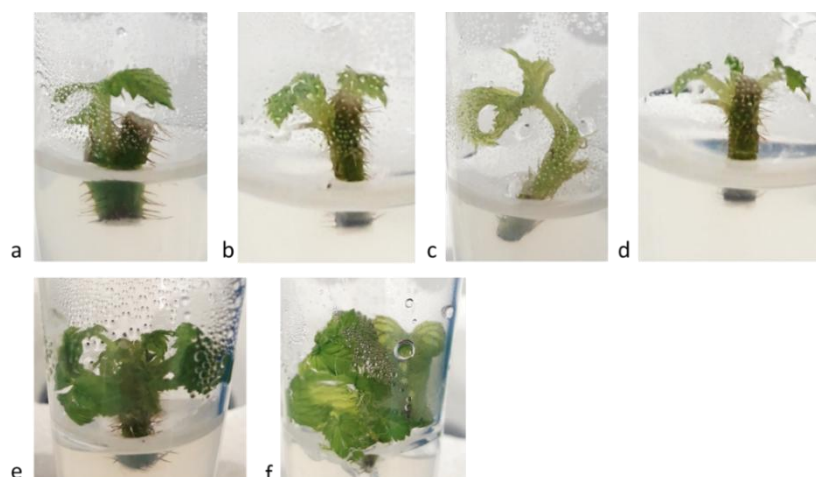
Pour mesurer l'effet de la juvénilité sur la reprise des explants, le temps étant un facteur limitant, nous nous limiterons aux résultats des 17 essais qui ont pu être repiqués (7 variétés juvéniles et 10 non juvéniles). En revanche, pour mesurer l'impact de la juvénilité sur la contamination des explants, nous pourrions travailler sur les 38 essais (17 juvénile, 21 non juvénile) puisqu'ils étaient en tube depuis suffisamment longtemps pour avoir manifesté les signes de contamination.

Certaines variétés, comme les *Rubus* et les *Cotinus* sont représentées plusieurs fois du fait des secondes initiations, mais chaque initiation compte pour un essai à part entière. De même, on retrouve deux fois les *Eriostemon myoporoides* et les *Cotinus* 'YOUNG LADY' puisqu'ils sont représentés à la fois dans le parc de pied mère juvénile et dans celui moins juvénile.

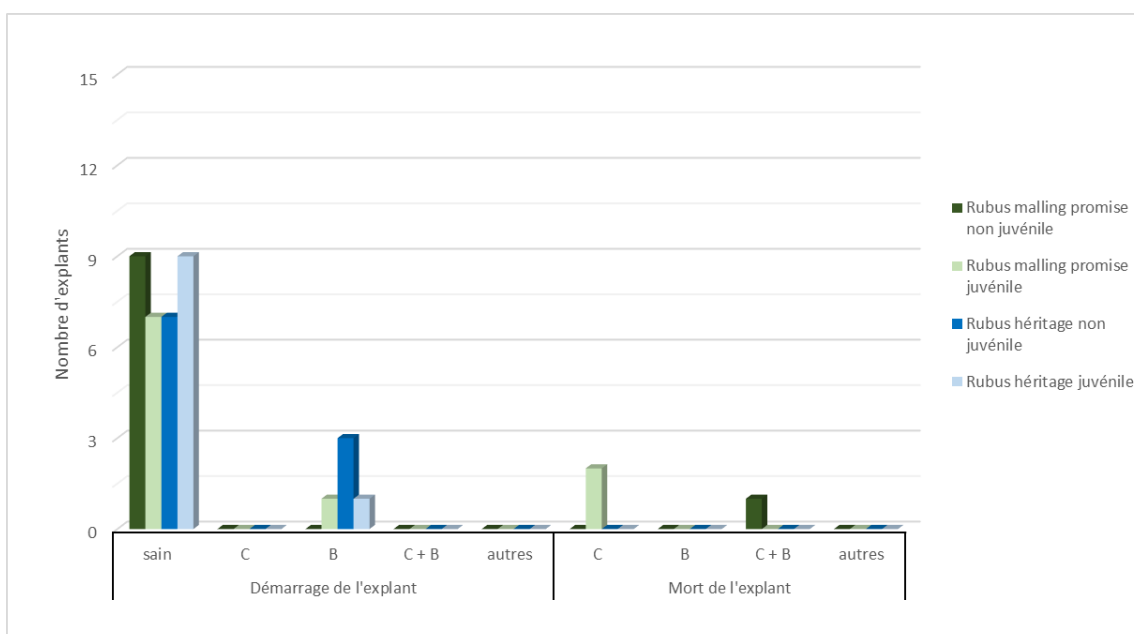
La comparaison entre une distribution observée (données relevées : nombre d'explants ayant repris, sains ou contaminés etc.) et une distribution théorique s'effectue au moyen du test du  $\chi^2$  de conformité. La comparaison mutuelle de deux ou N distributions observées s'effectue au moyen d'un test du  $\chi^2$  d'indépendance (car il revient à tester s'il existe un lien entre les lignes et les colonnes du tableau de données). Nous ferons trois tests différents sur nos données. Le premier aura en ligne le facteur juvénilité, et en colonne le facteur reprise ou non de l'explant. Le second de la même façon aura lui le facteur contamination ou non, en colonne. Enfin, le troisième test fera le lien entre la contamination d'un explant et son redémarrage, ou non. Les tests du  $\chi^2$  ne peuvent pas s'effectuer si certains effectifs théoriques sont inférieurs à 5 individus, c'est pourquoi nous avons choisi d'appliquer le test à l'ensemble des données et non variété par variété.

On émet pour chacun des trois tests les hypothèses  $H_0$  suivantes :

- $H_{01}$  : Il n'y a pas d'effet de la juvénilité sur la reprise de l'explant
- $H_{02}$  : Il n'y a pas d'effet de la juvénilité sur la contamination
- $H_{03}$  : Il n'y a pas d'effet de la contamination sur la reprise de l'explant



**Figure 16 : Résultats de l'introduction *in vitro* de *Rubus* 'MALLING PROMISE'.** a) et b) Photos prises 7 jours après l'initiation des explants les moins juvéniles. c) et d) Photos prises 7 jours après l'initiation des explants les plus juvéniles. e) Photo d'un explant non juvénile prise 19 jours après l'initiation. f) Photo d'un explant juvénile prise 19 jours après l'initiation.



**Figure 17 : Graphique représentant les résultats des premières introductions *in vitro* des *Rubus* 'MALLING PROMISE' et 'HERITAGE'.** 10 explants ont été initié pour chaque groupe le jour 1, le 1er repiquage est effectué jour 20. C : présence de champignons, B : présence de bactéries, C+B : présence de bactéries et champignons, autres : brulure par la javel ou présence de ravageurs.

Si le Chi2 calculé dépasse la valeur lue dans la table, on rejette Ho au seuil  $\alpha$  choisi, et on conclut donc que la répartition observée est significativement différente de la répartition théorique. Dans le cas contraire, on ne peut pas rejeter Ho. La valeur seuil du Chi2 pour  $\alpha = 0,05$  et 1 degré de liberté est de 3,841. Pour calculer ce Chi2, nous utilisons la formule suivante :

$$\frac{(obs_1 - théo_1)^2}{théo_1} + \frac{(obs_2 - théo_2)^2}{théo_2} + \dots + \frac{(obs_k - théo_k)^2}{théo_k}$$

## 3. Résultats

### 3.1. Effets des tailles sur l'organisation structurale des plantes

#### 3.1.1. Premières tailles des pieds mères

##### a) Genre *Rubus*

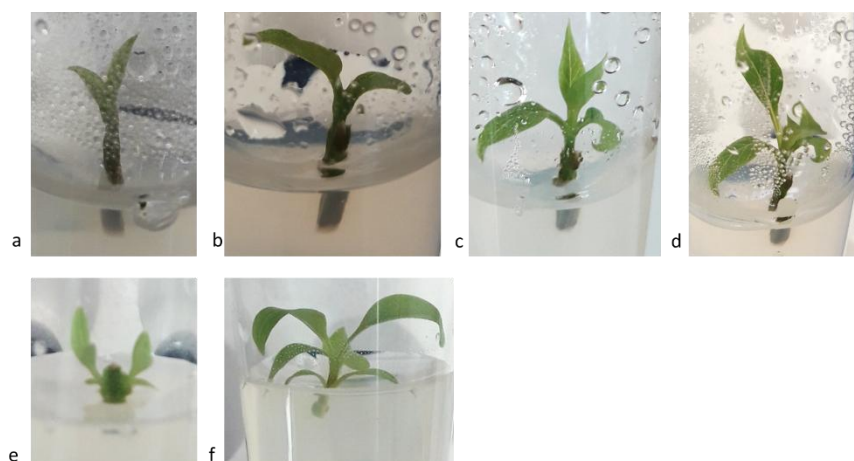
Rappelons-nous, dans le cas des *Rubus* la première taille a été sévère, toutes les parties lignifiées ont été supprimées ou fortement taillées. Cela a eu pour conséquence de favoriser le développement des tiges déjà bien démarrées mais encore non lignifiées, et a entraîné le débourrement de nombreux bourgeons axillaires jusque-là réprimés et parfois même l'apparition de rejets (figure 12). En effet, c'est la suppression du flux d'auxine provenant de l'apex qui lève l'inhibition des bourgeons basaux.

##### b) Genre *Syringa*

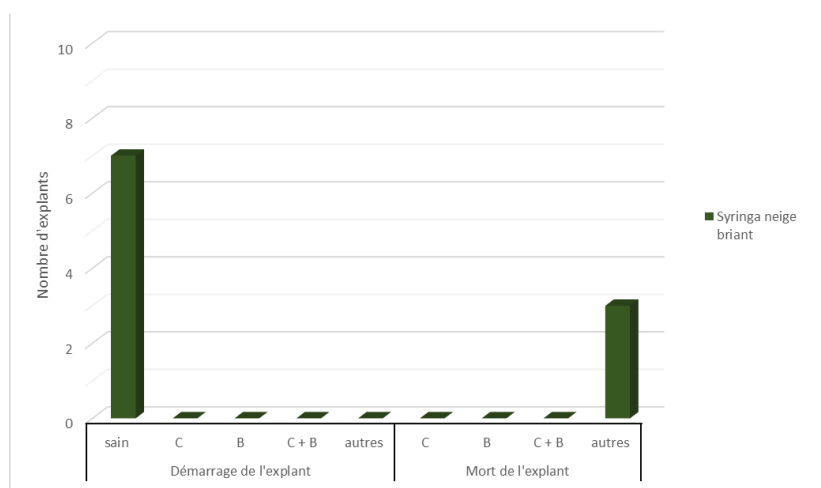
Chez le genre *Syringa*, les tailles les plus hautes ont entraîné le débourrement de certains des bourgeons dormants situés sur la partie déjà lignifiée de la tige, en particulier ceux situés les plus hauts. Ceci fut suivi d'une croissance relativement rapide des jeunes pousses. Lorsque des rejets étaient près existants, leur croissance s'est vue grandement favorisée par la taille appliquée aux parties plus anciennes. Enfin, pour les pieds qui furent taillés plus sévèrement, le nombre de bourgeons ayant débourrés était bien plus élevé. Bien que la croissance des jeunes pousses semblait plus lente que dans le cas des tailles hautes, le résultat final était bien meilleur. En effet, en taillant sévèrement, on obtient une ramification important dès la vingtaine de jours suivant la taille (Figure 13).

