

# THÈSE

présentée

A LA FACULTÉ DES SCIENCES  
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR DE 3<sup>ème</sup> CYCLE

Spécialité : PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE

par

Henri RABÉCHAULT  
Maître de Recherches de l'ORSTOM

---

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE  
DE LA PHYSIOLOGIE DE LA FLORAISON DU CHRYSANTHÈME  
A L'AIDE DE LA CULTURE IN VITRO DE BOUTONS FLORAUX

---

Soutenue le *24 juin 1967* devant la Commission d'Examen

Jury	{	MM. P. CHOUARD	}	Président
		P. CHAMPAGNAT		Examineurs
		R. SCHNELL		

O.R.S.T.O.M.

PARIS

1967

T H E S E

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES

DE L'UNIVERSITE DE PARIS

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR DE 3ème CYCLE

Spécialité : P h y s i o l o g i e V é g é t a l e

par

Henri RABECHAULT

Maître de Recherches de l'ORSTOM

C O N T R I B U T I O N A L ' E T U D E  
D E L A P H Y S I O L O G I E D E L A F L O R A I S O N  
D U C H R Y S A N T H E M E A L ' A I D E D E L A C U L T U R E  
" I N V I T R O " D E B O U T O N S F L O R A U X

Soutenue le *24 juin 1967* devant la Commission d'Examen

Jury : MM. P. CHOUARD Président  
P. CHAMPAGNAT  
R. SCHNELL Examineurs

O.R.S.T.O.M.  
PARIS  
1 9 6 7

## A v a n t - P r o p o s

Les résultats des recherches qui font l'objet du présent mémoire ont été obtenus en grande partie au Laboratoire du Phytotron du C.N.R.S. à Gif-sur-Yvette, sous la direction de Monsieur le Professeur P. CHOUARD, et au Laboratoire de Physiologie de la croissance et du développement des plantes tropicales de l'O.R.S.T.O.M. à Bondy.

Pour réaliser un tel travail, les idées et le matériel ne suffisent pas; les relations comptent pour beaucoup. A cet égard, j'ai eu la chance de ne jamais sentir autour de moi ni vide ni indifférence, mais de trouver, que ce soit parmi mes maîtres et mes supérieurs ou parmi mes collègues et le personnel des laboratoires que j'ai fréquentés, la confiance, la compréhension, ainsi qu'une aide amicale et efficace. C'est la raison pour laquelle j'ai contracté de nombreuses dettes de gratitude.

Monsieur le Professeur P. CHOUARD, qui fut mon maître pendant ces vingt dernières années, m'a fait bénéficier de son enseignement et de son érudition et, malgré les charges écrasantes qui l'accablaient de plus en plus, il n'a jamais cessé de m'encourager, de suivre mes travaux avec intérêt, d'aplanir toutes les difficultés et cela, toujours avec la plus grande bienveillance et une infinie bonté. C'est lui qui a éveillé en moi un intérêt croissant pour la Physiologie végétale. Il me fait l'honneur de présider le Jury de cette thèse et je voudrais lui dire combien je l'en remercie du fond du coeur et l'assurer de ma profonde reconnaissance et de mon fidèle attachement.

Je désire associer à cet hommage Monsieur le Professeur P. CHAMPAGNAT : je puis en effet affirmer que, sans son impulsion, sans la confiance qu'il m'a témoignée, sans les précieux conseils qu'il m'a prodigués toujours avec tant de bienveillance, ce travail n'aurait sans doute jamais vu le jour. J'ai bénéficié de ses connaissances très étendues et précises et, malgré ses nombreuses obligations, il a bien voulu être le rapporteur de ma thèse et en lire le texte avec attention; c'est grâce à ses remarques très pertinentes que le manuscrit a pu trouver sa forme définitive. Je suis heureux de lui témoigner ici ma déférente et profonde gratitude qui se double du désir de profiter, je l'espère, plus largement de son immense savoir tout de clarté et de précision.

C'est au Muséum National d'Histoire Naturelle que j'ai connu Monsieur le Professeur P. SCHNELL; nous avons alors la même passion : la Taxinomie et la biologie des plantes tropicales. Lorsque j'ai frappé à nouveau à la porte de son laboratoire pour lui présenter ce manuscrit, il m'a reçu avec la plus cordiale sympathie. Avec la minutie qui lui est coutumière, il a examiné le texte de ma thèse, lequel a beaucoup gagné à ses justes critiques. Je l'en remercie très sincèrement.

Lorsqu'ayant fait les premiers pas dans ces recherches, je me suis trouvé devant un problème inattendu, celui de la formation de tumeurs sur des boutens couronnes de chrysanthèmes, j'ai eu la chance de bénéficier de la grande expérience et des inestimables conseils de Monsieur le Professeur G. CAMUS. En sa qualité de Directeur Général de l'Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer, il m'a fait l'honneur de sa bienveillante attention et a bien voulu porter quelque intérêt à mes travaux. Je tiens à l'assurer ici de ma très sincère reconnaissance et de mon profond respect.

Il m'est agréable aussi de remercier vivement les membres du Comité technique permanent de Botanique et de Biologie végétale de l'ORSTOM, Messieurs les Professeurs G. MANGENOT, G. LEMEE, R. HELLER, qui m'ont permis de poursuivre mes recherches sur les Chrysanthèmes, parallèlement à mes occupations régulières aux Services Scientifiques Centraux de l'ORSTOM à Bondy.

J'ai eu souvent recours à mon parrain, Monsieur le Professeur R. HELLER, à son immense savoir, à la clarté de son raisonnement et à ses conseils très précieux dont j'ai tiré le plus grand profit. Qu'il veuille bien croire en ma très sincère gratitude.

J'adresse à Mr et Mme NITSCH mes remerciements et l'expression de ma vive sympathie pour leurs précieux conseils et l'accueil très amical qu'ils m'ont réservé dans leur laboratoire au Phytotron de Gif-sur-Yvette. Au moment le plus critique de mes travaux, leur grande expérience et leur cordiale sollicitude m'ont été d'un grand secours pour la réalisation de mes premiers essais de cultures "in vitro".

Je ne saurais oublier enfin tous ceux qui, à des titres divers, m'ont apporté leur concours et leurs encouragements :

Mr. BOSSARD, Professeur de Floriculture à l'Ecole Nationale d'Horticulture de Versailles, m'a fait profiter de ses connaissances dans le domaine de la Taxinomie des plantes horticoles.

Mr. FERON, Président de la Section "Chrysanthèmes" de la Société Nationale d'Horticulture de France, spécialiste réputé, a bien voulu identifier le matériel végétal sur lequel ont porté mes expériences.

Mr. LEMAIRE, jardinier professionnel du C.N.R.S. à Gif-sur-Yvette, a préparé avec art les potées nécessaires à l'examen pratique par Mr. FERON.

Mes collègues du Phytotron à Gif-sur-Yvette m'ont témoigné toujours leur amicale sympathie et leurs encouragements.

Les jardiniers du Phytotron et des S.S.C. de Bondy, MM. RENAULT, MASSET, PETIT, BILLARD et CHRISTMANN, ont avec beaucoup de patience, de talent et de complaisance multiplié et entretenu mes chrysanthèmes.

Mme RABECHAULT, Melle SCHEIDECKER, M. HANOVER, Mme GUENIN, m'ont prêté leur concours efficace pour les analyses minérales et les dosages de sucres.

J'ai toujours trouvé aussi une collaboration amicale et efficace auprès du personnel du laboratoire de Physiologie de la croissance des plantes tropicales de l'O.R.S.T.O.M.

à Bondy; M. GUENIN a mis en place et conduit avec art mes expériences dans les serres de Bondy et a assuré leur succès; Mme AHEE m'a aidé au Laboratoire avec beaucoup de dévouement, non seulement dans mes recherches mais aussi pour l'interprétation statistique des résultats et dans la tâche ingrate de la dactylographie du manuscrit.

Enfin M. BONNET-DUPEYRON, Chef du Service de Documentation de l'O.R.S.T.O.M., et ses collaborateurs, ont avec gentillesse et beaucoup de complaisance fait un effort méritoire pour que ce manuscrit puisse être prêt dans les meilleurs délais, malgré les difficultés matérielles qu'ils ont dû surmonter.

A tous j'adresse mes très sincères remerciements.

## S o m m a i r e

### I n t r o d u c t i o n .....

Difficultés de réalisation .....	2
a. Nécessité d'une standardisation du matériel .....	2
b. Effet de l'excision .....	3
c. Survie et déviation du métabolisme .....	4

### H I S T O R I Q U E

Evolution des organes floraux en milieu non aseptique et études sur la floraison "in vitro" .....	5
a. Evolution des organes floraux et des fleurs séparés d'une plante, en milieu non aseptique ou dans la nature .....	5
b. Evolution d'organes floraux en culture "in vitro" .....	8
c. Travaux sur la mise à fleur d'apex végétatifs en culture "in vitro".	12
d. Néof ormation de fleurs "in vitro" à partir de culture de tissus végétatifs ou floraux .....	15
e. Culture de plantules "in vitro" de la germination à la fructification	19
f. Conclusions .....	20

### M A T E R I E L   E T   M E T H O D E S

A. Matériel .....	25
I. Matériel utilisé pour la mise à fleurs .....	25
a. Photopériodisme .....	25
b. Froid .....	26

II. Matériel pour la préparation des boutons floraux (prélèvement, désinfection et ensemencement) .....	26
a. La boîte à gants .....	26
b. La soutireuse .....	27
c. Les flacons à désinfection .....	29
d. L'aiguille à ensemercer .....	29
III. Matériel pour la culture "in vitro" des boutons floraux .....	29
a. Les tubes de culture .....	29
b. La salle de culture .....	30
B. Méthodes .....	30
I. Méthode pour la production de boutons floraux standards .....	30
a. Description sommaire de la variété Souvenir de Georges Péchou .....	31
b. Examen succinct des exigences ecophysiologiques de la variété Souvenir de Georges Péchou - Clône de serre tiède .....	32
1. Effets de la température .....	33
2. Effets de la longueur du jour .....	33
Forme et structure des boutons floraux des plantes en jours longs et des plantes en jours courts - Choix des boutons floraux pour les cultures aseptiques.	
3. Effets de l'obscurité .....	36
c. Mise au point de la méthode de préparation des plantes pour la production de boutons standards .....	36
1. Multiplication végétative en jours longs .....	37
2. Mise à fleurs .....	38
. Temps de prétraitement par les jours longs .....	38
. Variation saisonnière du temps de mise à fleurs par les jours courts .....	42
3. Conclusions - Méthode adoptée pour la production de boutons standards .....	42
II. Méthode de prélèvement, de désinfection et d'ensemencement des boutons floraux .....	43
a. Critique de la méthode habituelle .....	44
1. Déshydratation des organes .....	44
2. Stérilisation de l'atmosphère de la salle d'ensemencement .....	44
3. Stérilisation du matériel végétal .....	44
4. Stérilisation du papier et température des pinces .....	45

b. Méthode de prélèvement, de désinfection et d'ensemencement des boutons floraux .....	45
1. Prélèvement .....	45
2. Préparation du matériel pour la désinfection .....	46
3. Désinfection .....	46
III. Le milieu de culture - Mise au point d'un milieu de base .....	47
a. Les éléments minéraux .....	48
1. Besoins du Chrysanthème en éléments minéraux pendant la floraison.	50
2. Analyses minérales de Chrysanthèmes Souvenir de Georges Péchou (clône de serre tiède) en floraison .....	51
b. Les sucres .....	59
c. Les substances diverses .....	61
d. Préparation du milieu nutritif de base .....	62
IV. Observations et interprétations des résultats .....	64
RESULTATS EXPERIMENTAUX .....	65
A. Eléments macrotrophiques .....	65
I. Eléments minéraux .....	65
Comparaison de l'effet d'une solution minérale de Knop à celui d'une solution minérale F pour deux concentrations en saccharose .....	66
II. Effets des sucres .....	70
a. Le saccharose .....	70
b. Le glucose .....	76
c. Le fructose .....	79
d. Conclusions .....	82
B. Eléments microtrophiques .....	83
I. Acide $\beta$ -indolyl-acétique .....	83
II. Acide $\alpha$ -naphtyl-acétique .....	87
III. Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique .....	88
IV. Acide gibbéréllique ou gibbérélline $A_3$ .....	90
V. Acide 2,3,5-triiodobenzoïque .....	92
VI. Kinétine ou 6-furfuryl-aminopurine .....	94
VII. Kinétine et acide $\beta$ -indolyl-acétique .....	96
VIII. Acide gibbéréllique et kinétine .....	98



DISCUSSION .....	101
a. Préparation du matériel végétal .....	102
b. La méthode de culture "in vitro" .....	103
c. Effets des sucres .....	105
d. Effets des stimulateurs de la croissance .....	108
e. Effets de l'acide triiodobenzoïque .....	109
f. Effets de la kinétine seule ou en présence de stimulateurs de croissance .....	111
g. Réversions florales "in vitro" .....	113
h. Valeur du test .....	114
CONCLUSIONS GENERALES .....	116
Bibliographie .....	120
Planches .....	147

## I n t r o d u c t i o n

Le Chrysanthème est un matériel de choix pour l'étude de la physiologie de la floraison. Il a été utilisé à cette fin par de nombreux chercheurs et les résultats obtenus constituent à présent une base solide pour de nouvelles investigations. L'utilisation de plantes entières n'est pas toujours commode et l'hétérogénéité de leurs réponses à un même traitement, même dans le cas de cultures monoclonales, limite les possibilités de la méthode.

La culture d'organes isolés standardisés permet au contraire une expérimentation plus précise. A ma connaissance, la culture de fleurs et de boutons floraux de chrysanthème n'a jamais été tentée. On verra en ce qui concerne d'autres espèces végétales, au chapitre consacré à l'Historique, que le comportement de fleurs en survie dans la nature aussi bien qu'en culture "in vitro", a été observé depuis une cinquantaine d'années, mais les auteurs de ces travaux ne voyaient pas là une technique pour la recherche systématique des facteurs de la floraison.

Le principe de l'étude des processus physiologiques de la floraison à l'aide de la culture "in vitro" d'organes floraux ou d'ébauches florales excisés repose sur l'idée que de tels organes ne peuvent continuer à se différencier et à évoluer normalement que s'ils disposent dans le milieu de culture, des éléments qui leur étaient auparavant dispensés par la plante.

Il est intéressant de s'adresser, dans une première étape, à des boutons floraux en voie de développement parce que leur évolution peut s'opérer de plusieurs manières qui reflètent bien les processus qui provoquent ou empêchent la floraison. Ainsi, leur évolution peut se poursuivre (épanouissement, formation de nouveaux fleurons, etc.), ralentir, s'arrêter ou revenir en arrière vers l'état végétatif (réversion).

Or, le Chrysanthème (Composées) présente sous ce rapport des caractères intéressants; la fleur est un capitule constitué par un ensemble de fleurons se développant à l'abri de bractées sur un plateau ou réceptacle commun (Planche VII, fig. 3). Au début de son développement, le réceptacle est nu, absolument lisse (Planche VIII, fig. 1 et 2) et sur cette surface apparaissent les centres organisateurs qui forment les fleurons (Planche VIII, fig. 3 et Planche IX, fig. 2). On a donc la possibilité d'agir sur cette transformation d'un tissu dont la destinée est déjà "inscrite" dans chacune de ses cellules. Le principe du retour en arrière est représenté par le phénomène de la réversion des fleurons à partir desquels peuvent se former des branches végétatives.

D'autre part, comme le réceptacle peut donner chez le Chrysanthème deux sortes de fleurs (hermaphrodites et femelles), il est possible d'étudier les effets d'un traitement sur la distribution des sexes.

Le bouton floral au stade de la différenciation des fleurons est donc une véritable "balance" qui permet d'évaluer avec précision les effets des divers facteurs de la mise à fleur, de la floraison et de la différenciation florale.

Le but de cette contribution est de rechercher les conditions qui favorisent le maintien en survie "in vitro" de boutons de chrysanthème en voie de développement et pour cela de mettre au point un milieu de culture convenable. Mais on aurait tort de croire en la simplicité d'une telle tentative.

#### DIFFICULTES DE REALISATION.

Les principales difficultés semblent au premier abord de trois sortes : la standardisation du matériel qui permettrait d'assurer un maximum d'homogénéité et de "certitude" des réponses aux traitements, les effets possibles de l'excision sur l'évolution des jeunes boutons floraux, la déviation du métabolisme propre aux organes isolés.

##### a. Nécessité d'une standardisation du matériel végétal.

Malgré la sélection poussée dont le Chrysanthème\* a été l'ob-

---

\* Selon M. BOSSARD, Professeur de floriculture à l'Ecole Nationale d'Horticulture de Versailles, nos Chrysanthèmes sont tous issus de souches en provenance du Japon, lesquelles étaient toutes des hybrides. On doit par conséquent, selon les nouvelles normes internationales, désigner ainsi nos variétés cultivées : Chrysanthemum morifolium Ram.<sup>x</sup> C. indicum Sal. - c.v. (cultivar) ...

jet, il n'en subsiste pas moins une certaine hétérogénéité, même lorsqu'il s'agit de cultures monoclonales. La forme des boutons et leur structure dépend du "passé physiologique" des plantes. Ainsi après des jours longs, il y a production de boutons couronnes munis de nombreuses et importantes bractées foliacées, tandis qu'en jours courts les boutons sont plus petits, plus arrondis et sans bractées libres. De même, sur une plante élevée en jours courts, la forme et la structure du bouton terminal ne sont pas tout à fait identiques à celles des boutons naissant à l'aisselle des feuilles et appelés ici "boutons satellites". Parmi ces derniers, il existe aussi toute une gradation, leur vitesse de développement est d'autant plus lente qu'ils se forment plus bas sur la tige.

Afin d'assurer un maximum d'homogénéité dans les réponses aux divers traitements, il était donc nécessaire de choisir une variété stable, qui réponde toujours de la même manière aux traitements photopériodiques, et d'autre part, de suivre l'évolution des boutons issus de ces plantes, de manière à bien connaître le moment favorable du prélèvement et la forme du bouton la plus compatible avec la mise en culture "in vitro".

#### b. Effets de l'excision.

On peut se demander si le fait d'isoler, d'exciser un organe n'a pas de fâcheuses conséquences sur l'évolution de celui-ci et si l'excision ne déclenche pas de réactions de défense et une sorte de "choc opératoire" qui le conduirait à la mort ou tout au moins à une sorte d'état "sub mortem" caractérisé par une vie très ralentie impossible à stimuler.

Si le "choc opératoire" après l'excision existe chez le Chrysanthème, il est peu marqué et n'induit ni la mort ni l'arrêt définitif de l'évolution. J'ai pu le vérifier en greffant des boutons excisés sur des Chrysanthèmes de la même variété (Souvenir de Georges PECHOU\*) induits à fleur. La croissance a été ralentie pendant les premières 48 heures et le développement n'a repris que 5 à 7 jours après le greffage. Il y a eu un léger retard par conséquent par rapport aux témoins restés sur les plantes, mais l'évolution des boutons s'est ensuite effectuée de la même manière; le retard était sans doute dû au temps nécessaire à la reprise de la greffe (Planche VII, fig. 4).