##### c) Genre *Choisya*

Concernant les *Choisya*, il semblerait que peu importe l'âge du pied considéré, une taille au-dessus du premier niveau de feuille entraîne la plupart du temps le débourrement des deux bourgeons axillaires. Il peut arriver que l'un des deux points végétatifs soit réprimé, mais uniquement dans de rares cas. C'est en effet un genre de plante qui tend naturellement à se ramifier, et qui par conséquent supporte parfaitement d'être taillée régulièrement. Cependant, il semble qu'une fois la tige lignifiée, comme dans le cas du *Choisya* 'PINK BUD' (Figures 14a à d), très peu de bourgeons soient capables de démarrer. On peut en observer un sur la Figure 14d, mais cela semble tout de même très occasionnel. Il est donc préférable face à ce genre de plant de ne pas tailler trop sévèrement, car on risquerait de ne pas réussir à réveiller de point végétatif, et par conséquent de tuer la plante. Il est donc essentiel avec cette plante, si l'on veut conserver un individu dans un état



**Figure 18 : Résultats de l'introduction *in vitro* du *Syringa* 'NEIGE BRIANT'.** a) Photo prise 3 jours après l'initiation. b) Photo prise 6 jours après l'initiation. c) Photo prise 10 jours après l'initiation. d) Photo prise 13 jours après l'initiation. e) et f) Photos de deux explants différents prises après le repiquage jour 29.



**Figure 19 : Graphique représentant les résultats des introductions *in vitro* du *Syringa* 'NEIGE BRIANT'.** 10 explants ont été initié le jour 1, le 1er repiquage est effectué jour 29. C : présence de champignons, B : présence de bactéries, C+B : présence de bactéries et champignons, autres : brulure par la javel ou présence de ravageurs.



physiologique juvénile, d'opérer des tailles régulières pour ne pas laisser la possibilité à la plante de se lignifier. De plus, ces tailles permettent d'obtenir rapidement un port en forme de boules, correspondant à une plante très ramifiée. Par conséquent, la plante reste en état de fournir du matériel utilisable en introduction *in vitro* à n'importe quel moment.

#### d) Genre *Cotinus*

Ce genre semble également se prêter à la taille. En effet, on observe qu'une taille des têtes (ou des parties lignifiées lorsque l'on note la présence de bourgeons en activité en dessous) permet de faire démarrer les bourgeons les plus hauts. Ces plantes fournissent rapidement beaucoup de matériel à introduire *in vitro*, de par le nombre important d'entre-nœuds qui se forment, et donc de points végétatifs (Figure 15).

En revanche, les *Cotinus* semblent commencer rapidement leur aoutement. Ce phénomène qui s'est manifesté par l'apparition de taches noires (semblables à des nécroses) sur les tiges encore vertes, correspond en fait à la lignification des jeunes rameaux avant l'hiver. Encore une fois, si la plante reste trop longtemps sans être taillée, il sera difficile de lui faire produire par la suite des pousses juvéniles.

#### 3.1.2. Secondes tailles des pieds mères

Pour le genre *Rubus*, les plants sur lesquels ont été supprimés toutes les tiges à l'exception d'une seule ont tous fournis un nombre conséquent de rejets. La tige conservée étant issue d'une jeune pousse (suite à la première taille), il n'existe plus sur ces plants de partie lignifiée. Ces plantes la sont donc bien plus juvéniles qu'elles ne l'étaient avant les tailles, et fournissent un matériel intéressant pour le laboratoire.

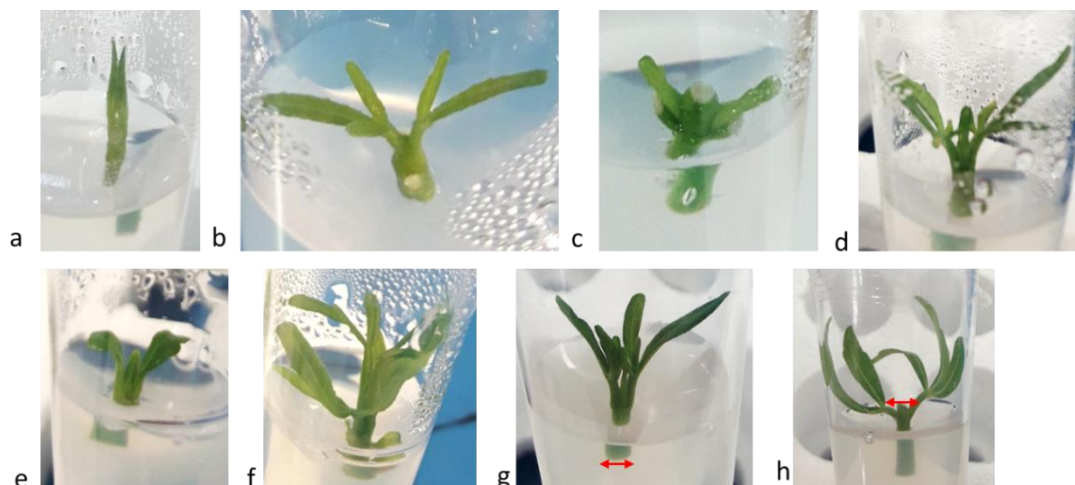
Les autres plants qui avaient été taillés moins sévèrement ont tous continué leur croissance en créant de nouvelles pousses. Bien entendu, plus la taille a été sévère, plus la production de jeunes pousses a été conséquente.

Concernant les *Syringa*, la taille qui a consisté à rabaisser tous les plants s'est avérée bénéfique. En supprimant une grande partie des tiges lignifiées, les bourgeons qui avaient entamé leur démarrage ont vu leur croissance s'accélérer, et ceux qui étaient encore latents ont pratiquement tous fini par débourrer.

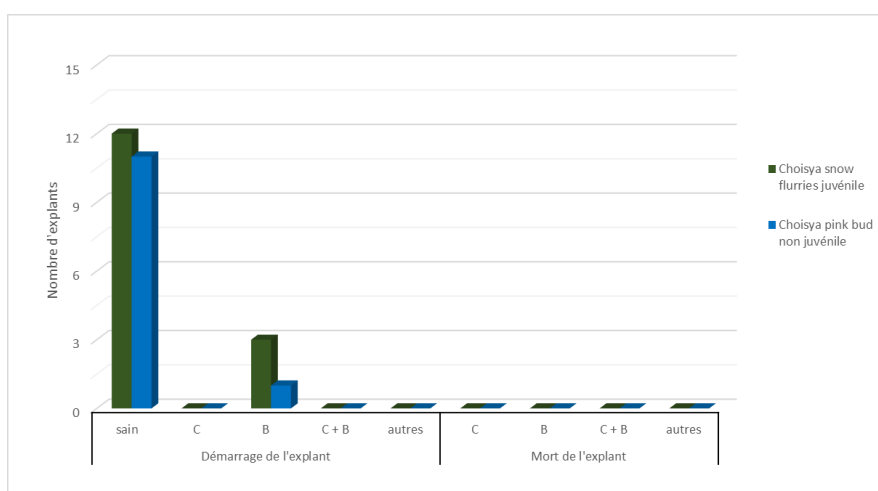
En continuant de supprimer régulièrement des parties lignifiées, et en taillant les têtes, voire au-dessus du premier niveau de feuilles, on s'aperçoit que l'on passe d'une plante à l'aspect élancé, à une plante très ramifiée dès le bas, et au port plus trapu.

Les *Choisya* font partis des plantes qui gagnent à être taillées. Etant des végétaux se ramifiant naturellement, en les aidant via la suppression des apex, il est aisé d'obtenir une plante très ramifiée qui conserve son état de juvénilité.

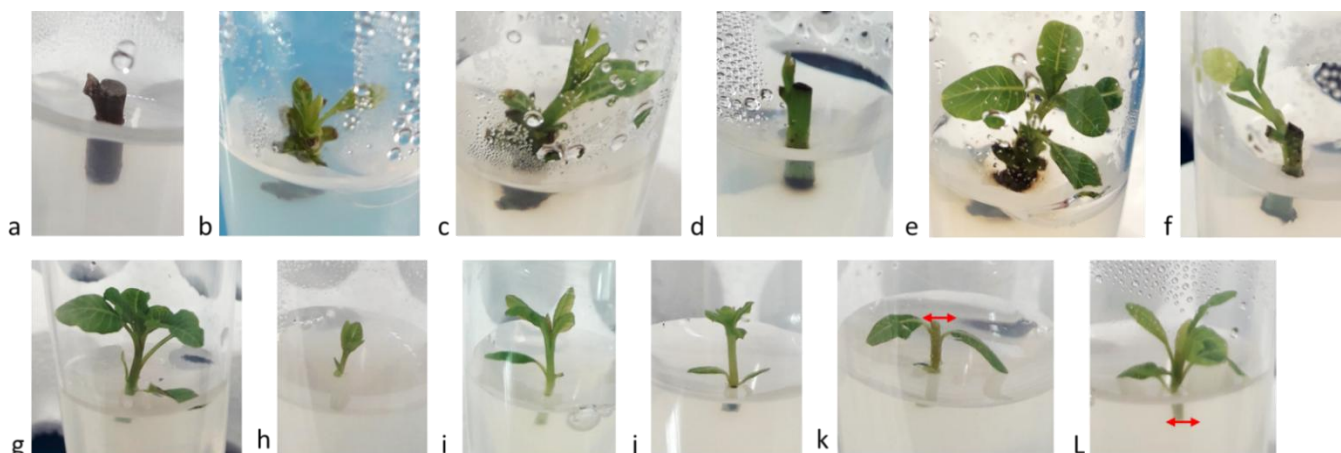
A l'inverse, il s'agit d'être prudent avec les *Cotinus*, qui vont préférer une croissance en hauteur. Il faut donc pincer de façon régulière les têtes pour entraîner le débourrement d'un bourgeon axillaire et induire une ramification.



**Figure 20 : Résultats de l'introduction *in vitro* des *Choisya* 'PINK BUD' et 'SNOW FLURRIES'.** a) Introduction d'un explant 'SNOW FLURRIES' juvénile jour 1. b) Explant 'PINK BUD' non juvénile jour 3. c) Explant 'SNOW FLURRIES' juvénile jour 8. d) Explant 'SNOW FLURRIES' juvénile jour 11. e) et f) Explants 'PINK BUD' non juvénile, photo du repiquage jour 17. g) et h) sont issus du même explant 'SNOW FLURRIES' juvénile, g) est la tête et h) le pied de la jeune pousse. La double flèche rouge indique là où les deux parties ont été séparées.



**Figure 21 : Graphique représentant les résultats des premières introductions *in vitro* des *Choisya* 'SNOW FLURRIES' et 'PINK BUD'.** 10 explants ont été initié pour chaque groupe le jour 1, le 1er repiquage est effectué jour 18 pour 'SNOW FLURRIES', jour 14 pour 'PINK BUD'. C : présence de champignons, B : présence de bactéries, C+B : présence de bactéries et champignons.



**Figure 22 : Résultats de l'introduction *in vitro* de *Cotinus* 'YOUNG LADY'.** a) Introduction d'un explant non juvénile jour 1. b) Explant juvénile jour 3. c) Explant juvénile jour 6. d) Explant non juvénile jour 6. e) Explant juvénile jour 10. f) Explant non juvénile jour 10. g) et h) sont issus du même explant juvénile, photo du repiquage jour 17. i) et j) sont issus du même explant non juvénile, photo du repiquage jour 17. k) et l) sont issus du même explant non juvénile, photo du repiquage jour 17. K) est la tête et L) le pied de la jeune pousse. La double flèche rouge indique là où les deux parties ont été séparées.

## 3.2. Introduction de culture *in vitro*

### 3.2.1. Genre *Rubus*

Les *Rubus* ont été introduit *in vitro* le 03/05 (jour 1), leur évolution au cours du temps est représentée en figure 16. On peut voir chez les *Rubus* que physiologiquement, les jeunes pousses issues des explants les moins juvéniles sont très vertes et vigoureuses et les bourgeons débourent rapidement.

En ce qui concerne les explants les plus juvéniles, les bourgeons ont mis quelques jours de plus à débourent, et physiologiquement les feuilles semblaient plus juvéniles de par leur forme, mais elles étaient également plus pâles.

Les *Rubus* font partis des plantes qui posent peu de problème à introduire *in vitro*. En effet, comme le montre la figure 17, la majorité des explants introduits sont sains, et même si certains présentent des contaminations bactériennes, très peu d'explants n'ont pas redémarré. Il aura par ailleurs fallu à ces variétés ('HERITAGE' et 'MALLING PROMISE') 20 jours de croissance en tube pour être prêtes à être repiquées.

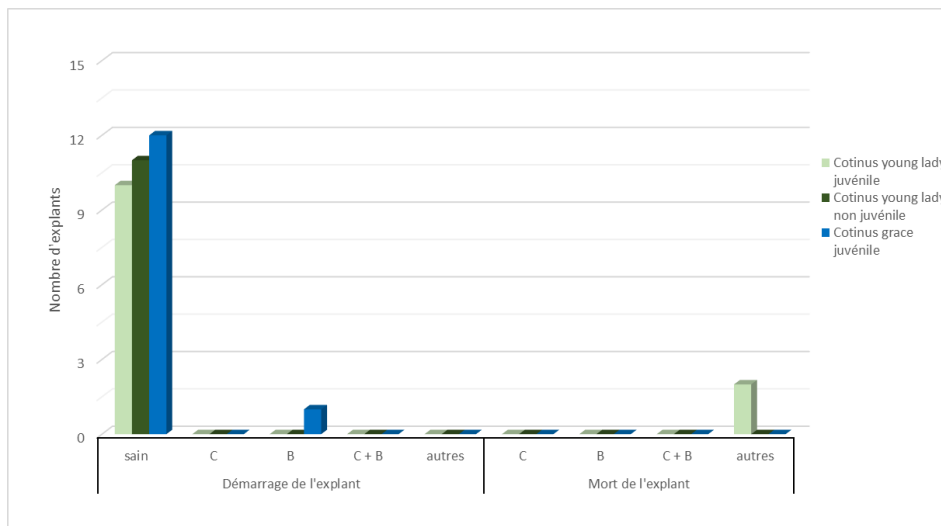
A noter que la présence de traces bactériennes (léger halo blanc autour de l'explant) n'empêche pas toujours le développement de l'explant dans le cas de cette espèce. En revanche, la présence de champignon est systématiquement associée à la mort de l'explant puisqu'il recouvre la totalité du milieu et étouffe la plante. De plus, par mesure de précaution, les tubes présentant des champignons ne sont pas ouverts afin de ne pas disséminer les spores dans le laboratoire.

Puisque lorsque nous avons introduit les *Rubus* nous en avons profité pour tailler les pieds mères, ceux-ci ont fournis rapidement de nouvelles pousses, d'un niveau de juvénilité supérieur aux pousses introduites la première fois. Il a donc été possible le 26/05, soit 23 jours après la première introduction, de lancer une nouvelle série de 10 explants juvéniles de *Rubus* 'MALLING PROMISE'. Ceux-ci ont été prélevés à partir des pieds mères auxquels nous n'avons laissé qu'une seule tige. Nous avons cette fois-ci repiqué les explants dès le 17<sup>ème</sup> jour. Ce qui montre bien qu'un niveau de juvénilité supérieur permet la reprise plus rapide de la croissance végétative. Enfin, le taux de contamination était cette fois-ci nul, et nous avons observé un peu de multiplication végétative, puisqu'à partir des 10 explants introduits nous avons repiqué 12 plantes. Le repiquage de la première initiation n'avait fourni qu'entre 7 et 9 plantes à repiquer, on note donc une amélioration. Une simple ANOVA (analyse de variance) aurait permis de comparer le taux de multiplication entre les deux modalités, malheureusement nous disposons de trop peu de données. Malgré tout, ces résultats restent même encourageant.

### 3.2.2. Genre *Syringa*

La variété 'NEIGE BRIANT' du genre *Syringa* a été introduite le 09/05 (jour 1) à partir d'un pied mère peu juvénile mais qui, suite aux tailles, avait fourni de nouvelles pousses. On note chez cette variété une croissance très rapide des feuilles issues d'un bourgeon terminal (Figure 18a à d).

Cependant, bien que le démarrage fut rapide, il semble que la croissance stagne rapidement. En effet, en comparant l'état des explants au stade 13 jours (Figure 18d) et au stade 29 jours (Figure 18f, moment choisi pour le repiquage), on remarque peu de changement alors que 16 jours se sont écoulés entre les deux photos.



**Figure 23 : Graphique représentant les résultats des premières introductions *in vitro* des *Cotinus* 'YOUNG LADY' et 'GRACE'.** 10 explants ont été initié pour chaque groupe le jour 1, le 1<sup>er</sup> repiquage est effectué jour 13 pour 'GRACE', jour 17 pour 'YOUNG LADY'. C : présence de champignons, B : présence de bactéries, C+B : présence de bactéries et champignons.

Il semble alors qu'il n'est pas nécessaire d'attendre au moins trois semaines avant le repiquage, car la plante évolue très peu après les deux premières semaines.

Enfin, la figure 18e met en évidence un explant pour lequel les deux bourgeons axillaires ont démarré. Cependant, il est évident que ce phénomène ralenti considérablement la croissance des nouvelles pousses, à la différence d'une pousse issue d'un bourgeon terminal, ou encore d'une pousse provenant d'un axillaire, mais qui aurait inhibé le développement de l'axillaire voisin.

Il semble toutefois que les *Syringa*, en tout cas la variété 'NEIGE BRIANT', soient assez sensibles à la désinfection par la javel. Effectivement, on remarque sur la figure 19 que 30% des explants ont été brûlés par la javel et n'ont pas pu démarrer. Cela est remarquable de par l'aspect bruni des explants, qui se manifeste quelques jours après l'initiation, ainsi que par une absence de gonflement du bourgeon.

En revanche, nous pouvons souligner l'absence totale de contamination sur cette variété. Soit la variété est naturellement relativement pauvre en agents pathogènes, soit la désinfection s'est montrée particulièrement efficace sur cette plante.

La croissance des *Syringa* n'étant pas aussi vigoureuse que celle des *Rubus*, nous ne pourrions pas effectuer de seconde initiation avant une longue période. Pour cause, même si les bourgeons ont tendance à sortir rapidement de leur état de latence, la croissance des pousses reste quant à elle relativement lente.

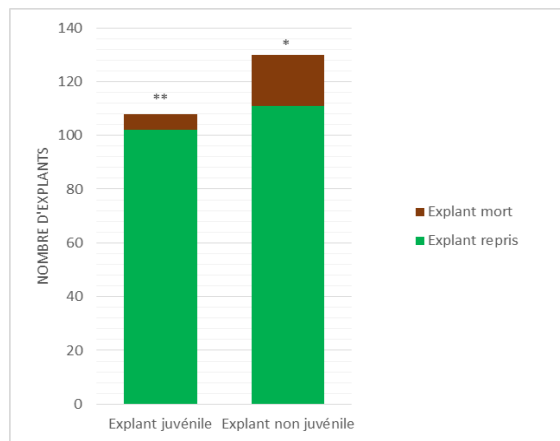
### 3.2.3. Genre *Choisya*

Les *Choisya* 'PINK BUD' et 'SNOW FLURRIES' ont été introduits *in vitro* respectivement le 26/05 et le 29/05 (jour 1), leur évolution au cours du temps est représentée en figure 20.