En conséquence, si l'on place un bouton excisé sur un milieu nutritif renfermant les substances indispensables à son évolution (substances analogues à celles biosynthétisées par le chrysanthème en voie

\* Chrysanthemum morifolium Ram. x C. indicum Sal. - c.v. Souvenir de Georges PECHOU.

de floraison) il doit se développer de la même manière qu'un bouton resté ou greffé sur une plante.

### c. Survie et déviations du métabolisme.

Dans l'expérience précitée, le bouton a été replacé sur son support naturel. Or, en culture "in vitro", il n'est plus soumis aux corrélations de croissance du reste de la plante et ne reçoit plus de cette dernière les éléments macro et microtrophiques indispensables. A moins que le milieu soit "idéal", on peut considérer que le bouton est livré à lui-même, à ses propres ressources et à celles qu'il est capable de puiser dans le milieu nutritif, à condition que les substances dont il a besoin s'y trouvent.

On peut considérer par conséquent le bouton floral excisé comme un organe en "survie" dont la croissance et le développement sont momentanément suspendus. Les travaux relatifs aux organes excisés (fruits, fleurs coupées) ont mis en évidence une augmentation notable de leur respiration, une diminution de leur teneur en carbohydrates, une accélération des oxydations cellulaires (ULRICH, 164, 375, 376 - PAULIN et ULRICH, 132). Les organes verts ont plus de chances de survie que les fruits parce que la photosynthèse leur apporte un complément de métabolites et les fruits ont eux-mêmes plus de chances que les fleurs parce que leurs réserves sont plus abondantes.

Dans la nature, les organes floraux isolés de la plante, en général fragiles, et affaiblis par ces déviations du métabolisme et par les dégradations inutiles et excessives des métabolites, ne tardent pas à mourir; leur fin est le plus souvent accélérée par l'intervention d'agents pathogènes dont ils sont la proie facile.

La technique des cultures "in vitro" permet d'éliminer la possibilité d'une attaque par les bactéries ou les champignons. Cependant, le milieu nutritif doit être assez riche non seulement pour contrebalancer les dégradations, mais aussi pour permettre la poursuite du développement et de la croissance. Ce sont les substances oligodynamiques de ce milieu, favorisant l'évolution normale du bouton floral, qui nous intéresseront plus particulièrement.

Ce travail comportera donc trois parties essentielles : un Historique grâce auquel nous ferons le point des résultats déjà acquis dans le domaine de la culture des organes floraux et des travaux sur la floraison "in vitro"; un chapitre Matériel et Méthodes dans lequel seront exposées la Méthode de préparation du matériel standard et la technique de culture aseptique utilisées; enfin une troisième partie sera consacrée à l'étude de l'effet des principaux éléments macro- et microtrophiques.

## HISTORIQUE

### EVOLUTION DES ORGANES FLORAUX ISOLES EN MILIEU NON ASEPTIQUE OU ASEPTIQUE ET ETUDE DE LA FLORAISON "IN VITRO"

La technique des cultures de tissus ou d'organes "in vitro" qui a été appliquée depuis une vingtaine d'années à l'étude du problème de la physiologie de la floraison est un moyen pour prolonger la "survie" des organes isolés et pour leur permettre de poursuivre leur développement. Nous examinerons donc d'abord comment se comportent des boutons floraux, des fleurs ou des inflorescences isolés des plantes dans la nature, en milieu non aseptique. Puis nous ferons l'analyse des résultats obtenus grâce à l'utilisation de la technique des cultures "in vitro" : culture des fleurs ou boutons floraux, mise à fleur d'apex végétatifs, néoformation des fleurs et enfin mise à fleur de jeunes plantules en milieu aseptique.

#### a. Evolution d'organes floraux et de fleurs séparés d'une plante en milieu non aseptique ou dans la nature.

La survie d'un organe floral séparé d'une plante dépend de certains caractères, morphologiques, anatomiques, biochimiques, etc. qui confèrent à cet organe la possibilité de se suffire à lui-même pendant une période plus ou moins longue. L'importance des réserves, la faculté de cicatrisation des plaies (section), la résistance aux agents pathogènes, un faible coefficient respiratoire, sont autant de caractères qui autorisent une vie autonome prolongée et multiplient les chances d'évolution.

Il faut ajouter à cela la faculté de biosynthèse de l'organe isolé et qui peut, dans une certaine mesure, compenser ainsi ses pertes en éléments macro et microtrophiques; les feuilles et autres organes végétatifs ont cette possibilité mais non les fleurs car elles ne peuvent alimenter leur biosynthèse par une assimilation du carbone; elles sont en général pauvres en pigments chlorophylliens (bractées et sépales mis à part).

Les organes floraux ont donc peu de chances de survivre dans la nature et ce phénomène reste le privilège de quelques espèces. BAILLON (cf. LA RUE, 101) a remarqué des ovaires de *Jussiaea*, qui, après avoir formé des racines, ont pu se transformer en fruits. GOEBEL (86, 87) cite plusieurs exemples de la formation de racines sur les pédoncules ou les fleurs de diverses espèces de la famille des Cactacées et des genres *Ajuga*, *Klugia*, *Naegelia*, *Tussilago*, etc. Le même phénomène a pu être observé par KUPFER (95) sur les fleurs et les inflorescences d'*Echeveria*, de *Bryophyllum*, de *Ruellia*, de *Primula* et d'*Achimenes*. Enfin, BOUILLENNE et WENT (72) ont signalé aussi l'apparition de racines sur les fruits d'*Opuntia*. On peut constater dès à présent, que les organes floraux des espèces crassuléscentes qui résistent mieux à la déshydratation et renferment une quantité importante de matières de réserve, sont mieux adaptés à la vie autonome. D'autre part, le phénomène observé le plus couramment est le retour vers l'état végétatif (apparition de racines).

On trouve dans la littérature de nombreux exemples d'expériences réalisées sur des organes floraux en survie. Je n'en citerai que quelques-uns.

DOSTAL (81) a provoqué la tubérisation et la rhizogénèse d'une jeune inflorescence terminale isolée de *Scrophularia nodosa* simplement en la plaçant en atmosphère humide.

En 1949, DEBRAUX et GAVAUDAN (79) ont étudié les phénomènes d'histogénèse de pièces du périanthe des fleurs de *Lilium candidum* en survie, simplement en les trempant dans une solution d'acide naphthalène acétique et en les bouturant dans du sable. Bien que l'extrémité des organes flétrissait assez rapidement, des callosités se formaient sous l'influence de l'hormone. L'évolution histogénique a été tout à fait comparable à celle des feuilles en survie; des bractées ont donné des racines et même des bulbilles ce qui confirmerait leur nature foliaire.

SCHAEVERBEKE (148) a utilisé des étamines prélevées dans des épillets de Graminées et constaté, en les plaçant en milieu humide, que l'allongement de leur filet était identique à celui des étamines restées sur les plantes. Le phénomène, très sensible au manque d'oxygène et qui ne peut se produire qu'avec des étamines adultes, semble donc lié à la respiration. Les jeunes étamines ne peuvent allonger leur filet qu'en présence d'une solution molaire de saccharose; les auxines n'ont eu aucune action. Cet auteur a déterminé récemment (146) que les étamines absorbaient le saccharose (marqué  $^{14}\text{C}$ ) de façon sélective au moment de l'anthèse. Ces résultats sont à comparer à ceux de VASIL (165 à 167) qui a cultivé des étamines "in vitro" (voir le chapitre suivant).

Ici encore, dans ces trois exemples, nous voyons que les organes floraux peuvent poursuivre une croissance, former des racines,

tubériser, former des cals, s'allonger même comme des organes végétatifs mais non évoluer dans le sens "floral".

Evidemment, lorsque les fleurs sont séparées de la plante avec une partie végétative plus ou moins importante, leurs chances d'évolution sont augmentées. C'est cette faculté qui est mise à profit par les horticulteurs et les fleuristes. La physiologie des "fleurs coupées" rappelle celle de la plante entière (WOLZ, 170 a étudié la photosynthèse des fleurs coupées de Chrysanthème) et c'est la raison pour laquelle elle ne peut être évoquée ici. Retenons cependant deux faits. Nous avons vu que le Saccharose peut jouer un rôle important dans l'allongement des fillets staminaux. Ce n'est qu'un exemple pris au hasard et on retrouve l'action bénéfique des sucres dans de nombreuses publications sur le maintien d'organes en survie. Les sucres empêchent en général le flétrissement des "fleurs coupées"; le saccharose retarde la chute des fleurs surtout s'il est associé au Bore, élément minéral dont le rôle est lié au métabolisme des sucres (AARTS, 378, BELYNSKAYA, 379, CHKOLNIK et coll., 311). Enfin, lorsque l'on a affaire à une inflorescence, il a été constaté des migrations importantes d'eau et de substances azotées et hydrocarbonées, d'une partie à l'autre, vers les fleurs en voie d'épanouissement. La floraison de chaque fleur correspond à une mobilisation de substances minérales et hydrocarbonées accompagnée d'une augmentation de l'intensité respiratoire.

PAULIN et ULRICH (132) ont alimenté des fleurs d'Iris en glucose marqué pendant 24 heures ou pendant des temps qui variaient entre 0 et 40 heures. Ils ont observé que la quantité de  $C^{14}$  absorbée augmentait régulièrement en fonction du temps, mais que le maximum d'activité physiologique des fleurs (synthèse et accumulation de substances marquées, respiration) avait lieu juste avant l'épanouissement. Lorsque la fleur vieillit, les synthèses à partir du glucose marqué diminuent car le  $C^{14}$  absorbé est accumulé ou participe aux oxydations cellulaires.

Au contraire, à la fin de la floraison, la fanaison des fleurs concorde avec une migration en sens inverse des composés minéraux et organiques et avec une perte d'eau (COMBES, 77, 314, 386; ERICKSON, 349; GRIESEL et BIALE, 352; JAMES et BEEVERS, 91; SIEGELMAN, 152; SIEGELMAN, CHOW et BIALE, 370; ULRICH et PAULIN, 164.)

Ces résultats sont confirmés aussi en ce qui concerne les rapports entre le transport de l'eau et la floraison par les travaux de BOUILLENNE et de ses collaborateurs, auxquels il sera fait appel pour la discussion des résultats de cette étude.

En résumé, certaines espèces ont des fleurs qui sont mieux adaptées que d'autres à une vie autonome. L'évolution d'un organe floral isolé d'une plante se fait habituellement vers un retour à l'état végétatif; l'évolution vers l'état floral implique une mobilisation



importante de substances minérales et surtout de sucres, elle correspond en général à une augmentation de l'intensité respiratoire.

La méthode des cultures aseptiques permet d'apporter les substances indispensables à l'évolution florale et, en préservant les organes contre les agents pathogènes, d'augmenter leurs chances de survie.

#### b. Evolution d'organes floraux en culture "in vitro".

C'est LA RUE (100, 101) qui, à ma connaissance, a utilisé le premier cette technique. Dans un très beau travail publié en 1938 (101), cet auteur adoptant un milieu de White additionné de 20 % de saccharose et 10 mg/l d'acide ~~indolyl~~ indolyl acétique, réussit la culture "in vitro" des fleurs de plantes appartenant à 12 espèces, 9 genres et 3 familles de Monocotylédones et 80 espèces, 74 genres et 34 familles de Dicotylédones. Bien que de nombreuses contaminations soient venues contrarier l'évolution des cultures, LA RUE obtint l'apparition de racines sur de nombreuses fleurs chez 3 genres appartenant à 2 familles de Monocotylédones et chez 25 espèces de 15 familles de Dicotylédones. Mais ces racines n'atteignaient rarement plus de 1 centimètre de long. Bon nombre de fleurs donnaient des racines même sur un milieu sans auxine. Les racines apparaissaient en général sur le pédoncule mais aussi souvent à la base de l'ovaire lorsque le pédoncule était enlevé (Kalanchoe, Impatiens, Freesia, Tradescantia, Tournesol, Calendula, Taraxacum). La polarité est la même que chez les organes végétatifs; les racines se formaient en effet toujours à la base des organes (pédicelles, pétales ou ovaires).

LA RUE a observé également des abscissions du pédicelle des fleurs d'un *Gasteria* après 11 jours de culture, de *Merium Oleander* après 17 jours, etc. et des abscissions de l'ovaire après 3 mois de culture chez le Tournesol et le Calendula.

Ce qui a retenu surtout l'attention de cet auteur, c'est la possibilité de "régénération" d'une plante entière à partir des fleurs. Il a constaté à ce point de vue que les fleurs de nombreuses espèces peuvent, grâce aux cultures "in vitro", se comporter comme des organes végétatifs et tout au moins former des racines. Mais la formation de bourgeons et de bulbilles restait, malgré l'aseptie, le privilège des espèces crassuléscentes qui se multiplient très facilement dans la nature à partir de leurs feuilles (*Kalanchoë*, *Nemesia*, *Begonia*, *Echeveria*). La formation d'un cal était tout à fait exceptionnelle (pétales et étamines d'*Hibiscus rosa-sinensis*, bractées des capitules de *Calendula officinalis* et base des pédicelles d'un *Kalanchoë*). Des intumescences étaient visibles sur la surface des sépales des fleurs de tomate reposant sur le milieu de culture.

Quelques espèces ont développé des fruits d'un volume normal

comme la tomate et le *Kalanchoë rotundifolia*.

Dans une autre publication, LA RUE (100) a mis l'accent sur la longévité des tissus et des pièces florales en culture. Des morceaux de pétales et des poils d'étamines de *Tradescantia paludosa* ont vécu pendant près d'un an.

En 1949, NITSCH (118) a repris le travail de LA RUE, en ce qui concerne la culture des fleurs et la prolifération de l'ovaire de Tomate (*Lycopersicum esculentum* L.) "in vitro". Sur un milieu simple, à base de solution minérale de Knop, de saccharose, de vitamine B<sub>1</sub> et de cystéine, il n'a pas obtenu de développement de l'ovaire. Pour cela, il fallait qu'il ajoute du jus de tomate verte ou mûre au milieu de culture. Les fruits ainsi formés étaient d'une taille appréciable mais sans pépin (parthénocarpiques), NITSCH pensait que cela était dû à un défaut de pollinisation des fleurs avant leur mise en culture. La formation de racines n'avait lieu qu'à l'obscurité et non à la lumière sur les pédoncules et correspondait à un arrêt de la croissance momentanée du fruit en diamètre.

La même année, JANSEN et BONNER (92) réussissaient à faire développer des fruits à partir de la culture de fleurs d'une autre espèce de tomate (*Lycopersicum pimpinellifolium*).

En 1951, NITSCH (119) reprit ses recherches sur la fructification des fleurs de tomate et entreprit également la culture de fleurs de haricot (*Phaseolus vulgaris* L.), de cornichon (*Cucumis anguria* L.), de tabac (*Nicotiana tabacum* L.) et d'un hybride *Fragaria chiloensis* x *F. virgatum*, sur un milieu de Knop au demi avec 50 % de saccharose auquel il ajoutait : des oligo-éléments, des vitamines, des acides aminés, des purines. Il obtint à nouveau la fructification des fleurs fécondées de tomate, de *Cucumis anguria* et de tabac, mais chez ce dernier les graines n'étaient pas viables. En l'absence de fécondation, il n'y avait pas d'évolution sensible des fleurs. Des hormones de croissance ajoutées au milieu provoquaient la formation de fruits parthénocarpiques chez les fleurs non pollinisées. A l'obscurité, un cal et des racines se formaient sur le pédicelle des fleurs et les ovaires de tomate, de *Cucumis anguria* et de *Phaseolus vulgaris*. Les auxines accéléraient cette formation (acide 2-naphtoxyacétique, 10 mg/l, acide 2,4-dichlorophénoxyacétique 1 à 10 mg/l, le lait de coco à 20 %, etc.). La croissance des fruits fut également stimulée par les auxines.

Jusqu'en 1958, la technique de la culture d'ovaire "in vitro" fut exploitée par plusieurs auteurs. RAU (140) l'a adoptée pour étudier l'influence de la colchicine sur les premiers développements de l'embryon et de l'albumen du *Phlox Drumondii*. Il obtint un développement comparable à celui des fleurs demeurées sur les plantes. MAHESHWARI et LAL (105, 106) ont réussi à leur tour la culture d'ovaires d'*Iberis amara*. Enfin, SACHAR et BALDEV (143) ont cultivé avec succès des ovaires

de fleurs pollinisées de *Linaria Maroccana* Hook, sur un milieu renfermant une solution de Knop au demi, des oligo-éléments selon la formule de White et des hormones de croissance. Les ovaires se développaient moins rapidement que chez les fleurs restées sur la plante, mais l'extrait de levure améliorait leur croissance. Le pourcentage de fruits formés "in vitro" était aussi plus faible que dans les conditions naturelles (40 à 80 % contre 90 à 95 %). Mais en revanche, la maturation était plus rapide "in vitro". Les graines obtenues mettaient plus longtemps à germer que les graines normales et il y avait une forte proportion de graines vides.

SACHAR et BALDEV ont constaté comme LA RUE et NITSCH la formation de cals et de racines sur les pédicelles des fleurs et à la base des ovaires, phénomène qui était intensifié par l'extrait de levure, la Kinétine (0,5 mg/l), l'AIA (5 mg/l), l'AIB (5 mg/l), le 2.4.D (2 mg/l) et l'adénine (5 à 10 mg/l). A l'inverse de la tomate, chez laquelle l'apparition des racines retarde pour un temps la croissance et la maturation des fruits, chez le *Linaria*, la maturation était plus rapide avant le plein développement des racines.

C'est également à la culture "in vitro" que se sont adressés J.H.D. KOSAN (94) pour ses recherches sur l'incorporation de cytidine tritiée dans les anthères de *Lilium longiflorum* et VASIL (166, 167) qui a suivi l'évolution des acides nucléiques dans les anthères excisées d'Oignon (*Allium cepa*) et de Pavot (*Rheo discolor*) cultivées sur milieu de White.

Les étamines (cf. BLAKE, 69) ne pouvaient donner du pollen normal que si elles étaient prélevées après un certain stade; le stade leptotène de la méiose n'a pas été atteint. Le milieu complexe utilisé par VASIL ne renfermait donc pas le "stimulus" ou les éléments dispensés par la plante et qui permettent aux jeunes étamines de franchir un stade critique de leur développement.