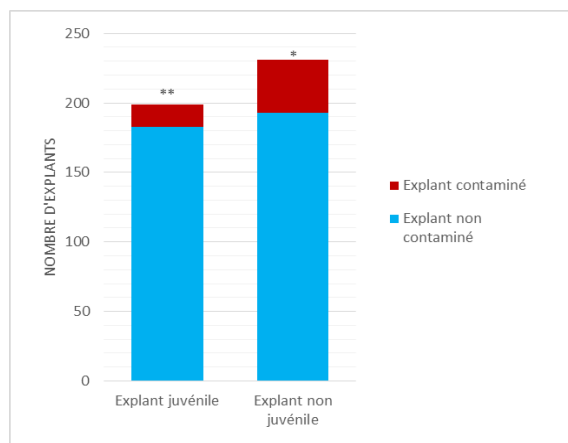
On remarque que lorsque l'explant présente un bourgeon terminal, les premières feuilles se développent très rapidement, elles sont visibles dès le 3<sup>ème</sup> jour (figure 20b). En revanche dans ce cas, le développement du bourgeon terminal a tendance à inhiber le développement des deux bourgeons axillaires, excepté dans de rares occasions, où l'on peut observer le démarrage des axillaires et du bourgeon terminal.

Bien que l'absence d'un bourgeon terminal implique un démarrage plus lent de l'explant, cela va souvent de pair avec le fait que l'on ait de la multiplication dès le premier repiquage. En effet, du fait que les deux axillaires se développent (feuilles opposées), même si l'un prend généralement le dessus sur l'autre en poussant plus vite, on parvient à partir de ce premier explant à repiquer deux plantes indépendantes (figure 20c). Néanmoins, dans le cas où le bourgeon terminal se montrerait particulièrement vigoureux, il est également possible de faire de la multiplication. En effet, si les entre-nœuds ne sont pas trop rapprochés, il est envisageable de repiquer une même pousse dans deux tubes différents. La tête de la pousse dans un tube, et le pied, que l'on pourrait qualifier de tronçon, dans un autre tube (Figures 20g et h).

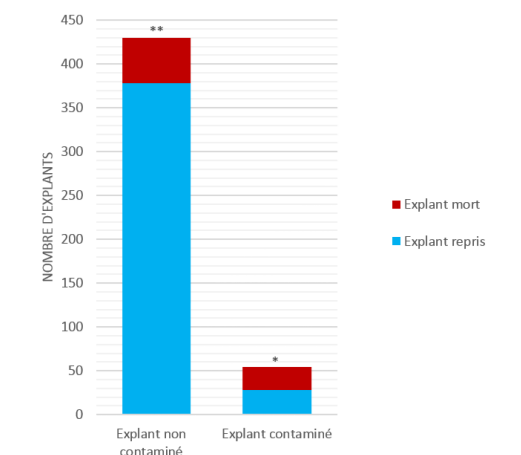
La première chose que nous montre la figure 21, en opposition aux figures 17 et 19 (Graphiques représentant les résultats des introductions des *Rubus* et des *Syringa*), c'est que le nombre d'explants final est supérieur au nombre d'explants qui ont été initiés. Nous sommes en effet à plus de 10 explants sains après le premier repiquage. Cela signifie qu'après 14 à 18 jours de culture, il est déjà possible de faire de la multiplication sur ces variétés. En considérant exclusivement les plantes saines, le taux de multiplication des *Choisya* 'PINK BUD' (non juvéniles) est de 1,1 et celui des 'SNOW FLURRIES' (juvéniles) est de 1,2.



**Figure 24 : Histogramme représentant la répartition (reprise ou non) des explants en fonction de la juvénilité.** Un test du  $\chi^2$  au seuil 0,5% et ddl=1 indique une différence significative des résultats obtenus pour les explants juvéniles et non juvéniles repiqués (liste en Annexe V)



**Figure 25 : Histogramme représentant la répartition (sain ou contaminé) de tous les explants confondus en fonction de la juvénilité.** Un test du  $\chi^2$  au seuil 0,5% et ddl=1 indique qu'il y a une différence significative des résultats obtenus pour les explants juvéniles et non juvéniles (liste en Annexe V).



**Figure 26 : Histogramme représentant la répartition (mort ou repris) de tous les explants confondus en fonction de la contamination ou non des explants.** Un test du  $\chi^2$  au seuil 0,5% et ddl=1 indique qu'il y a une différence significative des résultats obtenus pour les explants repris et non repris (liste en Annexe V).

### 3.2.4. Genre *Cotinus*

La figure 22 présente l'évolution des explants des *Cotinus* 'YOUNG LADY' issus de pieds mères plus ou moins juvéniles. On remarque que les explants prélevés sur les pieds les moins juvéniles produisent une quantité importante d'exsudats, ceux-ci peuvent s'avérer phytotoxiques si la plante reste trop longtemps sur le milieu. Bien entendu, on retrouve aussi ces exsudats à partir des explants juvéniles, mais en moindre quantité puisque l'explant introduit est de plus petite taille.

L'intérêt des explants juvéniles est notamment leurs entre-nœuds très courts, qui permettent le débourrement de plusieurs pousses par explant, et donc un taux de multiplication important dès le premier repiquage.

D'un autre côté, généralement les explants moins juvéniles fournissent des pousses plus vigoureuses, qui présentent donc suffisamment d'entre-nœuds pour faire au moins deux plantes à partir d'une (figure 22k et 22L).

Sur la figure 23, nous pouvons voir que tout comme les *Syringa*, les explants juvéniles de *Cotinus* 'YOUNG LADY' sont sensibles à la désinfection par la javel. En revanche, de la même façon que les *Choisya*, les *Cotinus* semblent permettre une multiplication rapide, puisqu'après 13 à 17 jours de culture, nous obtenons au premier repiquage un taux de multiplication compris entre 1,0 et 1,2. Un taux de 1,0 pourrait laisser croire que ce sont juste les 10 explants initiaux qui ont survécu, mais la figure nous montre qu'en réalité sur les 10 explants, deux ont été brûlés par la javel. Ce qui implique que sur les 8 explants restant, deux ont permis de faire deux plantes à partir d'une seule.

Pour cette variété, au même titre que les *Rubus*, il nous a été possible de lancer une nouvelle introduction *in vitro* à partir des pieds mères juvéniles, mais également non juvéniles de *Cotinus* 'YOUNG LADY'. Cela s'est fait le 30/05, soit seulement 18 jours après la première initiation, date correspondant bien entendu à la dernière taille. Cette fois ci, la majorité des explants présentait une morphologie similaire à celle présentée en figure 22b, c'est à dire des entre nœuds tellement proches qu'il était impossible de préparer un explant ne contenant qu'un seul point végétatif.

Bien que la première série d'explants ait été prélevée sur les pieds juvéniles, et l'autre série sur ceux moins juvéniles, nous nous attendons tout de même à observer des résultats similaires, puisque les pieds ont subis le même traitement depuis 2 mois et ont tous deux fournis du matériel de même aspect morphologique.

Il en ressort à ce jour (jour 15 : encore trop tôt pour le repiquage) que 12 plantes seraient susceptibles d'être repiquées à partir des 10 explants juvéniles. Cependant on observe 30% de contamination sur les explants les moins juvéniles, ce qui est supérieur au taux de contamination de la première initiation. Cette contamination peut être indépendante des explants eux-mêmes et liée à une erreur de manipulation.

### 3.2.5. Approche statistique de la globalité des variétés introduites *in vitro*

Les tableaux de données sont présentés en Annexe VI et VII, cependant les figures 24, 25 et 26 résument les résultats obtenus. Il ressort qu'au risque  $\alpha$  de 5%,  $H_01$  est rejetée car  $\chi^2 = 5,15$ , et donc la juvénilité de l'explant a un impact positif sur la survie de l'explant. En effet, 94,4% des explants d'origine juvénile redémarrent, contre seulement 85,4% chez les explants non juvéniles. D'autre part, le test statistique indique que l'on rejette également  $H_02$  au risque  $\alpha$  de 5% car  $\chi^2 = 7,08$ , ce qui indique que la différence de

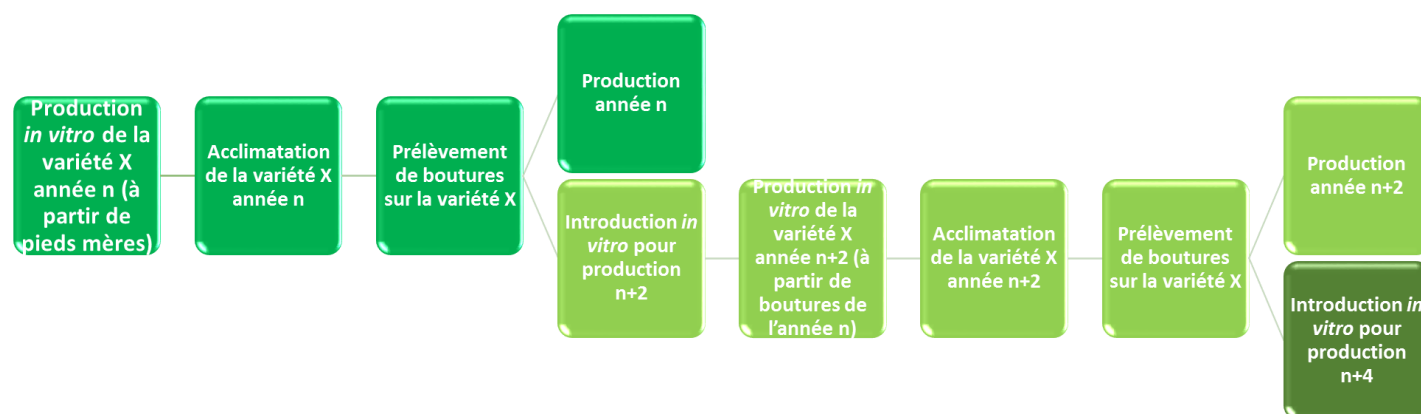


Figure 27 : Organigramme représentant le modèle d'introduction *in vitro* à partir du matériel végétal de l'acclimatation.



contamination observée entre les explants juvéniles et non juvéniles est significative. Effectivement, seulement 8,0% des explants juvéniles sont contaminés, tandis que l'on en compte le double (16,5%) chez les explants non juvéniles.

### 3.3. Optimisation de l'état sanitaire des souches au sein du laboratoire *in vitro*

#### 3.3.1. Traitements existants

Pour introduire des plantes *in vitro*, il est essentiel d'utiliser des traitements fongicides et bactéricides au préalable sur les pieds mères, et de maîtriser leur état physiologique. En effet, au cours de mon stage, le laboratoire a reçu des échantillons de divers *Syringa* dans le but de redémarrer les cultures à partir d'un matériel dont la variété a été certifiée. Le matériel étant arrivé sous forme de rameaux, divers problèmes se sont posés. Les rameaux n'étant pas juvéniles, peu de bourgeons étaient exploitables, et ceux qui l'étaient ont nécessité une longue période avant de débourrer. Enfin, l'état sanitaire s'est avéré catastrophique, avec entre 90% et 100% de tubes contaminés pour chaque variété. Suite à ces résultats décevants, nous avons réitéré l'expérience en passant de 10min par bain de désinfection à 15min.

Malheureusement, la désinfection plus sévère n'a pas eu l'effet escompté et les explants restent pratiquement tous contaminés, en particulier par des champignons. Ceux-ci à l'inverse des bactéries, ne laissent aucune chance à la plante de se développer, car en plus de puiser dans les réserves du milieu nutritif, ils recouvrent et étouffent l'explant.

#### 3.3.2. Traitements expérimentaux

La digestion enzymatique du biofilm sur les *Pachystegia* 'DAIZEA' a fourni des résultats pour le moins inattendus. En effet, le but était de réduire les contaminations par des agents pathogènes. Nous avons cependant observé le développement important d'une bactérie de couleur jaune sur tous les tubes qui avaient subis ce traitement. Les tubes avec digestion enzymatique se sont donc retrouvés plus contaminés que ceux sans digestion. Ces résultats laissent supposer une chose : la digestion enzymatique a bien cassé le biofilm, mais les bains de désinfection n'ont pas éliminé les bactéries alors libérées, puisque n'étant plus protégées dans le biofilm.

Enfin, même en augmentant l'exposition des explants au digesteur enzymatique ainsi qu'à la javel, les tubes restent tous contaminés, et les explants finissent par brunir car brûlés par la javel.

## 4. Discussion

Le but de cette étude était de déterminer quelles sont les pratiques à mettre en place pour garantir la réussite d'une introduction *in vitro* sur une large gamme de variétés. Il fallait donc tenir compte à la fois du travail effectué sur les pieds mères, mais aussi de tout ce qui se rattache à la culture *in vitro*.

Nous avons pu clairement vérifier le principe de réitération (Galopin et Beaujard, 1998). En effet, toutes les tailles effectuées ont entraîné le débourrement de bourgeons axillaires. Bien sûr, selon les différents genres, ces débourrements ne se sont pas tous manifestés de la même façon, certaines fois les tailles des têtes

entraînaient, en plus du démarrage des axillaires, le démarrage de bourgeons dormants situés sur les parties lignifiées des plantes, c'était par exemple le cas des *Syringa*. Enfin, nous supposons que la perte des explants était grandement liée au fait que ce dernier soit contaminé, et cette hypothèse est confirmée : on rejette  $H_03$  au risque  $\alpha=5\%$  car  $\chi^2 = 48,99$ . Donc, la contamination a pour conséquence de réduire le taux de survie des explants. En effet, 88,5% des explants sains ont redémarré, contre seulement 51,9% de reprise chez les explants contaminés.

*A contrario*, sur certaines variétés, le débourrement d'un des deux axillaires pouvait se trouver inhibé par l'axillaire voisin. La meilleure illustration de ce principe reste tout de même le travail effectué sur *Eriostemon myoporoides* (figure 5 et Annexe III) où l'on peut voir une ramification très nette du jeune plant suite aux tailles à différents niveaux de feuilles. Dans le cas de ce végétal, peu importe le niveau de taille, tous les bourgeons axillaires situés en dessous ont démarrés. Il arrive en effet pour d'autres plantes, que seuls les bourgeons situés juste en dessous du niveau de taille démarrent, ceux situés plus bas restent donc dormants.

Par ailleurs, l'état de la littérature concernant les phytohormones que sont les auxines et les cytokinines est parfaitement en accord avec les résultats observés. En effet, la suppression de l'apex par les tailles, en supprimant le flux d'auxine (qui se fait de l'apex vers les racines), inhibe totalement la dominance apicale, puisqu'on observe le débourrement des bourgeons jusque-là latents. Au niveau du laboratoire, les milieux de culture n'étant pas supplémentés d'auxines, on conserve bien une multiplication végétative, au détriment d'une croissance uniquement en hauteur. Dans la même logique, on remarque que le fait d'ajouter de la BAP aux milieux, qui est une CK de synthèse, empêche le développement de racines, et favorise la ramification des plantes en activant la division cellulaire.

Cependant, l'implication dans le phénomène de ramification d'un nouveau type de phytohormone – les SL – a été récemment mis en évidence. En effet, des études ont montré que des plantes KO pour les SL étaient plus sensibles à la stimulation de la croissance des bourgeons, cela suite à l'application de plus faibles quantités de CK que sur les plantes sauvages. Ceci a permis de mettre en évidence l'action antagoniste des SL et des CK. Il semblerait donc que les SL inhibent le débourrement (Dun et al., 2012). Il a par ailleurs été montré que ces SL pouvaient inhiber la croissance des bourgeons *in vitro*, cela même en très faible présence d'AUX, voire sur des plantes décapitées (Brewer et al., 2015). A priori le facteur de transcription BRC1, connu pour inhiber le débourrement des bourgeons, serait au centre de ces interactions entre phytohormones. Effectivement, les scientifiques suggèrent que BRC1 est inhibé par les CK, et activé par les SL. S'ajoute à cela l'action de l'auxine, qui vient, elle, inhiber les CK mais activer les SL. Enfin, la synthèse de ces hormone est elle-même régulée par l'apport de nutriments du sol, puisque sur un milieu riche on note une production de CK plutôt que de SL, et inversement sur un sol pauvre en éléments minéraux. Un autre modèle suggère que les SL agissent en fait sur le transporteur d'AUX, PIN1. En inhibant ce transporteur, le flux massif d'AUX depuis les bourgeons vers la tige centrale est interrompu, ce qui empêcherait les bourgeons de démarrer (Waters et al., 2017).

Notre hypothèse de départ était que la juvénilité d'une plante facilite son introduction *in vitro*. Il ressort qu'il est en effet bénéfique de démarrer une culture *in vitro* à partir de matériel végétal le plus juvénile possible.

En effet, l'étude a montré que la juvénilité influençait de manière positive le redémarrage des explants une fois placés sur leur milieu nutritif.

Par ailleurs, la seconde expérimentation, qui consistait à introduire une seconde fois la même variété - cela à partir des mêmes plants, mais ayant subi une taille supplémentaire - s'est également avérée concluante. En effet, sur les *Rubus* 'MALLING PROMISE', nous avons observé un redémarrage plus rapide de la végétation, ainsi qu'un taux de contamination inférieur à la première expérimentation. De plus, au bout de seulement 17 jours nous observions de la multiplication, chose que nous n'avions pas vu lors de la première introduction. Bien qu'une étude statistique ne soit pas possible sur une si petite quantité de données, cela reste un résultat pour le moins satisfaisant.

Enfin, en ce qui concerne l'état sanitaire du laboratoire, de nouvelles méthodes sont testées régulièrement pour faire face aux pathogènes et ravageurs. Au cours de mon stage j'ai suggéré l'utilisation d'AHL (Acyl homosérine lactone). Ces molécules auto inductibles ou leurs analogues pourraient perturber le dialogue entre bactéries (appelé *quorum sensing*), et de fait inhiber leur prolifération (Cui, X., & Harling, R., 2005 et Hernández-Reyes et *al.*, 2014). Des recherches approfondies sur le sujet sont nécessaires afin de déterminer si ces molécules sont utilisables au sein d'un laboratoire *in vitro* (peuvent-elles passer à l'autoclave ? comment les intégrer dans les milieux de culture ?).

L'essai de ces molécules n'a pas encore pu être mis en place car le laboratoire a fait face à une infestation par les thrips, et le problème a dû être traité rapidement. La solution semble avoir été trouvée dans l'ajout à tous les milieux de culture d'un insecticide. Ce produit, à la différence de nombreux agents phytosanitaires, est soluble dans les milieux de culture, et présente toutes les caractéristiques physico-chimiques permettant son intégration dans les milieux.

## 5. Conclusions et perspectives

Avant toute chose, il est nécessaire de rappeler que ABJP est un généraliste puisqu'il gère la production de 1400 variétés différentes. Cependant, les clients attendent de cette entreprise une qualité de produit qui s'apparente à celle d'un spécialiste. C'est là que se trouve toute la difficulté, car il s'agit de trouver le juste équilibre qui va permettre de sortir des produits conformes au cahier des charges, tout en utilisant le moins de techniques de cultures différentes. Bien entendu, certaines espèces se prêtent très bien au jeu et ne présentent pas de difficultés particulières, comme par exemple les *Choisya*, qui se cultivent aussi bien sur un milieu classique en laboratoire, que via le bouturage.

En revanche, face à des sujets tels que les plantes en rosettes de type *Nandina*, Agapanthe (genre *Agapanthus*) ou encore Bananier (genre *Musa*), le passage par le laboratoire *in vitro* est obligatoire, mais leur introduction s'avère délicate du fait que ces plantes soient des monocotylédones. Pour cause, ce caractère implique qu'à une tige correspond un seul méristème, qui peut être difficile à récupérer, et qui est souvent

fortement contaminé puisqu'il est enterré dans le substrat. Prenons également le cas des Bambous (genre *Fargesia*) : ceux-ci réclament un milieu classique, cependant celui-ci doit être liquide pour permettre la croissance de la plante. Nous avons également vu le cas des *Vaccinium*, qui eux ne peuvent se passer de cytokinine naturelle pour entamer leur croissance.

On comprend clairement ici qu'il est impossible d'appliquer le même traitement à toutes les variétés, même s'il est possible d'établir des classes auxquelles on applique les mêmes règles.

Au niveau des pieds mères, le problème est le même. D'une variété à l'autre, les besoins en eau, en fertilisation ainsi qu'en taille peuvent être très différents. En effet, l'arrosage d'un parc de pieds mères doit se faire à la main, car la brumisation automatique sera insuffisante pour une espèce comme le *Populus erecta*, et trop abondante pour les *Daphne*. Sans oublier le fait que les plantes ne se trouvent pas toutes au même stade physiologique au même moment : une plante venant d'être taillée, ou encore juvénile, ne présente pas la même capacité d'absorption d'eau qu'une plante avec un feuillage très développé. Vient ensuite le problème de la fertilisation. Certains végétaux présentent naturellement des carences en divers éléments, mais il est malheureusement compliqué d'apporter une fertilisation spécifique à chaque variété. Il a notamment été observé sur certains *Choisya* et *Syringa*, des feuilles déformées suite à une libération trop importante d'engrais pendant les fortes chaleurs.