Enfin, TOPONI (163) a montré que des fragments de bractées d'artichaut pouvaient être cultivés "in vitro" en présence d'AIA, de 2.4.D, de Kinétine et de lait de coco. Ces fragments se comportaient ensuite comme beaucoup de tissus "végétatifs" à savoir qu'ils formaient des cals et présentaient aussi des phénomènes de polarité et de dorsal-ventralité. Ces résultats rappellent ceux obtenus par DEBRAUX et GAVAUDAN (loc. cit.) et appellent les mêmes remarques. En 1960, RABECHAUULT (135, 136) a signalé que des boutons floraux de chrysanthème en culture "in vitro" présentaient un maximum de croissance, de floraison, en présence de 80 % de saccharose, l'AIA, le 2.4.D inhibaient la floraison tandis que la gibbérelline n'avait une action que sur l'allongement des pédoncules. PREM PURI (134) qui a cultivé des épis, des fleurs et des ovaires d'*Aerva japonica* (Burm. F.) Spreng. sur milieu de Knop gélosé additionné de 50 % de saccharose a observé que l'AIA améliorait légèrement la formation des graines mais que l'hydrolysat

de caséine et le lait de coco accroissaient, à 400 ppm, la production de graines de 25 %.

Le développement "in vitro" des différentes parties (sépalés, pétales, étamines, ovaire) d'une fleur excisée sous l'influence de diverses substances chimiques a fait l'objet ces dernières années de plusieurs études minitieuses aux États-Unis. Ces travaux sont l'oeuvre de deux équipes, celle de LANG qui s'intéresse au développement des fleurs unisexuées de Concombre et celle de TEPFER qui s'est adressée aux fleurs d'Aquilegia.

On sait que chez le Concombre, les sexes sont séparés sur la plante et qu'il existe le long de la tige des fleurs mâles et des fleurs femelles. Il est facile de connaître à l'avance le sexe des fleurs, car il dépend de la position occupée sur la tige par les boutons floraux, et de préparer des lignées monofques avec des fleurs à "potentialité" mâle ou à "potentialité" femelle (GALUN, 83).

La physiologie de la floraison de cette plante a été très bien étudiée par plusieurs auteurs (LAIBACH et KRIBBEN, 97, 98; GALUN, 82). ATSMON et GALUN (69) ont observé chez le Concombre qu'un bouton floral, après un stade bisexué, évolue finalement vers un sexe ou l'autre sous l'influence de la balance auxinique au niveau du noeud de la tige sur lequel il est situé. Evidemment, tous les facteurs susceptibles d'influencer la balance auxinique d'un noeud de la tige (forme et âge de la feuille, photopériodisme, thermopériodisme, métabolisme de l'azote, etc.) ont ainsi la possibilité d'agir sur le sexe de la fleur qui s'y trouve. GALUN, JUNG et LANG (84, 85) en cultivant "in vitro" des boutons floraux à potentialité mâle, c'est-à-dire prélevés sur des plantes et des noeuds qui auraient dû fournir des fleurs mâles ont montré que l'acide <sup>β</sup> indolyl-acétique (AIA) à la concentration de 0,1 mg/l provoquait le développement de l'ovaire de ces fleurs, tandis que les étamines étaient inhibées\*. La gibbérelline (GA<sub>3</sub>) semblait réduire l'effet de l'AIA en permettant, lorsque ces deux substances étaient mélangées, un meilleur développement de ces étamines (fleur sub-bisexuée). Cependant, la gibbérelline n'avait aucun effet sur leur différenciation (histogénèse). Les boutons à potentialité femelle ou hermaphrodite continuaient leur développement normal et étaient peu affectés par la présence d'AIA et de gibbérelline dans le milieu.

TEPFER, GREYSON, CRAIG et HINDMAN (161), puis TEPFER et KARPOFF (162) ont réussi la culture de boutons floraux d'Aquilegia formosa Fisch. sur des milieux nutritifs très complets comprenant des éléments minéraux, du saccharose (2 %), des vitamines, des acides aminés, des auxines, du lait de coco, etc.

\* HESLOP-HARRISON (409 a pu empêcher "in vivo" la floraison et modifier l'expression des sexes chez le Chanvre; il a obtenu des résultats similaires.

Les sépales se développaient comme dans les fleurs restées sur la plante, mais cependant aux dépens des autres pièces qui restaient de taille réduite. Les auteurs en ont conclu que les sépales jouent un rôle inhibiteur. Chez les fleurs où les sépales étaient sectionnées, le développement des pétales ne commençait que lorsque celui des autres pièces était terminé.

Les étamines avortaient avant que les carpelles ne se développent; elles s'allongeaient, leur filet et leur sac pollinique prenaient une apparence normale et brusquement elles se flétrissaient et mouraient. Cependant, en inhibant l'ovaire par blessure ou par des inhibiteurs, les étamines se développaient quelquefois. Les étaminodes évoluaient peu et avaient l'aspect de petites écailles comme les pétales. Les carpelles se développaient par contre comme dans les fleurs demeurées sur la plante.

L'addition d'AIA, de Gibbérelline et de Kinétine au milieu de base permettait aux différentes pièces florales de poursuivre leur évolution un peu plus longtemps et améliorait le développement des carpelles.

Après initiation, les divers organes de la fleur ont des processus de développement différents. Il est même probable, à mon avis, qu'à l'intérieur de la fleur des équilibres hormonaux contrôlent le développement de telle ou telle partie à un moment déterminé par le jeu de stimulations ou d'inhibitions localisées comme sur la plante entière (corrélations de croissance).

Cette technique des cultures de fleurs en milieu aseptique peut donc nous permettre une meilleure connaissance de la physiologie de la floraison, mais aussi de la fleur.

#### c. Travaux sur la mise à fleur d'apex végétatifs en culture "in vitro".

La première observation sur la mise à fleur d'apex "in vitro" a été faite dès 1933 par WHITE (169). Cet auteur avait obtenu le développement de fleurs de *Stellaria* à partir d'apex de plantes induites à fleur avant prélèvement, et même des floraisons spontanées à partir de cultures provenant de plantes non induites bien que n'ayant fait varier aucun facteur particulier. Les cultures étaient effectuées en "goutte pendante" dans la solution minérale d'Hoagland additionnée de 20 % de saccharose. LOO en 1946 (103, 104) à son tour a obtenu "in vitro" la floraison d'apex de *Cuscuta campestris*, plante de jours courts, même en l'absence de feuilles et de racines.

Plus récemment, en 1959, TCHAILAKIAN et BUTENKO (158) ont provoqué la mise à fleur d'apex de *Perilla* en culture aseptique sous

l'influence de l'adénine et de la kinétine.

BALDEV (65) a repris les expériences de L00 (103) en 1962. Ayant maintenu des apex de *Cuscuta* (*Cuscuta reflexa*) sur un milieu gélosé renfermant des éléments minéraux (White modifié) et 50 % de saccharose et à la lumière naturelle du laboratoire, il eut la surprise de constater qu'ils continuaient leur développement végétatif. Tandis que d'autres apex sur le même milieu mais conservés à l'obscurité fleurissaient dans une proportion de 90 %. Soixante douze heures d'obscurité suffisaient à déclencher la floraison et le pourcentage maximum (100 % de mise à fleur) était atteint avec 132 heures d'obscurité.

Les apex eux-mêmes étaient malgré tout sensibles au photopériodisme car la floraison se produisait lorsque les nuits ne restaient pas inférieures à 14 h. (jours de 0 à 10 h.). Le sucre pouvait satisfaire dans une certaine mesure le besoin en lumière.

MIGINIAC et CHOUARD (113) ont cultivé aseptiquement des noeuds cotylédonaire ou caulinaires de *Scrofularia arguta* Sol. Chaque segment comprenait un noeud duquel les cotylédons ou la paire de feuilles avaient été sectionnés. Lorsque le segment était en contact avec le milieu par l'intermédiaire de la section proximale, la tige, les bourgeons axillaires évoluaient en inflorescence même en dyspériode (9 h. d'éclairement) ou à l'obscurité, mais si la relation avec le milieu s'effectuait par l'intermédiaire de racines, les bourgeons formaient des pousses végétatives. J'ai obtenu des résultats similaires (travail non publié) à l'aide de boutures de l'extrémité de tiges induites à fleur de *Chrysanthème*, var. *Mélobie*. Les boutures étaient placées en diverses photopériodes dans du sable humide. En jours courts, la floraison du bouton terminal s'est poursuivie; en jours longs (dyspériode) les boutons floraux ont continué une évolution lente, tant que les racines ne se sont pas formées, puis ils ont été inhibés et ont donné des pousses végétatives dès que l'enracinement a été assez important.

HENRICKSON (90) a cultivé des gemmules de graines de tournesol accompagnées ou non de morceaux plus ou moins importants de cotylédons et provoqué leur floraison. RAGHAVAN et JACOBS (138) ont cultivé sur milieu de White des apex de *Perilla frutescens* (L.) Britt. maintenus en jours longs ou en jours courts. Les apex étaient cultivés seuls munis de leurs feuilles inductrices ou en présence de feuilles inductrices détachées.

En jours courts, les apex se transformaient à partir du 31ème jour de culture et donnaient des fleurs normales au bout de 81,6 jours. Par contre, en jours longs il se formait soit un cône stérile ou bien les bourgeons restaient végétatifs. La transformation de l'apex en jours courts avait lieu immédiatement sans émission de feuilles nouvelles. Les jours longs provoqueraient la formation d'un inhibiteur supprimant

les 2 premiers stades du développement. Tandis qu'en jours courts, si les feuilles inductrices étaient détachées elles secrétaient également un inhibiteur qui supprimait le deuxième stade de développement seulement. Les auteurs ont pensé qu'il existe deux inhibiteurs chez le *Perilla* cultivé en conditions défavorables à la floraison et que celui qui, dans les deux cas, inhibe le stade II est analogue et pourrait être l'auxine.

RAGHAVAN (137) dans une autre publication a montré que l'auxine inhibe en deux jours la floraison d'apex prélevés sur des plantes (*Perilla*) induites à fleur en jours courts. Avec 0,1 mg/l ( $10^{-7}$ ) les apex ne donnaient plus que des cônes floraux stériles (fleurs avec calice et corolle sans organes reproducteurs). En jours longs ou en jours courts, les apex prélevés avec la première paire de feuilles restaient végétatifs lorsqu'ils étaient cultivés en présence de 100 mg/l d'AIA. Mais les apex prélevés avec les première et deuxième paires de feuilles fleurissaient comme si ces dernières détruisaient l'auxine ou l'empêchaient d'agir.

Enfin, GRIESEL et CAPLIN (89) ont observé la transformation "in vitro" d'apex de *Cestrum diurnum* en boutons floraux sous l'influence de fragments de feuilles ayant reçu les traitements d'induction florale (photopériodisme). Il semble que le facteur (florigène) formé dans la feuille ait pu diffuser dans le milieu pour provoquer l'évolution de l'apex en bouton floral, ce qui n'avait pu être obtenu jusqu'ici. En culture "in vitro", les apex (*Cuscuta*, 100, 103, 104; BALDEV, 65) et (*Perilla frutescens*, RAGHAVAN et JACOBS, 138) peuvent en conditions favorables se transformer d'emblée en fleur semble-t-il donnant des graines viables, mais le plus souvent il leur faut reconstituer auparavant une petite plante avec une tige, des feuilles et parfois des racines.

Sur un milieu complexe, BLAKE (69) a cultivé des apex de *Viscaria candida* et *V. cardinalis*, plantes de jours longs. Lorsque les apex étaient prélevés avec 1 à 2 paires de feuilles, ils donnaient des fleurs "in vitro" après avoir formé un nombre de feuilles identique à celui des plantes entières. Si les apex étaient prélevés sur des plantes ayant reçu un minimum d'induction par les jours longs, ils se développaient parfois végétativement. Lorsque les apex étaient prélevés au moment où les sépales des fleurs étaient formés, alors les jours longs aussi bien que les jours courts n'avaient plus d'influence sur la mise à fleur. Les petits apex se développaient rarement en fleurs à moins de posséder une paire de feuilles. Par contre, si tous les primordia de la fleur existaient avant le prélèvement, même sur de très petits apex (300 à 2000  $\mu$ ), alors la fleur se développait normalement. Enfin, lorsque les apex avaient une longueur de plus de 2 mm et surtout quand le prélèvement comprenait aussi quelques paires de feuilles, le milieu complexe de Blake a permis l'obtention de fleurs normales depuis les

premiers stades du développement jusqu'à la maturité, avec la production de pollen et d'ovules également normaux.

Ces dernières années, quelques chercheurs sont parvenus à provoquer une transformation presque immédiate de tissus végétatifs en tissus floraux.

d. Néοformation de fleurs "in vitro" à partir de cultures de tissus végétatifs ou floraux.

La néοformation des fleurs "in vitro" a été observée pour la première fois par SKOOG (155) en 1955 sur des cals produits par des fragments de tige de tabac Wisconsin 38. Il attribuait cette néοformation à la présence d'acide  $\alpha$  phényl-butyrique dans le milieu de culture.

Les recherches sur la néοformation des fleurs "in vitro" n'ont véritablement commencé qu'en 1961 : RODRIGUES PEREIRA (141) obtint des fleurs sur des disques de tiges d'Iris et CHOUARD et AGHION (75) sur des fragments de hampe florale de Tabac. Ces derniers cultivaient des tronçons de hampe florale de tabac Wisconsin 38 (variété de jours longs préférente) sur un milieu de base renfermant une solution minérale de Knop, 30 % de saccharose seulement et quelques vitamines et hormones. La néοformation des fleurs n'était constatée qu'à la lumière. Cette faculté disparaissait lorsque les auteurs s'adressaient à des fragments prélevés de plus en plus bas sur la tige (gradient de floraison). Des tronçons provenant de plantes adultes en fleurs pouvaient néοformer des boutons floraux, tandis que des tronçons identiques du sommet des tiges de tabac non fleuries en étaient incapables. Il s'agissait donc de "l'expression" de fleurs à partir de tissus déjà florifères.

AGHION (57, 58, 59) a précisé que la formation d'un cal sur les tronçons de hampe florale pouvait s'effectuer à l'obscurité mais non celle des fleurs. Les sucres paraissent indispensables à la néοformation; en leur absence, il n'est apparu que des bourgeons végétatifs. Les fleurs obtenues évoluaient en fruits et donnaient des graines viables mais seulement à la lumière et en jours longs. Malheureusement, la néοformation de fleurs n'a pas pu être répétée en utilisant d'autres variétés et notamment des variétés de jours longs et de jours courts absolues, et le greffage de cals ou de fragments de hampe n'a pas permis de transmettre l'aptitude à fleurir. La "propension à fleurir" se transmet à la fleur néοformée; les fragments de son pédoncule peuvent régénérer des fleurs. La kinétine enfin ferait disparaître la propriété de néοformation de fleurs et empêcherait sa transmission au cal (CHOUARD, 74). Il y a une taille optimum des tronçons qui provoque un optimum de néοformation (2 à 10 mm) (CHOUARD, 74; AGHION-PRAT, 62).

Plus tard, AGHION-PRAT (62) a précisé l'effet des sucres;



l'optimum pour le saccharose et le glucose se situe à 0,25 M soit 50g/l pour le glucose et 75 à 100 g/l pour la saccharose; à 0,5 M, il y a inhibition de la formation des fleurs. Ce n'est pas la kinétine qui est inhibitrice, comme CHOUDARD et AGHION l'avaient annoncé précédemment (74, 75), mais la gibbérelline et ceci dès 0,03 mg/l ( $3 \cdot 10^{-8}$ ); la formation des fleurs est nulle à 0,4 mg/l ( $4 \cdot 10^{-7}$ ) de GA. La gibbérelline provoque la transformation des boutons néoformés en bourgeons si l'action de la gibbérelline a lieu entre les 3ème et 12ème jours; plus tard, l'effet est moins important. L'auxine inhibe également la floraison. Quant à la kinétine, elle la stimule surtout en présence d'AIA, lorsque ces deux substances sont en faibles concentrations (0 à  $10^{-7}$  de K avec 0 à  $5 \cdot 10^{-7}$  d'AIA). De fortes concentrations en AIA et de faibles concentrations en K stimulent la rhizogénèse. De fortes concentrations en K ( $10^{-6}$  à  $10^{-5}$ ) combinées à toutes concentrations en AIA (0 à  $10^{-5}$ ) stimulent au contraire la production des bourgeons végétatifs. Enfin, il y a une gamme intermédiaire de concentrations en kinétine et AIA où l'organogénèse est faible. PAULET (129) a confirmé quelques-unes de ces observations (AIA-kinétine et saccharose) en s'aidant du *Nicotiana suaveolens*, espèce dont les fragments de hampe ne donnent en général que 5 à 8 % de cultures fleurissantes. En élevant la concentration du milieu à 80 % de saccharose, 25 % de cultures produisaient des fleurs. De plus, cet auteur a observé une action stimulante de plusieurs composés phénoliques (acide p-coumarique, ac. chlorogénique à  $10^{-5}$ ). Une combinaison 80 % de saccharose, 0,1 mg/l de kinétine et  $10^{-5}$ M d'acide p. coumarique lui a permis d'élever la proportion des cultures fleurissantes à 58 %. Chez d'autres plantes comme le *Datura*, il existe aussi, semble-t-il, un gradient de floraison comme sur le tabac Wisconsin 38 que MOTAMED-GHORBANLI (114) a pu mettre en évidence grâce à la culture de fragments de hampe florale, mais la néoformation des fleurs n'est pas une propriété des tissus de la hampe florale des Solanacées, YAMADA (171) en 1963 a provoqué la néoformation de racines et de boutons floraux sur des tissus floraux de *Lilium*, de *Crinum* et de *Tradescantia* et plus récemment en 1964, PAULET et NITSCH (130, 131) ont observé pour la première fois la néoformation de fleurs sous l'influence de l'acide p-coumarique, sur des tissus de racine d'endive vernalisée, partie essentiellement végétative et très éloignée pourtant de l'inflorescence.

NITSCH et NITSCH (122) ont confirmé ces résultats ensuite et pu obtenir la néoformation de fleurs, non seulement à partir de racines mais aussi de fragments de feuilles d'endives vernalisées ou non; la vernalisation des tissus ayant malgré tout un effet stimulant. Des variétés précoces peuvent donner des fleurs "in vitro", mais ces fleurs sont en général anormales (MARGARA, 108). MARGARA (107) a repris ces travaux et montré que le "gradient floral" n'existe pas chez l'endive, alors qu'il l'a rencontré chez la Betterave et le Colza (106). Cette propriété de la distribution générale de la "propension" des tissus à fleurir oppose donc l'endive aux autres plantes : Tabac, Betterave,

Colza et Datura.

Les fortes concentrations en saccharose stimulent la production des fleurs par les tissus de racine d'endives vernalisées 50 % (PAULET, 129), 60 % (MARGARA, 108, 109). Le saccharose peut être efficacement remplacé par d'autres sucres : glucose, fructose, lactose, galactose et raffinose (MARGARA et RANCILLAC, 111).