Face à cette diversité, il est nécessaire d'établir des règles générales, c'est-à-dire des pratiques culturelles communes au maximum de variétés possibles, et qui permettent de maintenir les végétaux dans un état physiologique acceptable. Pour pallier au problème d'absence de matériel végétal (pieds mères ne présentant pas de pousses utilisables) à réintroduire en cas de dégradation d'une souche au laboratoire, diverses solutions sont envisageables. Une première solution serait de constituer un parc de pieds mères à partir de matériel frais (issu d'un bouturage récent). Il pourrait en effet être intéressant de renouveler les pieds mères d'une variété donnée à la fin de chaque cycle (présenté en Figure 1), ou du moins tous les deux à trois cycles selon les espèces. Cela, de sorte à repartir le plus régulièrement possible avec des pieds mères jeunes, et à même de fournir des jeunes pousses.

Par ailleurs, il serait tout de même nécessaire de tailler régulièrement (environ toutes les 2 à 4 semaines selon les espèces) pour entretenir la juvénilité. La taille doit être opérée une fois que la reprise de végétation semble atteindre son maximum. En effet, une fois la plante stabilisée, elle va passer d'une phase de croissance rapide, à une phase de lignification, c'est donc un changement d'état physiologique. En résumé, une perte de la juvénilité. S'ensuit une différenciation des bourgeons terminaux voire axillaires en bourgeons floraux, ce qui est à l'opposé du concept même de la production de jeunes plants.

Une autre solution, qui reste à tester, serait dans le cas où cela est possible, de se passer totalement de pieds mères. Prenons l'exemple d'une variété X produite au laboratoire au début de l'année n. Au cours de cette même année, la variété X est transférée en serre d'acclimatation pour poursuivre son enracinement, dans le but d'être transférée plus tard en godet. Au cours de l'acclimatation, lorsque les plantes ont suffisamment

poussé, elles sont taillées. A partir de ces tailles, il est bien entendu possible de faire des boutures, ce qui permet au minimum de doubler le nombre de plants d'origine.

Imaginons maintenant que parmi ce matériel prêt à être bouturé, le laboratoire en prélève une trentaine, dans le but d'initier la culture de la variété X pour l'année n+2 (la production de l'année n+1 étant déjà en cours au laboratoire au moment où l'année n est en acclimatation). Ce modèle est représenté en figure 27.

Ce système permettrait de se passer de pieds mères, et donc de gagner en surface de production sous les tunnels, tout en apportant au laboratoire le matériel juvénile recherché pour l'introduction *in vitro*. Il permettrait par la même occasion de contrôler au mieux l'état sanitaire des explants introduits, puisque les plantes qui sont en serre d'acclimatation sont quotidiennement surveillées et régulièrement traitées, ce qui implique qu'elles sont moins contaminées que des pieds mères qui sont sous tunnels depuis plusieurs mois. En revanche, différents facteurs restent à vérifier : des essais d'introduction *in vitro* à partir du matériel végétal de l'acclimatation doivent être fait sur différents genres, pour vérifier que ce matériel végétal n'est pas trop fragile pour supporter les bains de désinfection. D'un autre côté, de par cette juvénilité et cet état sanitaire contrôlé, les désinfections ont-elles besoin d'être aussi sévères que celles appliquées aux explants classiques ? Enfin, à long terme, le fait de réintroduire constamment des plantes issues directement du laboratoire ne risquerait-il pas de favoriser la propagation de bactéries qui sont résistantes à nos moyens de décontamination, et qui donc se sont parfaitement adaptées aux conditions de culture *in vitro* ?

Une étude de ce système sur le modèle de *Eriostemon myoporoides* est prévue pour vérifier la possibilité d'application de ce mode de fonctionnement. Cependant, même si cette expérimentation est un succès, il serait tout de même judicieux de conserver quelques pieds mères pour pouvoir faire face à d'éventuels problèmes. Il suffirait par exemple de conserver trois pieds mères par variétés et non plus huit minimum, ce qui suffirait à relancer une introduction *in vitro*. La taille du parc de pied mère se verrait alors diminué, ce qui implique plus d'espace disponible pour d'autres cultures, mais également moins de temps à consacrer à l'entretien.

En conclusion, cette étude aura mis en avant la nécessité d'entretenir régulièrement le parc de pieds mères en suivant le principe de réitération. Cela pour permettre au laboratoire de répondre rapidement à un problème de dégradation de souche, puisqu'en effet, l'étude a confirmé que des explants à caractère juvénile présentent une reprise plus rapide *in vitro*, apportent une plus grande quantité de plantes au repiquage (du fait d'un meilleur taux de multiplication) et réduisent le taux de contamination. Ce travail a également montré que l'entreprise tient à entretenir son secteur recherche et développement en expérimentant régulièrement de nouvelles approches, et en essayant de repenser le fonctionnement du système pieds mères – introduction *in vitro* – acclimatation. Tout cela dans le but d'optimiser la production de plantes ornementale de grande qualité.

## 6. Bibliographie

### 6.1. Ouvrages

Galopin, G., & Beaujard, F. (1998). Nouvelles perspectives pour la multiplication in vivo de végétaux ligneux d'ornement.

Jacques Briant (2001). Les Arbustes et les Plantes grimpantes - Pour les régions continentales, maritimes et méditerranéennes.

### 6.2. Ressources en ligne

Beveridge, C. A., Weller, J. L., Singer, S. R., & Hofer, J. M. (2003). Axillary meristem development. Budding relationships between networks controlling flowering, branching, and photoperiod responsiveness. *Plant Physiology*, 131(3), 927-934.

Brewer, P. B., Dun, E. A., Gui, R., Mason, M. G., & Beveridge, C. A. (2015). Strigolactones inhibition of branching independent of polar auxin transport. *Plant physiology*, 168(4), 1820-1829.

Cui, X., & Harling, R. (2005). N-acyl-homoserine lactone-mediated quorum sensing blockage, a novel strategy for attenuating pathogenicity of Gram-negative bacterial plant pathogens. *European journal of plant pathology*, 111(4), 327-339.

Dun, E. A., de Saint Germain, A., Rameau, C., & Beveridge, C. A. (2012). Antagonistic action of strigolactone and cytokinin in bud outgrowth control. *Plant Physiology*, 158(1), 487-498.)

Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D. M., & Thorpe, T. A. (1996). Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 32(4), 272-289.

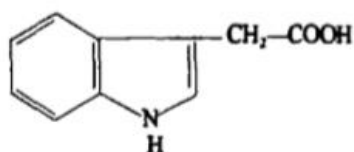
Hernández-Reyes, C., Schenk, S. T., Neumann, C., Kogel, K. H., & Schikora, A. (2014). N-acyl-homoserine lactones-producing bacteria protect plants against plant and human pathogens. *Microbial biotechnology*, 7(6), 580-588.

Mark T. Waters, Caroline Gutjahr, Tom Bennett and David C. Nelson, 2017. Strigolactone Signaling and Evolution. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2017. 68:8.1-8.31

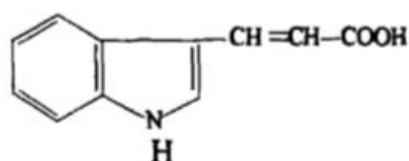
Oliveira, L. M. D., Paiva, R., Santana, J. R. F. D., Pereira, F. D., Nogueira, R. C., & Silva, L. C. (2010). Effects of cytokinins on in vitro mineral accumulation and bud development in *Annona glabra* L. *Ciência e Agrotecnologia*, 34(6), 1439-1445.

[www.lienhorticole.fr/](http://www.lienhorticole.fr/) n°965

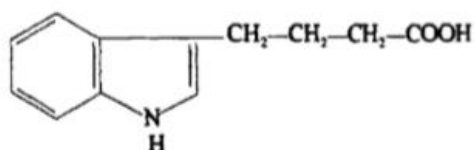
## ANNEXE I : Quelques auxines naturelles et synthétiques (extrait de Gaspar et *al*, 1996)



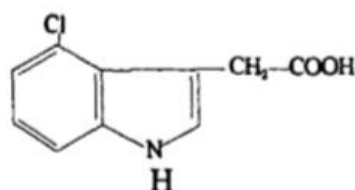
Indolyl-3-acetic acid (IAA)



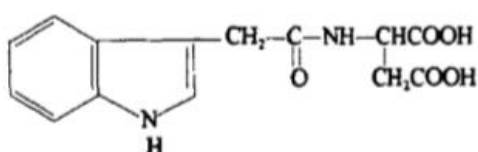
Indolyl-3-acrylic acid (IAcRA)



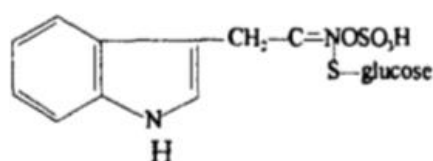
Indolyl-3-butyric acid (IBA)



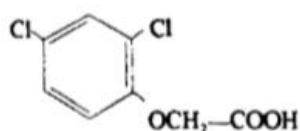
4-Cl-indolyl-3-acetic acid (4-Cl-IAA)



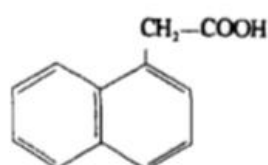
Indolyl-3-acetylaspargate



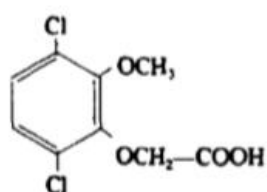
Glucobrassicin



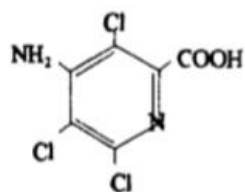
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)



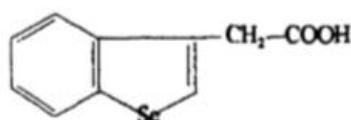
1-Naphthaleneacetic acid (NAA)