Les éléments minéraux du milieu jouent également un rôle important pour la néoformation et le développement des boutons floraux chez l'endive. MARGARA et RANCILLAC (112) ont récemment constaté que les éléments minéraux selon la formule de Murashige et Skoog donnaient de meilleurs résultats que ceux des formules de Knop, White, Heller ou Knudson. Ils ont montré que de fortes concentrations en azote  $\text{NO}_3^-$  favorisent, comme celles de sucre, la néoformation des fleurs. En portant de 15 à 60 m.e./l la quantité d'azote, l'optimum de saccharose 75 g/l peut être abaissé à 51,45 et même 25 g/l.

L'auxine inhibe la néoformation des fleurs à  $10^{-6}$  (MARGARA, RANCILLAC et BECK, 109; PAULET, 129) et ce qui paraît logique, une anti-auxine l'acide triiodobenzofique ( $10^{-6}$ ), augmente la proportion des bourgeons floraux (MARGARA, RANCILLAC et BECK, 109) mais PAULET (129) n'a pas trouvé pour sa part cet effet stimulant du ATIB. Contrairement au Tabac Wisconsin 38, l'acide gibbérellique ne se comporte pas avec les tissus d'endive comme un inhibiteur, mais comme un stimulant léger de la floraison ( $10^{-8}$  à  $10^{-7}$ ), (MARGARA, RANCILLAC et BECK, 109). Cependant, la gibbérelline ne peut remplacer la vernalisation des racines (PAULET, 129); vernalisation qui n'est en fait nécessaire que chez les variétés tardives (MARGARA et RANCILLAC, 111).

La kinétine provoque la montaison des boutons floraux néoformés sur des tissus de racines d'endives vernalisées et elle a tendance à stimuler la formation de bourgeons floraux sur des tissus de racines d'endives non vernalisées (PAULET, 129). Le fait que les tissus floraux renferment souvent des composés anthocyaniques ou flavoniques a permis de penser que certains composés phénoliques ou leurs précurseurs pouvaient être impliqués dans la floraison. PAULET et NITSCH (130, 131) puis PAULET (129) ont mis en évidence un effet stimulant de l'acide p-coumarique ( $10^{-5}\text{M}$ ) de l'acide chlorogénique ( $10^{-6}\text{M}$ ) et de la phénylalanine sur la floraison de racines d'endives; l'acide shikimique, la quercitine et le kempferol étaient inactifs (PAULET, 129).

NITSCH, C., puis NITSCH, C. et J.P. NITSCH (117) ont provoqué la néoformation de fleurs sur des fragments de tiges végétatives de *Plumbago indica* L., plante de jours courts absolue. Ils ont pu induire "in vitro" la formation des fleurs par le photopériode, comme BALDEV (65) avec les apex de cuscute, RAGHAVAN (137) et RAGHAVAN et JACOBS (138) avec les apex de *Perilla*, puis GRIESEL et CAPLIN (89) avec les apex de

Cestrum vus précédemment. Les quantités optimum de saccharose sont inférieures à celles exigées par les tissus florifères des autres espèces (20 à 30 ‰). Mais comme pour ces dernières, les concentrations inférieures à l'optimum de la floraison (>20 ‰) provoquent la néoformation de bourgeons végétatifs même en jours courts. Le saccharose peut être remplacé, comme dans le cas des explantats de racines d'endive, par le maltose ou même le cellobiose, mais non par le mannitol et le lactose.

Les auxines et les gibbérellines inhibent la production des boutons floraux, mais non l'adénine et les cytokinines. La guanine, la thymine, la cytosine et l'uracile sont inefficaces, mais la thymine ou son précurseur, l'acide orotique, stimulent la floraison quand le milieu renferme déjà de l'adénine et de la kinétine. Enfin, les cis- et trans abscissines II ont également un effet bénéfique sur la floraison lorsque les cultures sont exposées aux jours courts, mais non en jours longs.

C'est également à une plante de jours courts, le *Streptocarpus nobilis* C.B. Clarke, que se sont adressés récemment ROSSINI et NITSCH (142) pour provoquer la néoformation de fleurs sur des morceaux de feuilles en culture "in vitro". Les fragments prélevés sur des plantes maintenues végétatives (jours longs) ont donné au bout d'un mois des boutons floraux s'ils étaient cultivés en jours courts, et des bourgeons végétatifs en jours longs. Ici aussi, comme dans le cas du *Plumbago indica* L exposé ci-dessus, la kinétine et d'autres cytokinines ont stimulé la formation et le développement des boutons floraux. L'acide gibbérellique a inhibé la floraison, mais contrairement à ce qui a été obtenu avec d'autres espèces, l'acide indolyl acétique s'est comporté comme un stimulateur.

Ces résultats concordent donc, dans l'ensemble, avec ceux des auteurs qui ont observé le comportement d'organes floraux excisés en milieu non aseptique ou dans la nature, et avec ceux qui ont utilisé les cultures "in vitro" d'apex ou de boutons floraux. La principale remarque que l'on peut faire aux chercheurs qui se sont consacrés à l'étude de la néoformation des fleurs sur les tissus cultivés "in vitro" porte sur le "passage" d'un soi-disant état végétatif à l'état floral. En effet, dans la majorité des cas, les bourgeons reforment de véritables petites plantes avec racine, tige et feuilles, ou avec tige et feuilles, ces dernières pouvant être réduites au minimum. Or, dans le cas du tabac, il semblait, selon AGHION (58, 59) et AGHION-PRAT (62), que la fleur était formée "d'emblée". Malheureusement, à mon avis il n'est pas évident que le retour préalable à l'état végétatif soit absent, car les fleurs formées ne procèdent pas directement des tissus végétatifs d'origine et l'essai de démonstration cytohistologique d'AGHION (60, 63) n'est guère convaincant.

En culture "in vitro", il n'est pas possible de dire également si les méristèmes gemmaires qui apparaissent parmi les cellules du cal sont végétatifs ou floraux, et si leur destin floral ne s'inscrit pas après une phase de développement juvénile ou végétatif plus ou moins courte. D'ailleurs, le destin des méristèmes gemmaires n'est influençable qu'entre le 3ème et le 12ème jour sous l'influence de la gibbérelline chez le tabac (AGHION-PRAT, 62) et vers le 14ème jour sous l'influence de la photopériode (jours longs) chez l'endive (PAULET, 129). D'autre part, la néoformation des fleurs ne se produit que s'il y a formation d'un cal (tissu végétatif ou tout au moins non floral), et si l'on provoque une prolifération cellulaire "in vivo" sur la hampe florale de tabacs entiers à l'aide d'une inoculation d'*Agrobacterium tumefaciens*, il y a apparition de fleurs néoformées sur les tumeurs (AGHION, 60, 61).

Le cal se comporterait comme un tissu végétatif ou intermédiaire puisque les substances du milieu nutritif sont obligées de le traverser avant de parvenir au point de néoformation des fleurs. Or, il peut être considéré comme à peu près certain qu'à cette faveur, ces substances sont en partie métabolisées par les tissus de l'explantat ou du cal. Le cal représenterait la phase végétative nécessaire à l'accomplissement du cycle vital normal. La preuve en est que la néoformation ne peut s'accomplir qu'à la lumière et que les cultures sont sensibles au photopériodisme comme le serait un végétal entier (Photopériode de 18 h pour les tissus de racines d'endives selon PAULET, 129). D'ailleurs, il y a une certaine grosseur d'explantat au-dessous de laquelle il n'est pas possible d'obtenir de fleurs, que ce soit chez l'Endive (MARGARA et RANCILLAC, 111) ou chez le Tabac (AGHION-PRAT, 62). Il faut donc qu'il y ait une certaine surface, un certain volume de tissu mère pour capter l'énergie lumineuse ou pour biosynthétiser, comme le ferait la plante, les produits florigènes nécessaires à l'expression et au développement des fleurs, ceci à partir de précurseurs présents dans les tissus de hampe florale de tabac (accumulés à la faveur de la mise à fleur des plantes entières) ou dans les racines d'endives (accumulés à la faveur d'un traitement de vernalisation). La biosynthèse du "florigène", ou la transformation du méristème gemmaire en méristème végétatif puis floral, sont stimulées par l'action de la lumière de façon indiscutable.

#### e. Culture de plantules "in vitro" de la germination à la fructification.

Des méthodes pour la mise à fleur et la fructification de jeunes plantules "in vitro" ont été mises au point par plusieurs chercheurs dans le but d'études génétiques et des relations hôte-parasite. Citons les études de LAIBACH (96) et celle de LANGRIDGE (99) sur *Arabidopsis Thaliana*, de LEO (104) sur *Bacteria Chrysostoma* et de STEINBERG (396) sur *Nicotiana rustica*. Les résultats de ces auteurs confirment en général ceux obtenus

par les techniques exposées précédemment. Ainsi, STEINBERG (396), élevant des plantules de *N. rustica* sur des milieux plus ou moins riches en saccharose, a observé que la concentration optimum pour la mise à fleur était de 100 ‰.

Enfin, OKONKWO (125 à 128) a réussi à faire germer et à obtenir "in vitro" des jeunes plantes de *Striga senegalensis*, espèce parasite des cultures de Maïs et de Sorgho en Afrique. Il incorpore au milieu un extrait de racine de Sorgho et utilise le milieu minéral de MURASHIGE et SKOOG qui lui a donné, comme MARGARA et RANCILLAC pour leurs travaux sur l'endive (113), de meilleurs résultats que le Knop. Les petites plantes fleurissent "in vitro" après 4 mois  $\frac{1}{2}$  et donnent des graines viables. Elles ne semblent dépendre du Sorgho, lorsqu'elles le parasitent, que pour leur alimentation en eau et en azote. Les quantités de sucre requises sont moins importantes (20 ‰ de saccharose) que pour le tabac ci-dessus, étudié par STEINBERG (396). Par contre, le *Striga* a besoin de grandes quantités d'azote qui peuvent être fournies sous forme organique (400 mg/l de glutamine).

#### f. Conclusions.

Les travaux que nous venons d'analyser vont nous permettre de dégager les principales idées directrices qui seront utiles pour réussir avec le maximum de chances à provoquer une "évolution florale in vitro" des boutons floraux de chrysanthème en voie de développement.

Les organes floraux en survie dans un milieu non aseptique et surtout en l'absence de tout élément nutritif ne peuvent évoluer que chez certaines espèces particulièrement adaptées. En général, l'évolution se fait alors toujours dans le sens d'un retour vers l'état végétatif.

La culture "in vitro" permet de prolonger la survie, mais il se produit également un retour vers l'état végétatif si certaines conditions ne sont pas réunies (quantités trop faibles de sucre - ex. expériences de LA RUE, 101, fécondation de la fleur - ex. expériences de NITSCH, 118, 119).

Quels sont les facteurs qui semblent agir sur l'évolution vers l'état floral ?

##### 1. La lumière.

La lumière est utile à la formation et au développement des fleurs, bien que les apex de certaines espèces peuvent former des fleurs à l'obscurité (*cuscuta*; BALDEV, 65 ou le *Scrofularia arguta*, en l'ab-

sence de racines; MIGINIAC et CHOUARD, 113).

Il est possible d'induire "in vitro" la mise à fleur d'apex végétatifs isolés en photopériode convenable : ex. chez la cuscute, BALDEV, 65; le *Perilla*, RAGHAVAN, 137 et RAGHAVAN et JACOBS, 138; le *Cestrum*, GRIESEL et CAPLIN, 89; le *Viscaria*, BLAKE, 69, etc. De même, la néoformation des fleurs "in vitro" à partir de tissus inflorescentiels a pu être améliorée en soumettant les cultures à des photopériodes inductives (Hampe florale de *Tabac*; AGHION-PRAT, 62; PAULET, 129, etc.) ou à partir de tissus végétatifs comme la racine d'endive (PAULET et NITSCH, 130), des fragments de tiges végétatives de *Plumbago indica* L (NITSCH et NITSCH, 122) ou des fragments de feuilles (*Streptocarpus*; ROSSINI et NITSCH, 142).

Par contre, les fleurs et les boutons floraux sont insensibles au photopériodisme, bien que la lumière soit favorable à leur développement; il est donc utile d'éclairer les cultures.

2. La respiration est augmentée chez les organes en survie et chez les plantes au moment de la formation des fleurs. Pour faciliter l'évolution vers l'état floral, il est semble-t-il indispensable d'assurer une bonne respiration des cultures.

3. Les éléments minéraux, en particulier l'azote et le bore sont utiles à la formation des fleurs (COMBES, 77, 314), à leur maintien en survie (AARTS, 378, 380 ; BELYNSKAYA, 379) ou à leur néoformation "in vitro" (MARGARA et RANCILLAC, 112).

4. Les sucres favorisent aussi la survie des fleurs ou leur néoformation. De fortes concentrations en saccharose sont nécessaires; avec les faibles concentrations, 20 à 30 %, les fleurs ne se forment pas ou évoluent végétativement. Une seule exception est présentée par le *Plumbago indica* L., pour lequel l'optimum n'est que de 20 à 30 % (NITSCH et NITSCH, 117). Le saccharose est habituellement utilisé, mais lorsque les fleurs sont formées à partir de tissus végétatifs, d'autres sucres peuvent lui être substitués.

5. Les auxines AIA, ANA, 2.4.D inhibent la floraison "in vitro" comme sur les plantes entières. Cependant, l'acide  $\beta$ -indolyl acétique stimule la néoformation des fleurs sur les fragments de feuilles de *Streptocarpus* (ROSSINI et NITSCH, 142) et le développement de l'ovaire des fleurs à potentialité mâle, et inhibe celui des étamines des fleurs hermaphrodites du Concombre (GALUN et coll. 84, 85).

6. La Gibbérelline agit de façon différente selon les espèces : elle stimule par exemple la néoformation des fleurs sur les morceaux de racines d'endive vernalisées, mais l'empêche sur les fragments de tiges inflorescentielles de tabac, ou sur les fragments de tiges végétatives de *Plumbago indica* L. (NITSCH et NITSCH, 117).

7. La kinétine et les cytokinines stimulent la formation des fleurs, mais surtout ~~en~~ présence d'auxine ou d'adénine.

8. L'adénine est aussi un stimulateur surtout lorsqu'~~elle~~ est en mélange avec la kinétine.

9. Les inhibiteurs de croissance ont montré des effets divers selon les espèces et selon les auteurs. Par exemple, l'acide trichobenzofique est inactif sur la néoformation des fleurs chez l'endive (expériences de PAULET, 129) ou la stimule (expériences de MARGARA, RANCILLAC et BECK, 110).

10. Des acides aminés ou leurs précurseurs, certains précurseurs des acides nucléiques, certains précurseurs des composés anthocyaniques ou flavoniques (abondants dans les fleurs) aussi bien que certains composés polyphénoliques ou leurs précurseurs, ont montré parfois une action stimulante sur la floraison (PAULET, 129; NITSCH et NITSCH, 117).

Enfin, deux points importants ne semblent avoir retenu l'attention des auteurs que très récemment : l'hétérogénéité du matériel et des réponses à un même facteur, l'éloignement des sites d'absorption et d'action des éléments macro et microtrophiques.

a. La question de l'hétérogénéité du matériel est passée sous silence par presque tous les auteurs. Il n'est fait mention de répétitions des expériences que dans les derniers travaux, en 1964 et 1965, de NITSCH et NITSCH, 122; d'AGHION-PRAT, 62; de PAULET, 129 et de MARGARA, 107 à 110. Les observations n'ont porté souvent que sur quelques organes développés par traitement.

PAULET, 129, puis MARGARA, 109, ont mis en évidence une hétérogénéité des réponses chez une même variété d'endive, certains explants de racines non vernalisées ont pu former des fleurs. Chez le Tabac Wisconsin 38, il existe un gradient de propension à la néoformation des fleurs du haut en bas de la tige (CHOUARD et AGHION, 75).

En ce qui concerne la culture "in vitro" de boutons floraux de chrysanthèmes, on remarque que les capitules ne se développent pas de la même manière selon le traitement subi par la plante (vernalisation, photopériodisme) et selon la position des fleurs le long de la tige; il est donc nécessaire de standardiser la méthode de mise à fleur et prélever les boutons toujours au même endroit.

b. Aucun auteur n'a tenu compte de l'éloignement des sites d'absorption (ou de biosynthèse) et d'action des substances. En principe, le site d'action se situe au niveau des méristèmes apicaux ou gemmaires qui formeront les primordia floraux (PLANTEFOL, 367, 368; LANCE-NOUGAREDE, 360, 364, etc.). Ce site d'action est en général séparé du site d'absorption par des tissus ou des cellules qui, dans le cas des apex ou des tissus "végétatifs", renferment déjà des substances actives. Ces tissus peuvent métaboliser aussi les substances absorbées dans le milieu. D'ailleurs, plus on prélève de tissus différenciés ou "intermédiaires" avec le site d'action, plus on modifie la réponse aux divers traitements : cas de la mise à fleur de gemmules avec des fractions plus ou moins importantes de cotylédon, selon HENRICKSON (90), cas des apex de *Perilla* cultivés seuls ou avec une ou deux paires de feuilles, selon RAGHAVAN et JACOBS (138).

C'est le cas également de la néoformation des fleurs à partir de fragments de tige d'Iris (PERMIRA, 137), de tige ou de hampe de tabac (AGHION, 58, 59; AGHION-PRAT, 62; CHOUARD et AGHION, 75) ou de racine d'endive (PAULET, 129); de fragments de tiges végétatives de *Plumbago indica* L. (NITSCH et NITSCH, 117) et mieux encore avec des fragments de feuilles de *Streptocarpus* (ROSSINI et NITSCH, 142); le photopériodisme ou le thermopériodisme agissant sur ces tissus peuvent stimuler ou empêcher la formation des fleurs.

D'ailleurs, lorsque l'induction florale a lieu à partir de tissus végétatifs (Travaux de OKONKWO sur les plantes de *Striga*, de NITSCH et NITSCH sur des fragments de tige végétative de *Plumbago*, de ROSSINI et NITSCH sur la production de fleurs par des fragments de feuilles de *Streptocarpus mobilis*, C.B. Clarke), les quantités de sucre exigées dans le milieu sont les mêmes que celles nécessaires pour les cultures de tissus végétatifs (20 % de saccharose).

On peut donc en conclure que l'étude de l'induction florale ou de la néoformation des fleurs "in vitro" à partir d'apex ou de tissus végétatifs ou plus ou moins inflorescentiels (fragments de tiges florifères, ou de hampe florale) est une méthode déjà plus efficace que celle qui consiste à provoquer "in vivo" la mise à fleur de plantes entières. Mais à mon avis, ce n'est qu'une transposition du problème à une échelle plus petite; sa complexité demeure.



En ce qui concerne la culture "in vitro" des boutons floraux de chrysanthème, c'est une question qui ne m'a pas échappé. Dans ce travail, les boutons floraux ont été utilisés avec ou sans pédoncule. J'ai tenté de cultiver des réceptacles floraux, site de la formation des fleurs sur un tissu floral, mais sans beaucoup de succès car au moment de l'expérience, la technique de culture qui fait l'objet de ce travail n'était pas au point. La culture des boutons floraux ne constitue donc, dans mon esprit, qu'une étape dans les recherches qui doivent tendre à réussir la culture du réceptacle floral seul, c'est-à-dire le site de formation des fleurons avec le minimum de "tissus intermédiaires", ces derniers risquant en effet d'influencer plus ou moins les réponses aux traitements.