Dicamba



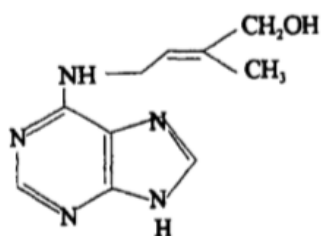
Pichloram



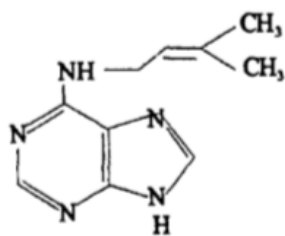
Benzo(b)selenienyl-3 acetic acid (BSAA)



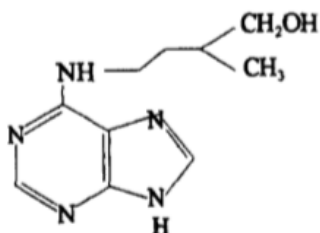
## ANNEXE II : Quelques cytokinines naturelles et synthétiques (extrait de Gaspar et *al*, 1996)



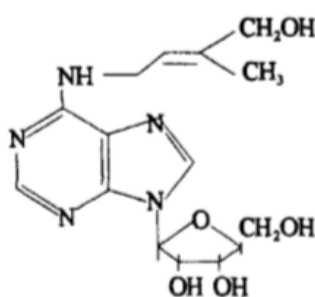
*trans*-Zeatin



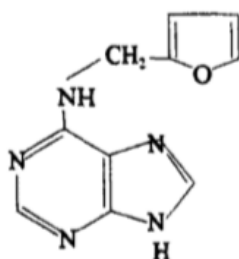
2-iP  
N<sup>6</sup>-(2-isopentyl)adenine



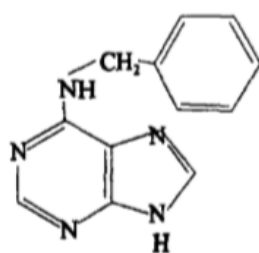
*dihydro*-Zeatin



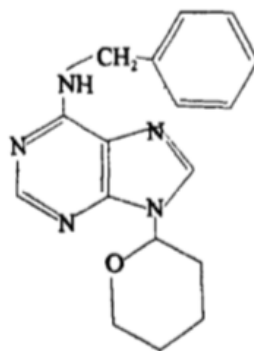
Zeatin riboside



Kinetin  
6-furfurylaminopurine



BA  
6-benzylaminopurine  
or benzyladenine



PBA  
6-(benzylamino)-9-(2-tetrahydropyranyl)-9H-purine

## ANNEXE III : Evolution au cours du temps des *Eriostemon myoporoides* en fonction des différents niveaux de taille.



a) Plants d'*Eriostemon myoporoides* avant la taille (jour 1). Les Chiffres indiqués dans les encadrés colorés correspondent au niveau de feuilles au-dessus duquel le plant sera taillé. b) Plants après la taille (jour 10). Les doubles flèches rouges montrent la taille. La flèche bleue indique un bourgeon entrain de débousser. c) Plants jour 25. La flèche jaune montre une jeune pousse d) Plants jour 33.

## ANNEXE IV : Fiche technique de l'engrais Osmocote TopDress FT

Avantages produit	Conseils d'utilisation	Doses recommandées
	Conteneurs < 10 litres	Conteneurs > 10 litre
Plantes de pépinières en conteneurs	2 - 4 g/l	20 - 40 g/pot + 1-1.5 g/l* pour chaque litre supplémentaire

\*Exemple

Dose totale pour un conteneur de 50 litres :

3 g/l pour les 10 premiers litres = 30 grammes

1 g/l pour les 40 litres restants = 50 grammes

Total = 30 + 50 = 80 grammes pour un conteneur de 50 litres

Avantages produit	Conseils d'utilisation	Doses recommandées
-------------------	------------------------	--------------------

Osmocote Topdress FT a été développé pour des applications en surfacage des conteneurs de pépinière. Il peut être utilisé pour obtenir un reverdissement rapide ou pour corriger des symptômes de carences. En cas d'utilisation de goutte à goutte, appliquer le produit sous le goutteur pour un meilleur résultat.

Osmocote Topdress FT peut être appliqué avec un applicateur d'engrais adapté. Pour plus d'informations contactez ICL Specialty Fertilizers.

Stocker à l'abri de l'humidité. Les sacs entamés ou endommagés doivent être bien refermés.

### Caractéristiques

#### Longévité

4-5 mois

#### taille de granulés

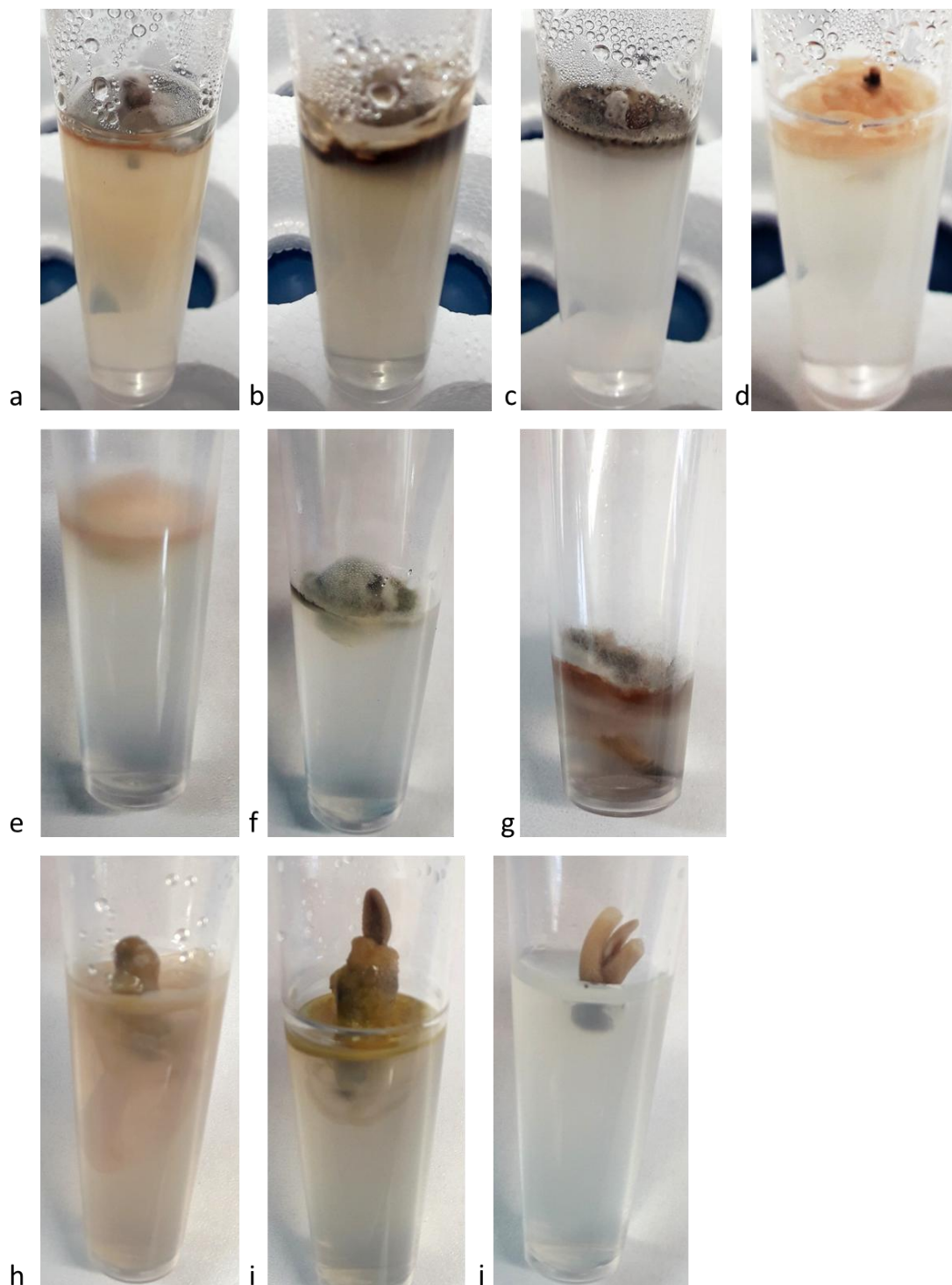
1.0-2.5mm

Oxyde	Eléments
<b>Azote total (N)</b>	<b>22%</b>
Azote nitrique (NO <sub>3</sub> -N)	4,8%
Azote ammoniacal (NH <sub>4</sub> -N)	5,9%
Azote uréique (N uréique)	11,3%
<b>Phosphore (P)</b>	<b>2,2%</b>
Soluble dans l'eau	1,6%
<b>Potassium (K)</b>	<b>5,0%</b>
Soluble dans l'eau	5,0%
<b>Magnésium (Mg)</b>	<b>1,2%</b>
Soluble dans l'eau	0,6%
<b>Fer (Fe)</b>	<b>0,80%</b>
<b>Manganèse (Mn)</b>	<b>0,30%</b>
<b>Cuivre (Cu)</b>	<b>0,050%</b>
<b>Zinc (Zn)</b>	<b>0,100%</b>

Oxyde	Eléments
<b>Azote total (N)</b>	<b>22%</b>
Azote nitrique (NO <sub>3</sub> -N)	4,8%
Azote ammoniacal (NH <sub>4</sub> -N)	5,9%
Azote uréique (N uréique)	11,3%
<b>Anhydride Phosphorique (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)</b>	<b>5%</b>
Soluble dans l'eau (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	3,7%
<b>Oxyde de potassium (K<sub>2</sub>O)</b>	<b>6%</b>
Soluble dans l'eau	6,0%
<b>Oxyde de magnésium (MgO)</b>	<b>2,0%</b>
Soluble dans l'eau	1,0%
<b>Fer (Fe)</b>	<b>0,80%</b>
<b>Manganèse (Mn)</b>	<b>0,30%</b>
<b>Cuivre (Cu)</b>	<b>0,050%</b>
<b>Zinc (Zn)</b>	<b>0,100%</b>



## ANNEXE V : Contaminations bactériennes et fongiques des tubes de culture *in vitro*, ainsi que brulure par l'hypochlorite de sodium.



De a) à i) : Contaminations bactériennes et/ou fongiques des tubes de culture. a) à d) : *Betula* 'KARACA'. e) et f) : *Agapanthe* 'DOUBLE DIAMOND'. g) *Fargesia* 'RUFA' sur milieu liquide. h) et i) : *Pachystegia* 'DAIZEA'.

j) Explant de *Pachystegia* 'DAIZEA' brûlé par l'hypochlorite de sodium.