## M A T E R I E L    E T    M E T H O D E S

### A. MATERIEL.

Ce chapitre comprendra la description du matériel utilisé : pour la mise à fleur des chrysanthèmes, pour la préparation des boutons floraux (prélèvement, désinfection et ensemencement) et pour les cultures "in vitro".

#### I. MATERIEL UTILISE POUR LA MISE A FLEUR.

##### a. Photopériodisme.

Les recherches préliminaires nécessaires pour déterminer l'effet de la longueur du jour et l'effet des variations saisonnières de l'intensité lumineuse ont été effectuées dans une partie annexe du Phytotron du CNRS à Gif-s-Yvette, baptisée Semi-Phytotron, à partir de 1959. (\*)

Cette installation comprenait un abri vitré exposé au midi et grossièrement climatisé à l'aide de radiateurs électriques et de puissants ventilateurs. Ainsi, l'hiver la température minima pouvait être réglée à 16-18° C, mais en été, malgré la ventilation elle s'élevait parfois à 30-35° C au milieu de la journée.

Les chrysanthèmes placés sur des chariots, après 8 heures d'exposition à la lumière du jour dans cet abri, étaient ensuite rentrés dans des salles "obscurées" indépendantes, grossièrement climatisées (16-18° C) pour y passer la nuit. Certaines salles comportaient, suspendues au plafond par des chaînes réglables, des batteries de tubes fluorescents Philips "Blancs Lumière du jour de luxe" de 40 w chacun, commandées par des horloges et qui permettaient de donner un éclairage d'appoint avec une intensité de 3000 lux au niveau des plantes. On obtenait avec ce dispositif les photopériodes suivantes :

---

(\*) A cette époque, malheureusement, le Phytotron n'était pas encore terminé et je n'ai pu bénéficier de ses installations.

T A B L E A U I

Photopériode	Temps d'exposition à la lumière du jour (abri vitré)	Eclairage supplémentaire artificiel	
		Salle n°	Temps
8 heures	8 heures	1	0
10 -	8 -	2	2
12 -	8 -	3	4
14 -	8 -	4	6
16 -	8 -	5	8
24 -	8 -	6	16

## b. Froid.

Les études sur l'exigence de froid (vernalisation) ont été effectuées à l'aide d'une chambre froide à + 5° C, ventilée, dans laquelle des tubes fluorescents Philips "Blanc lumière du jour de luxe" de 20 W dispensaient 1500 lux environ au niveau des plantes pendant 9 heures (j.c.).

II. MATERIEL POUR LA PREPARATION DES BOUTONS FLORAUX (PRELEVEMENT, DESINFECTION ET ENSEMENCEMENT).

Ces instruments comprennent : une boîte à gants avec ses accessoires, une soutireuse, des aiguilles d'ensemencement et des flacons à désinfection et à eau stérile.

## a. La boîte à gants (Planche I, Fig. 1).

Elle a été conçue de manière à présenter un volume d'air facile à stériliser et surtout à maintenir stérile. Sa forme générale est celle d'un parallélépipède (75 x 55 x 70 cm). Mais l'un des dièdres, dont l'arête est constituée par l'une des grandes longueurs de la partie supérieure a été supprimé. Le volume est tronqué par un plan incliné allant du profond dont il ne subsiste que 16 cm de large, vers la base du grand côté latéral, dont il ne subsiste qu'un panneau de 25 cm de haut. Ce plan incliné se trouve placé vers l'avant de l'appareil et comporte une vitre (gl) par laquelle l'opérateur peut suivre toutes les opérations à l'intérieur de l'enceinte.

Le plafond de la boîte, ainsi que la partie supérieure du plan

incliné ci-dessus, est en tôle d'aluminium (al) afin de résister à la chaleur du bec bunsen (b) qui se trouvera placé au-dessous, sur le plancher de la boîte.

Le panneau vertical, à l'avant de l'appareil (reste du grand côté), a une hauteur modeste, ainsi qu'il est dit plus haut (25 cm) mais suffisante pour recevoir par deux orifices elliptiques des manchons (ma.) en matière plastique destinés au passage des bras de l'opérateur. Sur les faces des deux extrémités de la boîte, sont percées deux portes (30 x 30cm) fermant hermétiquement (pd, pg) par lesquelles on peut entrer ou sortir le matériel; elles peuvent être enlevées pour permettre l'assemblage latéral et la communication de plusieurs boîtes à gants, en vue d'un travail nécessitant plusieurs opérateurs.

Sur la grande paroi verticale du fond et en haut sont disposés: un tube à ultra-violets (UV) (lampe germicide Philips de 40 W) dont l'efficacité bactéricide et fongicide a été contrôlée, et un tube fluorescent blanc de 20 W pour l'éclairage normal (L); chaque tube est commandé indépendamment par un interrupteur (It).

Afin d'éviter toute pollution de l'air de l'enceinte après sa stérilisation, par l'ouverture des portes ou l'introduction des mains dans les manchons, l'atmosphère est toujours maintenue en surpression. Un brûleur bunsen (b) permet de stériliser les instruments. Cependant, ce brûleur (Planche I, Fig. 2) a été modifié de manière à éviter son extinction par un épuisement progressif en oxygène de l'air de l'enceinte. La virole a été remplacée par un manchon en métal (m.) sur lequel une dérivation fixée à un tube en caoutchouc permet d'approvisionner la flamme en air frais venant de l'extérieur (Planche I, Fig. 3). L'air ainsi introduit ne contamine pas celui de l'enceinte parce qu'il passe au fur et à mesure dans la flamme qui le stérilise. Les gaz brûlés du bec entretiennent la suppression nécessaire pour empêcher toute entrée d'air extérieur pollué. Cependant, afin que la température reste dans des limites convenables, il est nécessaire d'évacuer malgré tout une partie des gaz brûlés à l'aide d'une trappe (v.) (dont l'ouverture est réglable (o.)) placée à la partie supérieure de l'une des extrémités de l'enceinte. Bien que la pression des gaz empêche l'air extérieur de pénétrer, il est préférable cependant de fermer cette trappe lorsque l'on ouvre l'une des portes de la boîte, afin de ne pas créer un appel d'air extérieur par tirage.

#### b. La soutireuse (Planche I, Fig. 4 et 5).

Elle permet d'enlever aseptiquement les liquides du vase de désinfection. Les organes désinfectés ne peuvent être entraînés vers l'extérieur comme au cours d'un transvasement. Cet appareil comporte un petit Erlenmeyer de 50 cm<sup>3</sup> dont le col est fermé à l'aide d'un bouchon de caoutchouc ou de matière plastique percé de trois trous. L'un de ces trous lais-

se passer un tube fin coudé (n° 1 ag) métallique de 3 mm de diamètre et dont l'extrémité extérieure, faisant un angle de 60° à 80° avec celle qui pénètre dans le flacon à une longueur de 20 à 25 cm.

Un autre trou du bouchon reçoit un petit tube de verre (n° 2), replié selon le même angle que le tube précédent et qui pénètre jusqu'au fond de la fiole. Ce tube sera prolongé par un autre tube souple en matière plastique (chlorure de polyvinyle) qui, fixé à une trompe à vide (v), permettra de faire une dépression dans le flacon et d'évacuer les liquides soutirés.

Enfin, par le troisième trou passe un autre petit tube en verre, court (n° 3), qui met l'atmosphère du flacon en équilibre avec l'extérieur. Son obturation provoque une dépression de la part de la trompe à vide par l'intermédiaire du deuxième tube, et les liquides peuvent être aspirés par le tube métallique n° 1.

Pour évacuer le liquide d'un récipient aseptique, on procède avec cet appareil comme on le ferait avec une aiguille à ensemercer (Fig. 5). On prend l'erlenmeyer dans la main droite, l'index levé au-dessus du tube n° 3. Le tube métallique (n° 1) est stérilisé par chauffage à la flamme du bec bunsen. Il suffit ensuite d'ouvrir le flacon dans lequel se trouvent les organes désinfectés, d'y faire pénétrer le tube métallique stérilisé de la soutireuse et d'obturer doucement avec l'index le tube n° 3 de celle-ci : le liquide est immédiatement aspiré dans l'erlenmeyer d'où il est évacué par la trompe à vide. Il n'y a pas de danger d'un retour du liquide de l'erlenmeyer dans le vase à stérilisation, car les diamètres des tubes sont calculés de telle sorte que, même lorsque le tube n° 3 n'est pas obturé, l'aspiration de la trompe est suffisante pour créer une très légère dépression dans la fiole et par conséquent une faible aspiration par le tube métallique (n° 1).

On pourrait craindre que le tube métallique, chauffé pour sa stérilisation par la flamme du bec bunsen, ne vienne, quand on le plonge dans le vase à désinfection, brûler les organes ou les abîmer en provoquant une augmentation de la température du liquide dans lequel ils baignent. Il n'en est rien si l'on a soin de faire affleurer la pointe du tube de la surface du liquide au début de l'aspiration. Les premières gouttes absorbées refroidissent rapidement le tube et évacuent aussitôt l'excédent de calories.

Le débit de la trompe à vide doit être réglé pour être ni trop faible ni trop fort.

Enfin, lorsque la dernière goutte de liquide est évacuée du vase à désinfection, il est nécessaire d'arrêter rapidement l'aspiration en cessant d'obturer avec l'index l'ouverture du tube n° 3.

### c. Les flacons à désinfection (Planche I, Fig. 8).

Ils ont été également modifiés. Tout d'abord, la pratique m'a montré qu'il est difficile et risqué d'utiliser un récipient trop grand par rapport au matériel végétal à stériliser. En l'occurrence, pour stériliser une dizaine de boutons floraux, il faut un récipient de 50 cm<sup>3</sup> environ.

Au début, je stérilisais dans des tubes de culture en Pyrex 24 x 160 mm, obturés par un bouchon de coton. Très rapidement, ce système s'est montré incommode car il fallait un portoir assez important, et en versant le liquide ou les eaux de lavage, les boutons étaient entraînés à l'extérieur; l'usage de la soutireuse permet d'éviter cet inconvénient. D'autre part, le bouchon de coton pouvait, à chaque opération, entraîner des germes sur la paroi intérieure du tube; un mauvais flambage et tous les boutons pouvaient être contaminés.

J'ai choisi alors l'erlenmeyer de 50 cm<sup>3</sup>, dont le col a été coupé de son rebord évasé (il reste la partie droite et cylindrique). Le bouchage est effectué à l'aide d'une capsule métallique (Morton Stainless Steel) ou par un capuchon cylindrique en verre (tube à fond plat) de 5 cm de haut et d'un diamètre intérieur supérieur de 2 à 3 mm à celui du diamètre extérieur du col de l'erlenmeyer.

Le flacon, avec son capuchon, est stérilisé à l'autoclave avant utilisation.

### d. L'aiguille à ensemercer (Planche I, Fig. 6, 7).

C'est en réalité une fine spatule fendue en V à son extrémité. Elle ressemble un peu au petit instrument en bois (fourchette) que les horticulteurs utilisent pour le repiquage des plantules de Begonia. Elle est constituée par un ruban de ferro-nickel de 60 mm de long sur 2,5 mm de large, que l'on soude à l'extrémité d'une tige de verre ou qui est serré dans un porte-aiguille ordinaire.

## III. MATERIEL POUR LA CULTURE "IN VITRO" DES BOUTONS FLORAUX.

### a. Les tubes de culture (Planche I, Fig. 9).

Les tubes de culture qui recevaient les milieux nutritifs et les boutons floraux étaient du modèle courant 24 x 160 mm. Au cours des premiers essais, ils étaient bouchés avec du coton et coiffés d'un papier d'aluminium stérile, selon la méthode conseillée pour les cultures de tissus végétaux (GAUTHERET, 291; HELLER, 292). Mais ce système empêchait un éclai-

rement uniforme des cultures, les lampes étant placées au-dessus des tubes. C'est la raison pour laquelle les tubes ont ensuite été fermés à l'aide d'un capuchon en verre de 50 mm de haut (Planche I, Fig. 9)\*. L'éclairement était ainsi facilité ainsi que la respiration des cultures, mais afin que l'air de la salle de culture n'entre pas dans les tubes à la faveur d'une variation journalière de la température et afin que les milieux ne se déshydratent pas, la salle de culture a été climatisée.

#### b. La salle de culture.

La température de la salle était maintenue à  $+ 25^{\circ} \text{C} \pm 0,5^{\circ} \text{C}$  et l'humidité relative à  $65 \% \pm 2 \%$ , ce qui évitait la pénétration intempes- tive de l'air dans les tubes, l'air était ainsi renouvelé par une diffu- sion lente des gaz et les milieux perdaient une très faible quantité d'eau, de sorte qu'il a été possible de conserver pendant plusieurs années des cultures sans aucune contamination.

Bien que les boutons floraux de chrysanthème se soient montrés à peu près insensibles au photopériodisme, ils étaient cependant éclairés dans la salle de culture par des tubes fluorescents Philips "Blanc lumière du jour de luxe" dispensant 3500 lux au niveau des cultures pendant 9 h par jour.

### B. METHODES.

Nous examinerons successivement : la méthode pour la production de boutons floraux standards, la méthode de prélèvement et de désinfection des boutons, la méthode de culture "in vitro" (mise au point du milieu de culture de base, l'ensemencement) et les méthodes d'observation et d'inter- prétation des résultats.

#### I. METHODE POUR LA PRODUCTION DE BOUTONS FLORAUX STANDARDS.

Afin d'éviter une hétérogénéité génétique, les plantes provenaient d'un bouturage effectué toujours dans les mêmes conditions à partir d'un même clone. Mais la fleur étant la résultante de la vie végétative de la plante et des réactions de cette dernière vis à vis des divers facteurs du milieu, il était indispensable de comparer diverses variétés afin de choisir la plus stable et celle qui présentait le minimum d' "empêchements" à la mise à fleur.

---

\* Ce système de bouchage est à présent adopté dans plusieurs autres labora- toires.

Entendons par là que la plupart des variétés ne peuvent fleurir qu'à la condition d'avoir subi le froid de l'hiver (vernalisation) ou des jours longs précédant les jours courts, etc. Ces inhibitions successives qui se présentent au cours de la vie de la plante l'empêchent de fleurir de façon intempestive en contre saison, mais les conditions qui permettent de lever ces barrages successifs constituent autant de causes qui induisent une hétérogénéité dans le résultat final : la formation du bouton floral.

Les expériences préliminaires qui ont permis le choix d'une variété ont duré quatre ans environ. Dix variétés ont été comparées quant à leurs réactions vis à vis des facteurs du milieu : température (vernalisation des drageons, température favorable à la croissance et à la floraison), longueur du jour (Photopériodisme), aptitude à la formation des fleurs à l'obscurité, réactions à la gibbérelline, etc. Pour la plupart de ces variétés, je n'ai d'ailleurs trouvé aucune donnée précise dans la littérature en ce qui concerne leurs exigences écophysiologiques. Les résultats obtenus, qui n'entrent pas dans le cadre de cette étude, seront publiés ultérieurement.

En définitive, c'est la variété "Souvenir de Georges PECHOU" \*, clone de serre tiède, qui a été choisie. Cette variété, cultivée pendant une vingtaine d'années en serre tiède de 18 à 35° C par M. le Professeur P. CHOUARD, a donné naissance à un clone qui ne ressemble plus (la coloration des fleurons mise à part) à la variété horticole d'origine.

Aussi, il m'a semblé indispensable de faire vérifier l'identité de ce chrysanthème par un spécialiste. A cette fin, des "potées" ont été préparées par la méthode horticole habituelle : hivernage des pieds mères sous chassis, bouturage des rejets au printemps et conduite de la croissance et de la floraison par pincements et éboutonnages successifs. \*\*

#### a. Description sommaire de la variété Souvenir de Georges PECHOU\*.

La variété du commerce a l'aspect représenté par la Figure 1, Planche VII. C'est une variété déjà ancienne qui servait surtout à la production de "fleurs coupées" pour la préparation de bouquets, car les capitules se dégagent bien du feuillage à l'aide d'une hampe florale assez longue (20 à 35 cm). La plante a en général 50 à 80 cm de haut, les tiges sont robustes et de fort diamètre. Les feuilles grandes (jusqu'à 15 cm de long),

---

\* Chrysanthemum morifolium Ram. x C. indicum Sal. - c.v. Souvenir de Georges PECHOU.

\*\* La préparation de ces plantes a été effectuée par M. LEMAIRE, jardinier fleuriste professionnel du CNRS à Gif-s-Yvette et la détermination à partir des "potées" ainsi préparées, par M. FERON - Ingénieur horticole - Président de la Section "Chrysanthèmes" de la Société Nationale d'Horticulture de France. Je tiens l'un et l'autre à les assurer de ma très sincère reconnaissance.



vert glauque en dessus, plus pâle et comme poudreuses en dessous, se maintiennent rarement à l'horizontale. Le capitule prend vers la fin de l'épanouissement une forme sub-sphérique car les plus grands fleurons ligulés sont légèrement retombants. Les fleurons sont de couleur jaune et souvent colorés de rouge-marron sur la face inférieure de leur ligule. La ligule s'étale plus ou moins et se termine par quelques grosses dents ou lobes irréguliers. A la fin de la floraison, il apparaît sortant du sol au bas de la plante, des drageons dormants à entrenoeuds courts et feuilles en rosette (flèches, fig. 1, Planche VII). Ces drageons ne peuvent se développer en jours courts si l'on sectionne les tiges principales. Leur dormance peut être levée par un séjour au froid (hivernage) ou par des jours longs.

Le clône (Planche VII, fig. 2, 4 et 6) cultivés en serre tiède, en jours longs, est plus élané. Il peut donner des branches grêles ayant parfois jusqu'à 1 à 2 mètres de long. Les feuilles sont plus courtes que chez la variété type (7 à 10 cm) et d'un vert pâle. Le bouturage de l'extrémité des tiges en croissance donne des plantes à tiges fines parfois pigmentées de rouge à la base. Elles fleurissent aussi bien en jours longs qu'en jours courts, au tiède à 16-20° C, ainsi que nous le verrons ci-après. Les drageons qui apparaissent à la base ne sont pas dormants; ils se développent moins rapidement que la tige principale (Planche VII, Fig. 2, flèche). Ils fleurissent à leur tour dès que les capitules de la tige principale sont épanouis. Les capitules ont des fleurons jaunes; la pigmentation rouge-marron de la face inférieure de la ligule a disparu presque complètement. Comme la ligule des fleurons est moins longue et moins large que chez la variété du commerce, ils retombent très peu, de sorte que les capitules vus en dessus ont un aspect rayonnant (Planche VII, fig. 4).

b. Examen succinct des exigences écophysiologiques de la variété Souvenir de Georges PECHOU - Clône de serre tiède.

Le chrysanthème a été classé par GARNER et ALLARD en 1923 (15) parmi les plantes de jours courts. Depuis, de nombreux travaux (voir la littérature citée à la fin de ce chapitre) ont permis de déterminer qu'il existait, parmi les variétés de chrysanthème, toute une gamme quant aux réactions aux divers facteurs du milieu et notamment en ce qui concerne le besoin de vernalisation, les effets de la température sur la croissance et la mise à fleur, le photopériodisme, les réactions à la gibbérelline, etc. Ainsi, certaines variétés ne peuvent être mises à fleur qu'après avoir été vernalisées, mais chez d'autres l'effet du froid peut être remplacé par les jours longs ou par la gibbérelline. Après vernalisation, certaines variétés sont rendues sensibles aux jours courts, mais d'autres peuvent être mises à fleur par des jours longs, etc.

Aucune donnée sur le comportement de la variété Souvenir de Georges PECHOU vis-à-vis des facteurs du milieu n'a été trouvée dans la litté-

rature citée à la fin de cet ouvrage. Les résultats qui ont permis la connaissance des exigences écophysiologicals de ce clone ne pouvant être exposés ici "in extenso", ils feront l'objet de publications ultérieures.

Ces recherches préliminaires visaient à la mise au point d'une méthode de mise à fleur pour la production des boutons floraux standards nécessaires aux cultures "in vitro". L'essentiel des résultats obtenus a trait : à l'effet de la température, de l'acide gibbérellique et de la longueur du jour sur la croissance, la mise à fleur et la forme des boutons floraux et à l'effet de l'obscurité sur la formation des capitules.

### 1. Effets de la température.

Le clone utilisé n'ayant pas de drageons dormants en serre tiède n'a pas besoin de vernalisation. Une série d'expériences a permis de montrer d'ailleurs qu'un abaissement de température à  $+ 5^{\circ} \text{C}$  ralentissait le développement des drageons. Par hivernages répétés des souches sous châssis après floraison (\*), ou par des refroidissements répétés en chambre froide à  $+ 2,5^{\circ} \text{C}$ , il apparaît à la base des plantes des drageons dormants avec des feuilles en rosette et qui ont à nouveau besoin de vernalisation. Ce clone est donc déshabitué du froid (RABECHAULT et CHOUARD, 228) .

Pendant la croissance des tiges, et surtout pendant le traitement de mise à fleur par les jours courts, un abaissement de la température au-dessous de  $+ 7^{\circ} \text{C}$  inhibe l'allongement des entre-nœuds; il se forme alors une rosette perchée de feuilles à l'extrémité de la tige principale. La reprise de l'allongement et la floraison sont retardées d'autant plus que l'abaissement de température a été important et a duré plus longtemps.

Ce clone doit être cultivé à une température minimum de  $+ 16^{\circ} \text{C}$ .

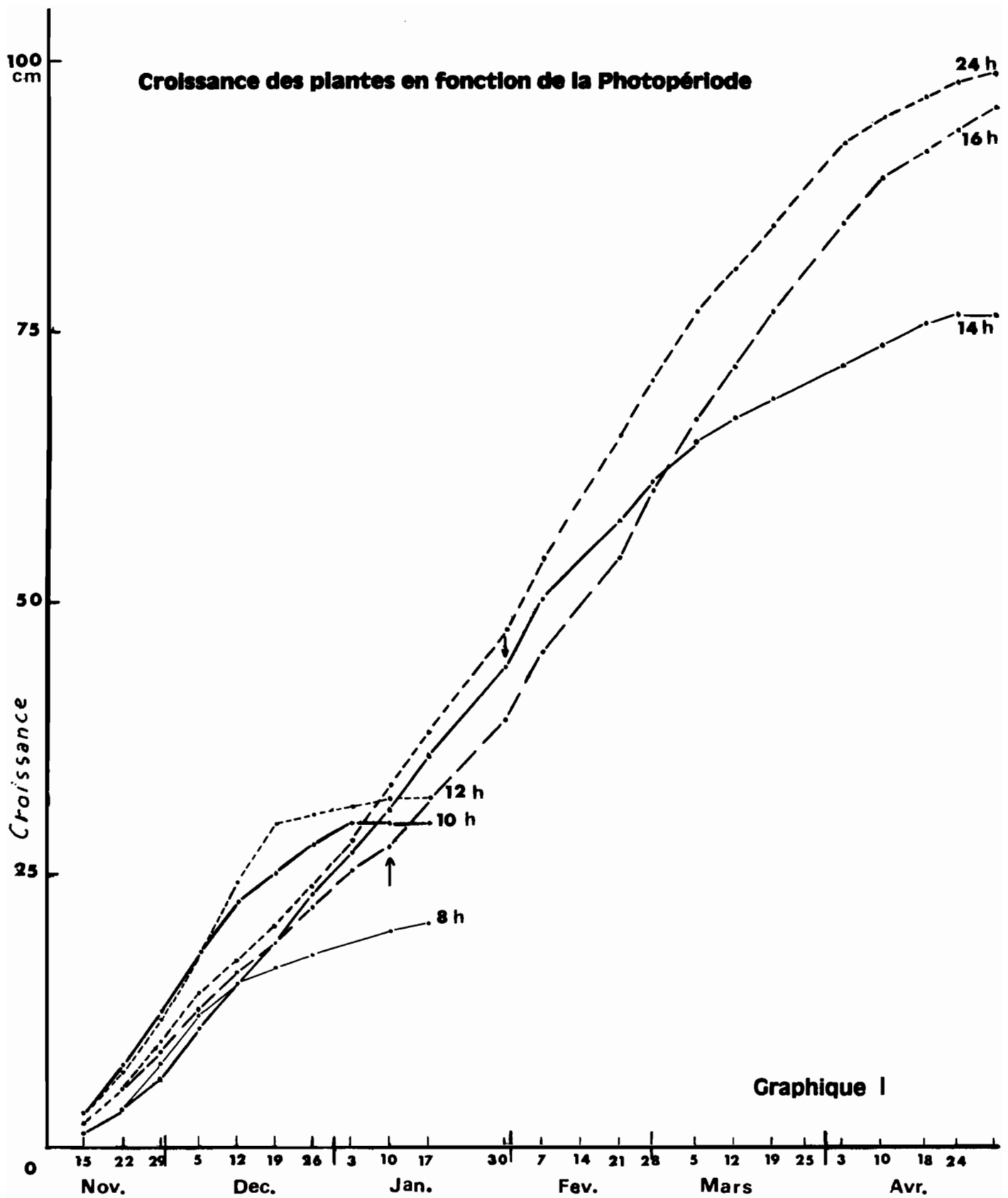
### 2. Effets de la longueur du jour.

L'expérience suivante, prise comme exemple, comportait 6 lots de 10 plantes issues de boutures et qui ont été traitées par 6 photopériodes différentes 8, 10, 12, 14, 16 et 24 h à l'aide du dispositif décrit dans le chapitre "Matériel".

Chaque semaine, j'ai mesuré la taille des plantes, compté le nombre de feuilles et observé le déroulement de la mise à fleur. Les courbes de croissance (Graphique I) ainsi que les courbes de production de feuilles montrent qu'il existe deux groupes de plantes très nettement séparés et qui se développent différemment. Le tableau II dans lequel sont consignés la

---

(\*) C'est cette technique qui a été utilisée pour vérifier l'identité de ce clone de serre tiède.



taille moyenne finale de chaque lot, le nombre final moyen de feuilles émises jusqu'à la fleur terminale, et le temps moyen de mise à fleur (nombre de jours écoulés depuis le début du traitement jusqu'à l'apparition du bouton floral à l'extrémité de la tige) permet d'arriver à la même conclusion. Le premier groupe est celui des plantes en jours courts 8 à 12 h et le second celui des plantes en jours longs 14 à 24 h.

# T A B L E A U I I

## EFFETS DE LA LONGUEUR DU JOUR SUR LA TAILLE FINALE, LE NOMBRE DE FEUILLES A LA FLORAISON ET LE TEMPS DE MISE A FLEUR

Observations	Photopériodes					
	8 h	10 h	12 h	14 h	16 h	24 h
Hauteur moyenne des plantes (en cm).	21,12	31,02	33,66	67,58	95,65	98,98
	<u>+3,42</u>	<u>+2,20</u>	<u>+1,57</u>	<u>+12,17</u>	<u>+7,20</u>	<u>+8,25</u>
Nombre moyen de feuilles par plante	10,20	11,80	13,80	28,80	39,80	32,40
	<u>+0,56</u>	<u>+2,78</u>	<u>+1,027</u>	<u>+5,50</u>	<u>+4,34</u>	<u>+5,72</u>
Temps de mise à fleur (en jours)	23,80	24,20	23,20	103,6	138,20	110,20
	<u>+3,25</u>	<u>+8,67</u>	<u>+3,24</u>	<u>+61,34</u>	<u>+42,23</u>	<u>+58,37</u>

En jours courts (8 à 12 h), le cycle végétatif est plus court qu'en jours longs et la floraison beaucoup plus précoce, plus groupée et plus homogène. Si cette expérience avait été arrêtée au 62ème jour, alors que la floraison du premier groupe était bien établie (fleurs épanouies) et que les plantes du deuxième groupe étaient toujours dans leur phase active de croissance végétative, on aurait pu penser que cette variété était de "jours courts" (c'est ce qui a été fait par d'autres auteurs pour d'autres variétés). L'étude mathématique approfondie des résultats obtenus et qui sera publiée par ailleurs a permis de mettre en évidence l'existence de deux modes de mise à fleur ayant leur optimum respectivement en jours courts (10 h) et en jours longs (16 h d'éclairement).

Non seulement les plantes de ces deux groupes ont une croissance, un port et une floraison différentes, mais elles donnent lieu à la formation de deux sortes de boutons floraux déjà connus des horticulteurs : les "boutons couronnes" (jours longs) et les boutons "terminaux" (jours courts).

- Forme et structure des boutons floraux des plantes en jours longs et des plantes en jours courts - Choix des boutons floraux pour les cultures aseptiques :

En jours longs (14 à 24 h), le bouton de l'extrémité de la tige, appelé "bouton couronne" par les horticulteurs, a la forme d'un tronc de cône renversé. Il est vert foncé et présente de nombreuses côtes formées par des bractées saillantes. Il est porté à l'extrémité d'une longue hampe florale (de 10 à 25 cm de long) sur laquelle se trouvent des bractées, languettes foliacées libres, lancéolées, sessiles, épaisses, distribuées sur de nombreuses hélices. Près du feuillage, la transition est souvent brusque c'est-à-dire que l'on observe rarement de formes intermédiaires entre les bractées sessiles et entières, et les feuilles pétiolées et dentées. A l'aisselle des dernières feuilles, à la base de la hampe florale, se développent des rameaux qui porteront à leur tour des boutons floraux à leur extrémité.

La floraison en jours longs est plus hétérogène qu'en jours courts; (les boutons ont des tailles différentes et se développent plus ou moins vite selon les plantes) et la mise à fleur est plus étalée puisque de tels boutons apparaissent entre 3 et 6 mois après le début du traitement (les épanouissements commencent après 152 jours seulement). Enfin, à l'intérieur du bouton, les fleurons sont séparés par des bractées qui diminuent de taille puis disparaissent plus ou moins complètement en allant vers le centre du réceptacle (Planche IX, fig. 9).

En jours courts (8 à 12 h), le bouton de l'extrémité de la tige principale est arrondi, sub-sphérique et légèrement comprimé en dessus et en dessous. Sa surface est presque lisse car les bractées sont fines, sub-papyracées et bien jointes. Il n'y a que deux à trois couches de bractées à l'extérieur du capitule; sur le réceptacle, il ne se forme que des fleurs. La hampe est remplacée par un pédoncule court sans bractées libres; la dernière feuille à la base du pédoncule est souvent sessile avec un limbe réduit à trois lobes et ne rappelle en rien les bractées épaisses de la hampe florale des plantes en jours longs.

A l'aisselle de chaque feuille se développe un bouton identique à celui de la tige principale avec un pédoncule simple également sans bractées. Les boutons "axillaires" sont de plus en plus petits au fur et à mesure que l'on descend vers la base de la tige, les boutons supérieurs inhibent par corrélations de croissance ceux qui sont situés au-dessous d'eux, ces corrélations sont peut-être de même nature que celles qui règlent la croissance des bourgeons végétatifs axillaires des végétaux (CHAMPAGNAT, 4, 5). Les boutons axillaires peuvent être considérés selon l'expression définie par MARESQUELLE comme des inflorescences de "renfort" de la fleur principale (360 à 363).

Les trois premiers boutons axillaires se développent cependant

presque aussi rapidement que le bouton principal. Leur croissance est, semble-t-il, identique ainsi que le montre le graphique II. Aussi, ce sont ces boutons de même forme, de même structure, qui ont été utilisés pour les cultures "in vitro". Leur forme et l'absence de bractées sur leur pédoncule permettent une désinfection efficace. Le choix du bouton terminal aurait nécessité la préparation d'autant de plantes que de boutons utilisés et, d'autre part, les autres boutons axillaires situés à un niveau inférieur sur la tige n'ont pas été retenus car ils semblent l'objet d'inhibitions plus ou moins fortes, ce qui est une source possible d'hétérogénéité.

### 3. Effets de l'obscurité .

Un caractère important à signaler aussi est la possibilité de la formation des capitules à l'obscurité. Les exemples de plantes fleurissant à l'obscurité sont rares, ce sont en général des plantes de jours longs et le phénomène ne peut se produire le plus souvent qu'en présence de quantités importantes de sucre. La cuscute, ainsi que nous l'avons vu dans le chapitre Historique (expériences de L00 et de BALDEV) présente cette intéressante propriété.

J'ai effectué des expériences sur trois variétés dont la variété Souvenir de Georges PECHOU - clone de serre tiède. Seule cette dernière a pu former ses boutons floraux à l'obscurité (les drageons à la base et le bourgeon terminal étaient protégés par une cache en toile noire). La variété Mélodie a formé ses fleurs à l'obscurité seulement après un traitement à la gibbérelline.

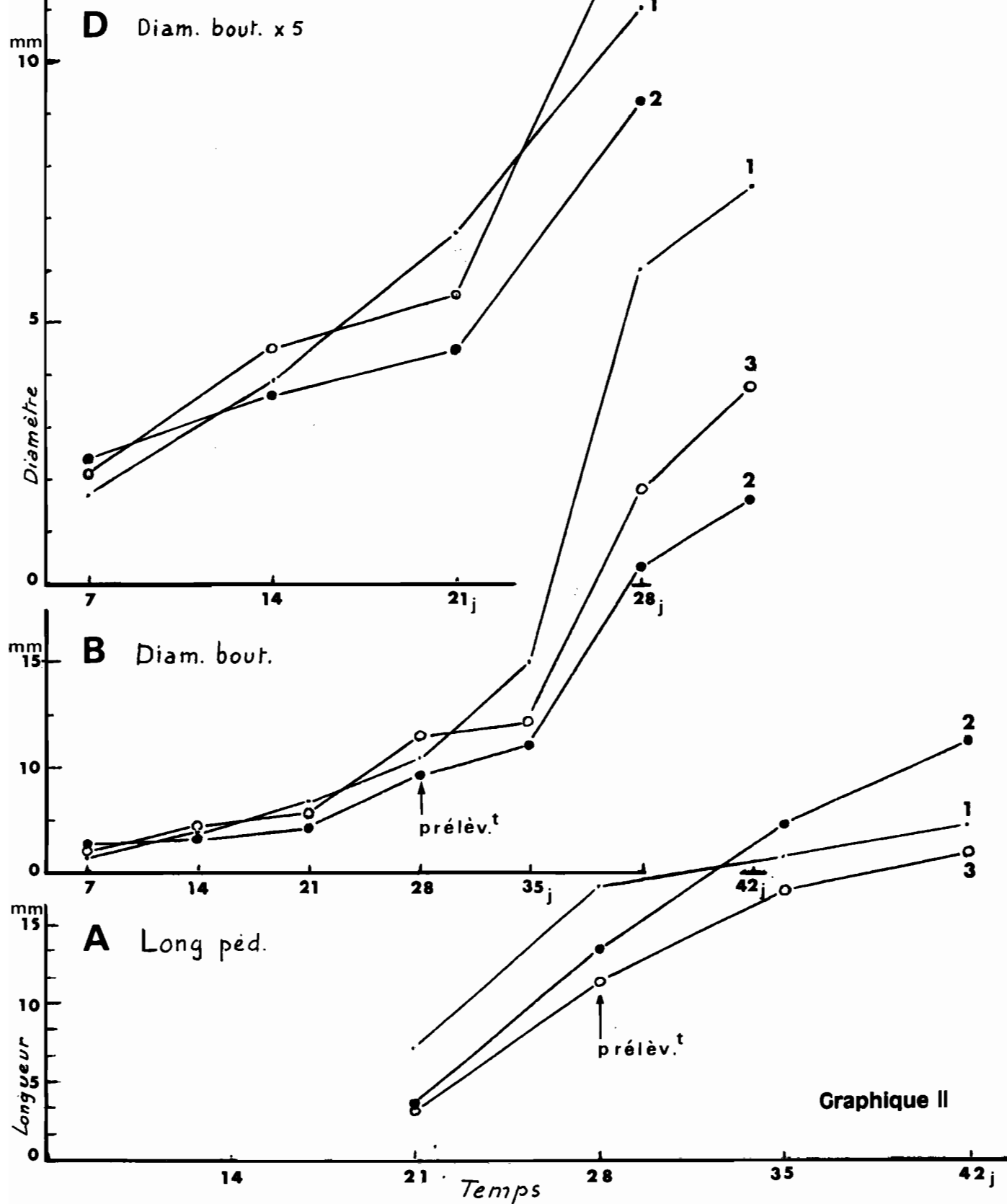
#### c. Mise au point d'une méthode de préparation des plantes pour la production de boutons standards.

La variété Souvenir de Georges PECHOU, clone de serre tiède, présente donc de nombreux avantages.

1. Elle n'a pas de drageons dormants et n'a pas besoin de vernalisation.
2. Elle est indifférente au photopériodisme et le développement des boutons n'est retardé que par les jours longs ou l'obscurité.

Il vient à l'esprit que l'on pourrait produire des boutons en traitant les plantes par des jours courts, mais de cette manière, le matériel végétal serait vite épuisé car les jours courts accélèrent la mise à fleur des bourgeons terminaux. Il paraît nécessaire de provoquer un développement végétatif par des jours longs, indispensable pour la formation des pousses utiles pour perpétuer la variété. Ce développement végétatif

**Longueur des pédoncules  
et diamètre des boutons (jours courts 10 h)**



permettra également à la plante de se fortifier et de biosynthétiser les macro-éléments qui serviront ensuite à l' "expression florale"; un cycle normal végétatif-floral sera ainsi recréé.