## ANNEXE VI : Variétés utilisées pour les tests statistiques

**Tableau I :** Liste des variétés utilisées pour faire les tests statistiques liés à l'influence de la juvénilité sur le taux de contamination des explants. Les pourcentages de reprise supérieurs à 100% indique qu'un explant a fourni plus d'une plante lors du repiquage.

juvénilité de l'explant	Genre	Espèce	Variété	Nombre d'explants repris	% de reprise	% de champi	% de bactéries	% de C+B	% d'autre
juvénile	Rubus		héritage	10	100%	0%	10%	0%	0%
juvénile	Rubus		mallng promise	8	80%	25%	10%	0%	0%
juvénile	Cotinus		grace	13	130%	0%	10%	0%	0%
juvénile	Choisya	ternata	snow flurries	15	150%	0%	30%	0%	0%
juvénile	Actinidia	deliciosa	tomuri ♂	9	90%	0%	50%	20%	0%
juvénile	Cotinus		young lady	10	100%	0%	0%	0%	20%
juvénile	Lavandula	angustifolia	grasso	37	370%	0%	0%	0%	0%
juvénile	Hydrangea	quercifolia	snow queen	4	40%	0%	0%	0%	80%
juvénile	Eriostemon	myoporoides		11	110%	0%	0%	0%	0%
juvénile	Actinidia	deliciosa	solissimo	4	40%	0%	0%	0%	60%
juvénile	Actinidia	deliciosa	hayward ♀	7	70%	14%	0%	0%	20%
juvénile	Actinidia	deliciosa	solo ♂♀	8	80%	0%	0%	0%	20%
juvénile	Lavatera	thuringiaca	white angel	17	170%	0%	0%	0%	0%
juvénile	Choisya		goldfinger	9	90%	0%	0%	0%	50%
juvénile	Carpinus	betulus	fastigiata	10	100%	0%	0%	0%	0%
juvénile	Rubus		mallng promise	10	120%	0%	0%	0%	0%
juvénile	Cotinus		young lady	12	120%	0%	0%	0%	0%
non J	Rubus		héritage	10	100%	0%	30%	0%	0%
non J	Rubus		mallng promise	9	90%	0%	0%	10%	0%
non J	Sambucus	racemosa	sutherland gold	13	130%	0%	60%	10%	0%
non J	Syringa		neige briant	7	70%	0%	0%	0%	30%
non J	Amelanchier		obelisk	5	50%	0%	0%	0%	50%
non J	Pachystegia	insignis	daizea	1	10%	100%	0%	90%	0%
non J	Choisya		pink bud	12	120%	0%	10%	0%	0%
non J	Cotinus		young lady	11	110%	0%	0%	0%	0%
non J	Betula	utilis	doorenbos	10	100%	10%	30%	0%	0%
non J	Albizia	julibrissin	ombrela	5	50%	20%	0%	30%	20%
non J	Caryopteris		grand bleu	33	330%	0%	0%	0%	0%
non J	Morus	platanifolia	fruitless	10	100%	0%	0%	0%	0%
non J	Prunus	incisa	kojo no mai	7	70%	0%	0%	0%	30%
non J	Syringa	vulgaris	prince wolkonsky	10	100%	0%	0%	0%	0%
non J	Choisya	ternata	sundance	5	50%	0%	0%	0%	60%
non J	Daphne		Spring Pink Fragrance	10	100%	0%	30%	0%	10%
non J	Hydrangea	semiola	inovalaur	14	140%	21%	0%	0%	0%
non J	Eriostemon	myoporoides		10	100%	0%	0%	0%	0%
non J	Daphne	odora	perfume princess	9	90%	0%	20%	0%	40%
non J	Syringa		california rose	12	120%	0%	0%	0%	0%
non J	Cotinus		young lady	7	70%	0%	0%	0%	30%

**Tableau II :** Liste des variétés utilisées pour faire les tests statistiques liés à l'influence de la juvénilité sur le taux de reprise des explants.

juvénilité de l'explant	Genre	Espèce	Variété	Nombre d'explants repris	% de reprise	% de champignons	% de bactéries	% de C+B	% d'autre
juvénile	Rubus		héritage	10	100%	0%	10%	0%	0%
juvénile	Rubus		mallng promise	8	80%	25%	10%	0%	0%
juvénile	Cotinus		grace	13	130%	0%	10%	0%	0%
juvénile	Choisya	ternata	snow flurries	15	150%	0%	30%	0%	0%
juvénile	Actinidia	deliciosa	tomuri ♂	9	90%	0%	50%	20%	0%
juvénile	Cotinus		young lady	10	100%	0%	0%	0%	20%
juvénile	Lavandula	angustifolia	grasso	37	370%	0%	0%	0%	0%
non J	Rubus		héritage	10	100%	0%	30%	0%	0%
non J	Rubus		mallng promise	9	90%	0%	0%	10%	0%
non J	Sambucus	racemosa	sutherland gold	13	130%	0%	60%	10%	0%
non J	Syringa		neige briant	7	70%	0%	0%	0%	30%
non J	Amelanchier		obelisk	5	50%	0%	0%	0%	50%
non J	Pachystegia	insignis	daizea	1	10%	100%	0%	90%	0%
non J	Choisya		pink bud	12	120%	0%	10%	0%	0%
non J	Cotinus		young lady	11	110%	0%	0%	0%	0%
non J	Betula	utilis	doorenbos	10	100%	10%	30%	0%	0%
non J	Caryopteris		grand bleu	33	330%	0%	0%	0%	0%

## ANNEXE VII : Tests du Chi2

**Tableau I** : Test du Chi2 permettant de déterminer si la juvénilité a une influence significative sur le taux de contamination des explants. Tableau réalisé à partir des données du Tableau I de l'Annexe VI.

Effectifs observés	non contaminés	contaminés	TOTAL
juvénile	185	16	201
non J	193	38	231
TOTAL	378	54	432
Effectifs théoriques	Non contaminés	contaminés	TOTAL
juvénile	176	25	201
non J	202	29	231
TOTAL	378	54	432
Test Chi <sup>2</sup>	7,08		

**Tableau II** : Test du Chi2 permettant de déterminer si la juvénilité a une influence significative sur le taux de reprise des explants. Tableau réalisé à partir des données du Tableau II de l'Annexe VI.

Effectifs observés	repris	mort	TOTAL
juvénile	102	6	108
non J	111	19	130
TOTAL	213	25	238
Effectifs théoriques	repris	mort	TOTAL
juvénile	97	11	108
non J	116	14	130
TOTAL	213	25	238
Test Chi <sup>2</sup>	5,15		

**Tableau III** : Test du Chi2 permettant de déterminer si la contamination a une influence significative sur le taux de reprise des explants. Tableau réalisé à partir des données du Tableau I de l'Annexe VI.

Effectifs observés	repris	mort	TOTAL
non contaminé	378	49	427
contaminés	28	26	54
TOTAL	406	75	481
Effectifs observés	repris	mort	TOTAL
non contaminé	360	67	427
contaminés	46	8	54
TOTAL	406	75	481
Test Chi <sup>2</sup>	48,99		

## RÉSUMÉ

Depuis 1998, la production *in vitro* s'est imposée chez le producteur de jeunes plants André Briant Jeunes Plant. Dans le but d'améliorer le rendement des cultures, cette technique fait l'objet d'expérimentations qui visent à l'adapter au mieux aux 180 variétés concernées. L'objectif de cette étude est d'optimiser la production de pousses juvéniles sur les pieds mères, cela via des tailles et une fertilisation adaptée. Le but est d'obtenir le plus rapidement possible du matériel végétal utilisable pour l'introduction *in vitro*. Il sera d'abord nécessaire de comprendre le principe de réitération décrit par G. Galopin et F. Beaujard. En maîtrisant ce mécanisme et le fonctionnement des phytohormones qui y sont liées, il sera possible d'opérer des tailles sur les pieds mères. Celles-ci auront pour conséquence de provoquer le débourrement de bourgeons axillaires, qui formeront les jeunes pousses tant convoitées pour l'introduction de culture *in vitro*. Il s'agira ensuite de comparer l'efficacité d'une introduction *in vitro* menée à partir d'explants non juvéniles, à celle d'explants prélevés sur les jeunes pousses obtenues après les tailles. Cette comparaison prendra en compte divers critères qui sont les suivants : la capacité des explants à redémarrer, la proportion d'explants contaminés par des pathogènes, et le temps de redémarrage de la végétation. En parallèle, des traitements expérimentaux pour parer aux contaminations bactériennes et fongiques seront tester. Enfin, des solutions seront proposées pour permettre à l'entreprise d'appréhender le plus simplement possible la culture *in vitro*, tout en restant dans une logique de production de qualité en grande quantité.

**mots-clés :** juvénilité, *in vitro*, taille, pied mère, ligneux, principe de réitération, plante ornementale, débourrement, fertilisation, phytohormones, auxine, cytokinine

## ABSTRACT

Since 1998, the *in vitro* production came obvious at the producer of seeding André Briant Jeunes Plant. With the goal of improving the culture productivity, this technology is in the foreground of testing which aim is to improve at best the 180 concerned types. The objective of this study is to maximize the production of juvenile shoots on parent plants, this thanks to adapted pruning and fertilization. The goal is to obtain quickly vegetal material which will be used for the *in vitro* introduction. First, it will be important to understand the reiteration principle described by G. Galopin and F. Beaujard. By mastering this mechanism and the working of plant hormones which are linked to it, it will be possible to perform specific pruning on mother roots. Those will have in result to cause axillary budding, which will form the juvenile shoots which is coveted for the *in vitro* culture introduction. It will be necessary to compare the efficacy of an *in vitro* introduction led from no juvenile explant culture, and explant culture removed from juvenile shoots after this pruning. This comparison will take different criteria which are the following : the start explants culture capacity, the explants proportion infected by pathogen, and the restarting time of the vegetation. Parallel, experimental treatments used to block bacterial and fungal contamination will be tested. Finally, solutions will be proposed to help the company to comprehend as easiest as possible the *in vitro* culture, and guarantee a quality production in huge quantity.

**keywords :** juvenility, *in vitro*, pruning, parent plant, ligneous, reiteration principle, ornamental plant, budding, fertilization, plant growth regulator, auxin, cytokinin