Le cycle de préparation comprendra les étapes suivantes : bouturage de l'extrémité végétative d'une tige en jours longs. Après enracinement et repotage dans un mélange terre franche-terreau à parties égales, les plantes seront laissées en jours longs jusqu'à ce qu'elles aient produit un certain nombre de feuilles et qu'elles aient atteint une taille permettant de prélever à nouveau l'extrémité de la tige pour faire une nouvelle bouture en jours longs. La tige de la plante sera rabattue à trois feuilles (pincement des horticulteurs) et laissée en jours longs jusqu'à ce qu'un rameau axillaire, développé à l'aisselle de la feuille supérieure du tronçon de tige restant, ait atteint une certaine taille. Puis la plante sera passée en jours courts pour sa mise à fleur.

La bouture de l'extrémité de la tige, prélevée au moment du pincement, sera repotée après enracinement, laissée en jours longs jusqu'à ce que la jeune plante ait une certaine taille, puis la tige sera pincée à trois feuilles comme dans le cas précédent (l'extrémité servira à préparer une nouvelle bouture, tandis que la souche rabattue sera laissée en jours longs jusqu'à ce que le rameau axillaire qui remplace la tige principale ait atteint un certain développement, puis placée en jours courts pour être mise à fleur et ainsi de suite.

Il y a donc deux périodes de traitements par les jours longs dont il convient de déterminer l'importance : le nombre de jours longs que peut subir la jeune bouture et la jeune plante jusqu'à son pincement pour le prélèvement d'une nouvelle bouture de "tête" et le nombre de jours longs que doit subir la souche rabattue (période de prétraitement pendant laquelle se développera le rameau axillaire remplaçant la tige principale) avant de recevoir les jours courts.

Il faut que ces traitements par les jours longs soient suffisants pour provoquer une bonne croissance végétative sans se répercuter sur le comportement des boutures (floraison anticipée) et sur la mise à fleur par les jours courts (hétérogénéité des tailles des plantes et des boutons, dispersion des temps de mise à fleur, apparition de bractées foliacées libres sur les pédoncules (Planche VII, Fig. 5) ou entre les fleurons sur le réceptacle des capitules (Planche IX, Fig. 1).

#### 1. Multiplication végétative en jours longs.

Chez les végétaux supérieurs, la mise à fleur ne peut être déclenchée en général que lorsque la "maturité de floraison" est atteinte (CHOUARD 6, 7, 8; LANG 23; MELCHERS 31, etc.); les feuilles notamment doivent être arrivées à l'état adulte (KNOTT 21, MOSKOV 32, etc.). Par consé-



quent, pour perpétuer l'espèce par voie végétative, il y a un seuil qui ne doit pas être atteint (âge de la plante, nombre de feuilles adultes). Les plantes doivent conserver un état "juvénile" sous peine d'une mise à fleur anticipée des boutures.

Pour déterminer l'influence de l'âge sur la floraison anticipée en jours longs, j'ai préparé à partir de pieds mères identiques, une centaine de boutures, à raison de cinq par semaine. Les dernières boutures racinées, rempotées dans le mélange terre-terreau habituel comme celles des semaines précédentes, avaient après une dizaine de jours longs, le 8 septembre, 10 à 12 cm de hauteur et 7 à 8 feuilles. Tandis que celles préparées de la même manière (1ère série) la première semaine avaient près de 50 cm de haut et 25 à 30 feuilles. J'ai alors effectué le 8 septembre le bouturage du sommet des tiges de ces plantes de différentes tailles et qui s'étaient ainsi développées plus ou moins longtemps en jours longs, en notant pour chaque bouture la taille et la date du bouturage du pied mère.

Les nouvelles plantes obtenues ont été laissées en jours longs et observées le 29 septembre quant à l'état de leur bourgeon terminal; ces observations sont consignées dans le Tableau III.

Le 29 septembre, les jeunes plantes issues des boutures qui avaient été prélevées sur des plantes ayant une tige supérieure à 25,3 cm et 12 feuilles étaient initiées et avaient déjà formé un petit bouton couronne en jours longs. Chez les lots 8901 à 8913, le bouton couronne était simple, sans ramification, il s'agissait, semble-t-il, de l'expression d'un méristème floral déjà formé chez les pieds mères. Les plantes 8914 à 8917 ne furent initiées que le 2 janvier 1962 et les 8919-8920 (pieds mères 20 cm, 11 feuilles) le 12 janvier seulement, leur bouton couronne était accompagné de branches satellites végétatives. Enfin, les plantes 8926 et 8927 sont restées végétatives (dernière observation le 24 mars 1962).

La limite recherchée peut donc être fixée vers les lots 8919-8920 (pieds mères, hauteur 20 à 22 cm, 10 à 12 feuilles).

## 2. Mise à fleur.

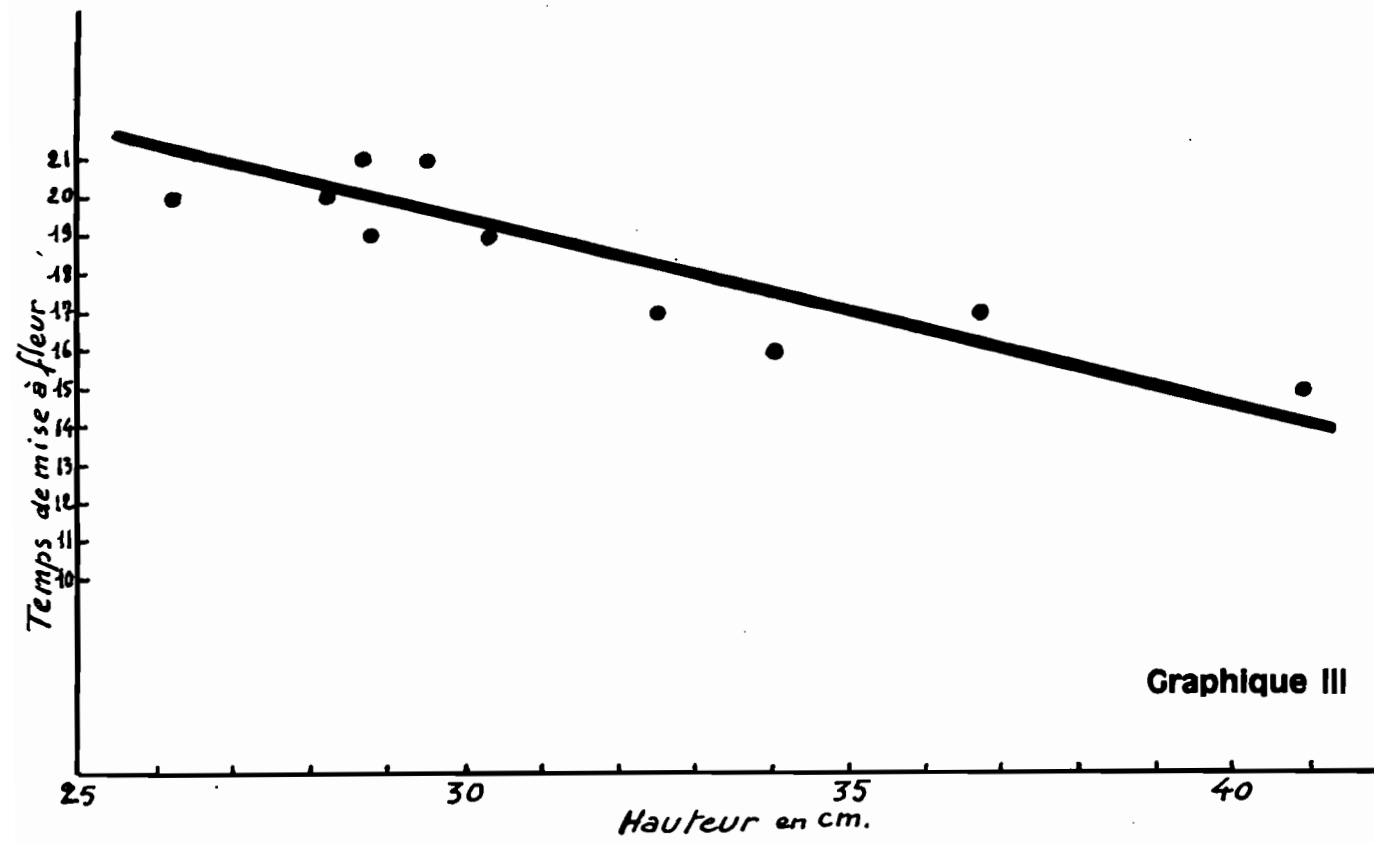
✕ - Temps de prétraitement par les jours longs.

Les pieds mères qui ont été décapités à 3 feuilles pourraient être placés directement en jours courts (8 à 10 h) mais l'expérience m'a montré qu'un prétraitement par les jours longs facilitait et accélérail l'apparition du rameau axillaire de remplacement de la tige principale, fortifiait les plantes et augmentait l'effet des jours courts : réduction du temps de mise à fleur et augmentation du nombre des boutons axillaires susceptibles d'être prélevés.

T A B L E A U    I I I

N <sup>os</sup>	8 septembre 1961		29 septembre 1961
	Hauteur	Nbre de feuilles	
8901	55,0	22	initié net (*)
8902	52,7	23	" "
8903	51,3	23	" "
8904	50,5	24	" "
8905	49,5	22	" "
8906	48,0	22	" "
8907	49,8	19	" "
8908	49,3	19	" "
8909	48,5	18	" "
8910	43,8	18	initié (**)
8911	41,6	18	"
8912	43,2	17	"
8913	34,2	13	juste initié (***)
8914	35,2	13	" "
8915	29,8	12	" "
8916	26,4	11	" "
8917	25,3	12	rien
8918	26,5	10	"
8919	21,7	11	"
8920	20,3	11	"
8921	16,0	11	"
8922	13,7	12	"
8923	16,0	10	"
8924	15,2	10	"
8925	13,3	8	"
8926	7,3	7	"
8927	6,8	7	"

- (\*) Bouton bien formé de 3 à 4 mm de diamètre accompagné de satellites.  
 (\*\*) Bouton formé de 2 mm de diamètre avec satellites à peine visibles.  
 (\*\*\*) Bouton principal de 1 mm de diamètre sans satellites.



Graphique III

Evidemment, il faut que ce prétraitement n'intervienne que sur l'accomplissement de la phase végétative du rameau et n'influence pas la forme et la structure des boutons axillaires satellites (apparition de bractées foliacées libres sur les pédoncules). Pour déterminer ce temps optimum de prétraitement, j'ai fait quatre expériences : le 2 mars, le 24 mars (2 expériences) et le 6 août 1962, qui ont donné des résultats identiques.

La première, (le 2 mars) consistait à voir l'influence de l'âge des pieds mères. Parmi une centaine de plantes restées plus ou moins longtemps en jours longs, j'ai choisi des plantes de différents âges, mais dont le rameau axillaire avait la même taille : 25 cm et 11 feuilles. Ces plantes mises en jours courts ont fleuri en même temps.

Le 24 mars, j'ai fait deux nouvelles expériences, mais cette fois en choisissant (en jours longs) des plantes de même âge, dont le rameau axillaire était plus ou moins long et avait un nombre plus ou moins important de feuilles. Dans la première expérience, j'ai pu réunir des plantes hautes de 25 à 40 cm. En portant sur un graphique (Graphique III), les tailles en ordonnées et les temps de mise à fleur par les jours courts en abscisses, on obtient un nuage de points orienté qui montre que plus les plantes s'étaient développées en jours longs, plus la mise à fleur par les jours courts était rapide. Mais au-delà de la taille 30 cm, il se formait des bractées libres sur les pédoncules des boutons floraux. Dans la deuxième expérience, les plantes en jours longs avaient 10 à 25 cm de haut et 10 feuilles (+ 1 feuille). Le temps de mise à fleur par les jours courts (9 h) n'a pas été significativement différent de celui des plantes les plus petites de l'essai précédent 22 jours + 1,5 jour.

C'est donc la croissance du rameau axillaire en jours longs qui intervient, la taille ne doit pas dépasser 25 cm.

Le 8 août 1962, j'ai fait une autre expérience qui a donné des résultats similaires et qui montre de plus l'effet stimulant du prétraitement par les jours longs sur le nombre de boutons satellites axillaires produits en jours courts et susceptibles d'être prélevés (diamètre et croissance non significativement différents).

Des plantes issues de boutures (6 août 1961) pincées à deux feuilles, ont été laissées en jours longs jusqu'à ce qu'elles aient atteint la taille maximum de 32 cm. Il a été choisi parmi une centaine d'entre elles, quinze plantes dont les tailles s'échelonnaient entre 12 et 32 cm. Elles ont été mises en jours courts le 12 novembre. Un mois après, le 10 décembre, toutes les plantes étaient fleuries. J'ai noté le 10 décembre leur taille, leur nombre de feuilles, le nombre de boutons, le diamètre des deux boutons principaux et le nombre de noeuds florifères (Tableau IV). Il y a eu une augmentation sensible du nombre de boutons apparus en un mois et du diamètre des deux principaux boutons à partir de la plante 6809 qui mesurait au dé-

part 20,3 cm et avait 10 feuilles. Le 10 décembre, on peut constater aussi une augmentation du nombre de noeuds florifères proportionnel à la taille de la plante au départ, mais l'effet de jours longs s'est fait plus ou moins sentir sur la structure des boutons.

T A B L E A U I V

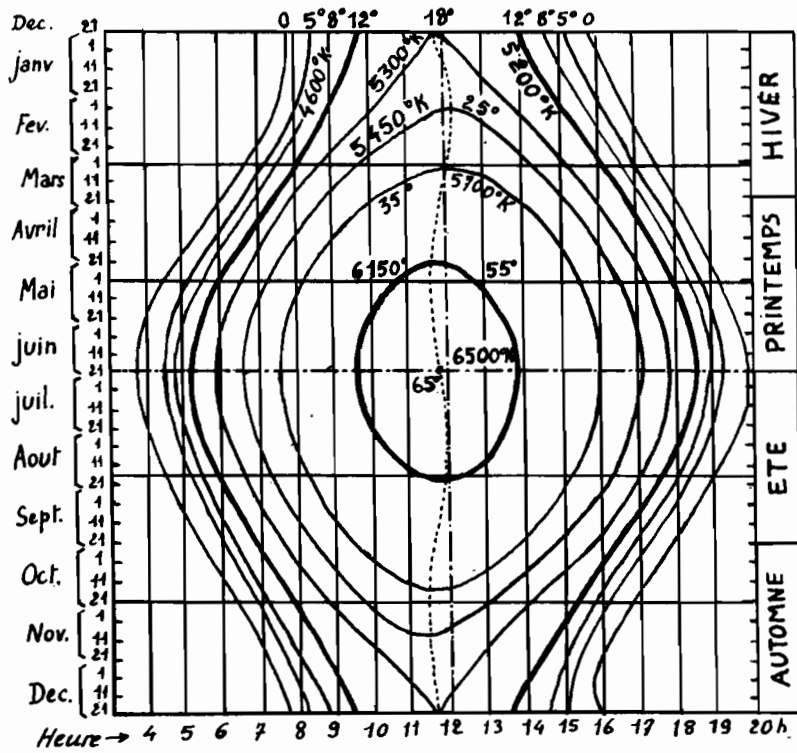
TAILLE ET NOMBRE DE FEUILLES - PRODUCTION DE BOUTONS FLORAUX

	Taille des plantes			Nombre de feuilles			Boutons %			Nbre noeuds florifères
	le 12/11	le 10/12	≠	le 12/11	le 10/12	≠	Nbre	le 12/11	le 10/12	
6815	12,0	26,6	14,6	7	15	8	1	3	3,5	6
6814	12,6	29,5	16,9	6	15	9	3	3	3,2	5
6813	13,2	25,8	12,8	9	16	7	2	3,5	3	6
6812	14,3	33,1	18,8	7	17	10	3	3,5	4	5
6811	14,6	31,2	16,6	6	14	8	1	2	3	5
6810	19,0	34,0	15,0	13	18	5	1	2	2,5	6
6809	20,3	34,0	13,7	10	18	8	-	-	3	6
6808	22,6	42,6	20,0	11	21	10	4	3,5	4,5	8
6807	23,0	44,0	21,0	10	22	12	5	4	6	9
6806	24,7	46,4	21,7	11	23,5	12	5	4,5	5	9
6805	24,9	49,3	24,4	12	24	12	5	4,5	7	9
6804	28,5	46,3	17,8	12	23	11	5	4,8	6	11
6803	29,8	50,7	20,9	14	27	13	7	4,2	6	11
6802	29,1	49,1	20,0	13	26	13	5	4,2	6	11
6801	31,7	50,6	18,9	12	23	11	5	4,0	6	12

En conclusion : après un pincement à 3 feuilles, les plantes doivent être laissées en jours longs (24 h) jusqu'à ce que leur tige ait atteint 15 à 22 cm de haut et développé 10 à 12 feuilles. Placées en jours courts (9 h), elles donneront au bout d'un mois, si la température ne descend pas au dessous de 16°C, 3 à 4 boutons axillaires de même taille (Planche VII, fig. 6, 2 plantes à droite) susceptibles d'être prélevées après une dizaine de jours (Planche VII, fig. 6, plante à gauche).

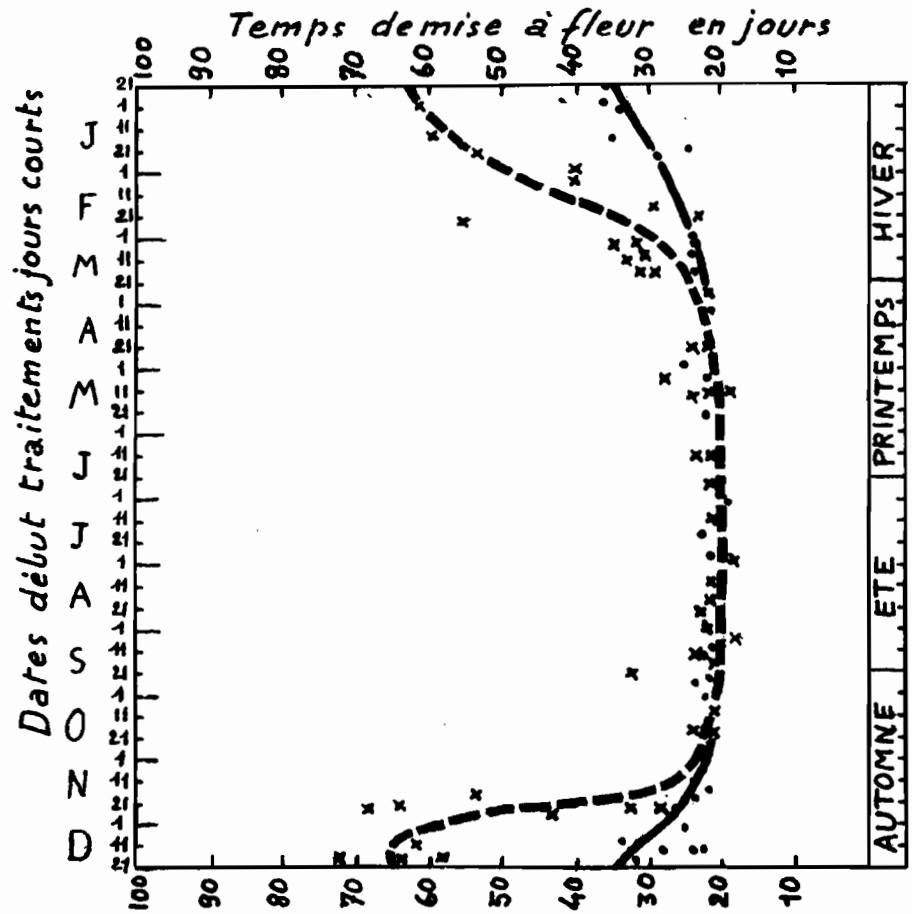
Cependant, la qualité et l'intensité de la lumière du jour interviennent dans l'efficacité du traitement par les jours courts tout au long de l'année.

(D'après J. Deagasco et P. Seloge - *Manuel de Photographie scientifique* - 1956 - Publ. Rev. d'Optique, Paris 1956)



Température de couleur de l'éclairage naturel en fonction de l'heure de la journée et du jour de l'année en France

Les courbes tracées correspondent aux hauteurs solaires de 5°, 8°, 12°, 18°, 25°, 35° et 55°. Les zones qu'elles délimitent correspondent aux températures de couleur moyennes indiquées.



### B - Variations saisonnières du temps de mise à fleur par les jours courts.

Pendant les mois d'hiver, l'intensité de la lumière du jour dans l'abri vitré tombait à 10.000 et même 5.000 lux, soit dix fois moins qu'en été et la mise à fleur était retardée. Pour connaître les variations saisonnières du temps de mise à fleur, j'ai préparé pendant deux ans des plantes selon la méthode ci-dessus et les ai placées sur les chariots du dispositif précédemment décrit. J'ai noté ensuite la date d'apparition du bouton terminal en jours courts. Les temps ainsi obtenus ont permis de tracer le Graphique IV.

Nous voyons que de mars à septembre, le temps de mise à fleur a varié entre 15 et 22 jours, mais que pendant l'hiver, il s'est produit un retard considérable pouvant atteindre plusieurs mois. J'ai pallié cette déficience en énergie lumineuse en éclairant les plantes pendant cette période à l'aide de lampes Philips à vapeur d'iode de 1000 W à raison d'une lampe pour 1,5 m<sup>2</sup>.

### 3. Conclusions - Méthode adoptée pour la production de boutons standards.

Les résultats ci-dessus ont permis d'adopter la méthode de multiplication végétative et de production de boutons standards suivante :

- Les plantes ont été cultivées dans le dispositif décrit précédemment à une température jamais inférieure à 16° C.
- La multiplication était effectuée en jours longs (24 h) à l'aide de boutures "de tête", extrémité de la tige principale de jeunes plantes, elles-mêmes provenant de boutures de plantes en jours longs. La taille de la tige principale des jeunes plantes mères ne dépassait jamais 20 à 22 cm de haut et 10 à 12 feuilles.

La mise à fleur avait lieu après un prétraitement par les jours longs à partir des souches issues du bouturage et rabattues à 3 feuilles. Le prétraitement par les jours longs favorisait la croissance du rameau axillaire de remplacement. Ce dernier ne devait pas dépasser 22 cm (15 à 22 cm) et porter plus de 13 feuilles (10 à 12).

Transférées en jours courts (9 h), les plantes formaient leurs boutons au bout de 15 à 22 jours.

Afin d'éviter un retard trop important dans la mise à fleur pendant les mois d'hiver, les plantes recevaient un appoint de lumière à l'aide de lampes à vapeur d'iode de 1000 W "Philips" à raison d'une lampe pour 1,5 m<sup>2</sup> (distance du sommet des plantes 50 à 80 cm).

Les examens cytohistologiques après fixation des boutons au liquide de Nawashine et coloration à l'hématoxyline de Heidenhain, ont permis de constater que le réceptacle était déjà formé 5 à 6 jours après le début du traitement par les jours courts. La surface du réceptacle tronconique était lisse (Planche VII, fig. 1 et 2), puis vers le 8ème jour, les primordia floraux commençaient à se développer en commençant par la périphérie du réceptacle (Planche VIII, fig. 3). Au moment du prélèvement, les primordia étaient arrivés à l'état de développement de la fig. 2, Planche IX, ceux du centre (hermaphrodites) étaient encore à l'état de mamelon, tandis que ceux de la périphérie commençaient à développer leur corolle. Grâce à ce mode de traitement, il n'existait pas de bractées à l'intérieur du capitule entre les primordia floraux qui étaient au nombre de 200 environ.

Il fallait encore attendre une dizaine de jours pour que les boutons aient un diamètre suffisant (7-8 mm) et un pédoncule assez long (15 mm), afin de faciliter le prélèvement. Seuls les trois premiers boutons axillaires "satellites" dont le mode de développement et la croissance étaient identiques, ont été prélevés.

## II. METHODE DE PRELEVEMENT, DE DESINFECTION ET D'ENSEMENCEMENT DES BOUTONS FLORAUX.

La technique de prélèvement et de désinfection doit être mise au point avec minutie. Il est en effet ennuyeux d'avoir à préparer deux fois plus de cultures qu'il ne faut, sous prétexte que 50 % d'entre elles sont susceptibles d'être contaminées. D'autre part, les contaminations "frappant" au hasard, certaines expériences seraient à recommencer car il ne pourrait pas être fait un nombre suffisant d'observations pour certains traitements.

Les premiers essais de cultures aseptiques de boutons floraux furent décevants, car il y avait jusqu'à 80 % de pertes par contaminations ou brunissements des boutons. J'utilisais alors la méthode habituelle de désinfection préconisée pour la mise en culture des tissus végétaux (GAUTHIER, 291); cette méthode n'était malheureusement pas adaptée au matériel végétal dont je disposais. J'opérais de la manière suivante :

1 - Les boutons étaient prélevés sur les chrysanthèmes maintenus en serre, puis apportés au laboratoire où ils étaient nettoyés.

2 - La stérilisation des boutons était effectuée dans une chambre stérile, à l'aide d'une solution aqueuse de chlorure de chaux, puis lavés trois fois par transvasement d'eau stérile (préparée à l'avance).

3 - L'ensemencement avait lieu en chambre stérile à proximité de



la flamme d'un bec bunsen. Pour cela, je disposais, dans cette chambre, de deux paquets de feuilles de papier stérile. Entre les feuilles du premier paquet, je plaçais les boutons stérilisés dont je sectionnais le pédoncule avec un scalpel stérile, juste avant le repiquage. Entre les feuilles du second paquet, étaient disposées deux paires de pinces de 30 cm de long, qui se trouvaient ainsi protégées, comme les boutons floraux, de la pollution par des spores ou bactéries qui auraient pu rester malgré tout en suspension dans l'atmosphère de la salle.

#### a. Critique de la méthode habituelle.

##### 1. Déshydratation des organes.

Les boutons floraux prélevés sans précautions, trop longtemps à l'avance et non protégés, se déshydrataient plus ou moins, de sorte que pour reprendre leur turgescence, ils absorbaient ensuite la solution antiseptique, ce qui entraînait la mort.

Pour éviter cette absorption, les boutons devaient conserver par conséquent leur maximum de turgescence. C'est la raison pour laquelle ils ont été par la suite prélevés le matin avant que le soleil n'ait occasionné une déperdition d'eau trop importante des plantes, puis ils étaient placés dans un sac en polyéthylène en présence d'un coton humide.

##### 2. Stérilisation de l'atmosphère de la salle d'ensemencement.

La deuxième constatation avait trait à la stérilité effective de la salle d'ensemencement. Un tube ultra-violet disposé au plafond n'était guère efficace ... La stérilisation par des vapeurs d'alcool, effectuée une demi-heure avant l'ensemencement, était réelle mais ne pouvait être maintenue pendant longtemps, parce que l'opérateur lui-même, ses vêtements, ses chaussures ... n'étaient pas stériles et que par ses mouvements, il provoquait une nouvelle pollution de l'air, pollution accélérée par un éventuel apport d'air extérieur au cas où il devait quitter le local à une ou plusieurs reprises.

C'est la raison pour laquelle j'ai préféré par la suite utiliser la technique de la boîte à gants, plus facile à stériliser et laissant la possibilité d'interrompre le travail à tout moment, sans risques de contaminations.

##### 3. Stérilisation du matériel végétal.

Le transvasement du matériel végétal, ou de l'eau stérile pour les lavages, était encore une cause de contamination. En effet, les fla-

cons passés de l'autoclave à la chambre stérile, ont eu le temps de recueillir sur leurs parois extérieures des germes en suspension dans l'atmosphère du laboratoire. Même en prenant la précaution de flamber le col des récipients, il arrivait qu'après un transvasement, une goutte de liquide demeurait sur le bord et filait sur la paroi extérieure, où elle recueillait des germes. En inclinant le récipient pour un nouveau transvasement de liquide, cette goutte revenait à sa position initiale où elle rencontrait le liquide stérile qu'elle polluait à son tour.

Pour parer à cet inconvénient, j'ai imaginé alors une soutireuse (décrite précédemment page 27) qui permet d'éliminer stérilement les liquides antiseptiques et les eaux de lavage.

#### 4. Stérilité des papiers et température des pinces.

Au moment de l'ensemencement, les mains de papier stérile permettaient bien de préserver les pinces et les boutons floraux des pollutions, mais à condition de ne pas avoir à soulever les feuilles trop souvent.

Enfin, malgré un flambage rapide des pinces après chaque ensemencement, et malgré l'utilisation de plusieurs paires de pinces afin de faciliter leur refroidissement entre chaque utilisation, cette technique ne pouvait permettre un travail rapide, car si le refroidissement était insuffisant, les tissus des boutons floraux brunissaient à l'endroit de la prise.

Les feuillets de papier stérile ont donc été remplacés par les flacons à désinfection décrits plus haut et les pinces par une aiguille à ensemençer spéciale.

#### b. Méthode de prélèvement, de désinfection et d'ensemencement des boutons floraux.

##### 1. Prélèvement.

Les boutons floraux de jours courts (trois premiers boutons axillaires de même développement) ont été prélevés lorsqu'ils avaient un diamètre de 7 à 8 mm et un pédoncule de 15 à 20 mm. Ils ont été sectionnés près de la tige, le matin entre 9 et 10 heures (maximum de turgescence des plantes) et placés dans un sac en polyéthylène en présence d'un tampon de coton humide pour être transportés au laboratoire. A l'aide d'une lame de rasoir, les bractées qui n'adhéraient pas suffisamment au bouton ont été sectionnées afin de supprimer tout refuge aux germes. Après désinfection, par la méthode décrite ci-après, l'extrémité des pédoncules a été section-

née à un centimètre sous le bouton (cas de boutons cultivés avec leur pédoncule) ou immédiatement sous le bouton (boutons cultivés sans pédoncule).

## 2. Préparation du matériel pour la désinfection .

- La boîte à gants est stérilisée grâce à l'ébullition d'eau renfermant un comprimé à cryptonol (sulfate double d'ortho-oxyquinoléine et de potassium). La vapeur emplit bientôt l'enceinte et entraîne les germes en suspension dans l'air; le cryptonol a pour mission de les détruire. On allume ensuite le tube à Ultra-violet pour maintenir la stérilité de l'air. Par mesure de sécurité, il est souhaitable de refaire cette désinfection à chaque fois que l'on réutilise la boîte à gants après un arrêt du tube Ultra-violet et du bec bunsen excédant 15 minutes.

- On stérilise à l'autoclave à 120° pendant 20 minutes :

Des fioles à désinfection de 50 cm<sup>3</sup> (destinées plus tard à recevoir les organes à stériliser) munies de leur capuchon et renfermant 10 à 15 cm<sup>3</sup> d'une solution aqueuse à 0,1 % de Tween 80 (mouillant).

Des flacons d'eau stérile bouchés par un tampon de coton et munis d'un capuchon semblable à celui d'une fiole à désinfection. Le tampon de coton permet de conserver ces fioles plusieurs jours sans contamination; il est enlevé à la première utilisation de l'eau. Le capuchon, remis en place, protège les parties extérieures du col des pollutions lors des autres transvasements, si l'on n'a pas utilisé la totalité de l'eau du premier coup.

## 3. Désinfection.

J'ai effectué de nombreux essais comparatifs de désinfection en utilisant l'alcool, l'eau de javel, le chlorure de chaux et le chlorure mercurique. L'alcool et le chlorure mercurique (ce dernier préconisé par NEKRASOVA, 298, se sont montrés très toxiques pour les boutons du chrysanthème; le chlorure de chaux a donné les meilleurs résultats.

Les concentrations de la solution de chlorure de chaux et le temps d'action conseillés varient selon le matériel et les auteurs consultés de 3,5 à 9 % pendant 10 minutes à 12 heures (GAUTHERET, 291). BALDEV, 65, utilise du chlorure de chaux à 5 % pendant 5 minutes pour les apex de cuscute, NITSCH, 118, 119 du chlorure de chaux à 5 % pendant 10 minutes pour des fleurs et ovaires de tomate. C'est la méthode de NITSCH qui m'a donné les meilleurs résultats, à condition d'utiliser du chlorure de chaux frais. Lorsque le sel était stocké un an, il a fallu pour obtenir 100 % de réussites augmenter la concentration à 7 % et traiter pendant 15 minutes.

Nous avons vu ci-dessus parmi le matériel stérilisé à l'autoclave qu'une solution de Tween 80 à 0,1 % (15 cm<sup>3</sup>) était placée dans les flacons à désinfection, l'un des essais préliminaires (qui ne pourront être rapportés ici) a montré que cet agent mouillant permettait en effet une action plus homogène et efficace du chlorure de chaux.

La désinfection des boutons floraux en vue de leur ensemencement a été effectuée selon la technique suivante :

En s'aidant de la boîte à gants précédemment stérilisée, les boutons ont été placés dans les flacons à désinfection contenant la solution de Tween 80 (revenue à la température du laboratoire après autoclave). Ils étaient agités de temps en temps jusqu'à ce que leur surface soit rendue mouillable (cuticule, poils). L'opération était terminée lorsque cette surface, ayant perdu son aspect poudreux, était devenue vert jaune clair uniforme. On procédait alors à l'évacuation du Tween à l'aide de la soutireuse, comme il a été dit précédemment (voir Matériel). La solution de chlorure de chaux à 5 % préparée à l'avance et filtrée était alors introduite dans le flacon à désinfection et le temps d'action chronométré (10 minutes). Lorsque la désinfection était terminée, la solution de chlorure de chaux était évacuée à la soutireuse et une première eau stérile de lavage était introduite. Après agitation légère, cette dernière était retirée à son tour à la soutireuse au bout de 5 minutes, tandis qu'une nouvelle quantité d'eau stérile était introduite, etc. Il était ainsi fait trois lavages successifs aseptiquement.

Lorsque la dernière eau de lavage était soutirée, le pédoncule des boutons était sectionné à la longueur voulue et l'on pouvait procéder à l'ensemencement au moyen de l'aiguille décrite précédemment.

Notons enfin qu'après avoir versé chaque liquide dans le flacon à désinfection, il est nécessaire de flamber le col de ce dernier et de remplacer son capuchon de verre. De plus, il faut éviter de laisser les flacons trop près du bec bunsen dans la boîte à gants, car une élévation de la température peut augmenter l'efficacité du chlorure de chaux ou tuer les boutons.

### III. LE MILIEU DE CULTURE - MISE AU POINT D'UN MILIEU DE BASE.

La plupart des auteurs qui ont étudié le développement des organes floraux en culture "in vitro" ont utilisé, à quelques variations près, les milieux préconisés pour la culture des tissus végétaux. Les premières expériences, au cours desquelles j'ai tenté la culture des boutons floraux de chrysanthème, m'ont montré que ces derniers s'accommodaient mal de tels milieux; beaucoup de boutons floraux ne tardaient pas à brunir et mouraient

après quelques jours. Au départ, je pensais que la méthode de désinfection était trop énergique mais en baissant les concentrations des solutions antiseptiques et en diminuant leur temps d'action, l'amélioration était peu sensible.

J'ai pu constater par la suite que les besoins nutritifs des "tissus floraux" étaient différents de ceux des "tissus végétatifs" en faisant varier les principaux constituants du milieu. Aussi la mise au point d'un milieu nutritif de base m'a semblé nécessaire avant d'entreprendre toute expérimentation sur les boutons floraux de chrysanthème. A cette fin, j'ai effectué des études particulières sur les éléments minéraux et sur les effets des sucres dont je rappellerai brièvement les résultats au cours de l'examen de la composition du milieu de base. Nous verrons successivement : les éléments minéraux, les sucres et les substances diverses (gélose, vitamines, acides aminés, etc.).

#### a. Les éléments minéraux.

Aucune recherche n'avait été tentée pour déterminer les besoins en éléments minéraux des cultures de tissus avant les travaux de HELLER en 1953 (HELLER, 292). La solution de Knop diluée de moitié était habituellement adoptée en Europe, notamment par GAUTHERET (291) et ses élèves, parce qu'elle permettait un développement satisfaisant des colonies tissulaires, tandis qu'en Amérique, c'est la solution de White (mise au point pour la culture des racines isolées) qui était généralement utilisée simplement parce que ce précurseur présentait à juste titre dans son pays une notoriété incontestée (HELLER, 292).

En ce qui concerne la culture des organes floraux et les études sur la formation des fleurs à partir de tissus végétatifs, on voit, d'après le Tableau V, que la plupart des auteurs ont adopté les mêmes milieux que pour la culture des tissus "végétatifs" et n'ont donc guère fait preuve de plus d'originalité.

HELLER (292) a montré que la solution de White qui à l'origine avait été mise au point pour la culture des racines était trop pauvre en phosphore et pouvait provoquer des carences chez les tissus végétaux. Cet auteur a écarté également la solution de Knop.

La solution de Knop est relativement bien équilibrée, mais elle ne m'a pas donné de bons résultats, ainsi que nous le verrons dans la partie de cet exposé réservé aux "Résultats expérimentaux" et, lorsqu'elle est diluée de moitié, elle peut provoquer des carences comme la solution de White. J'ai pensé qu'il était préférable de mettre au point une solution minérale mieux adaptée aux besoins du chrysanthème en voie de floraison.

T A B L E A U V

Auteurs	Année	Matériel végétal	Solution minérale	
LA RUE	1942	Fleurs espèces diverses	White	-
NITSCH	1949	Fleurs tomate	Knop 1/2	Berthelot
-	1951	Fleurs et fruits tomate	Knop 1/2	Nitsch
RAU	1956	Ovaires Phlox Drumondii	Knop 1/2	Mn SO <sub>4</sub> et citrate Fe
MAHESHWARI	1958	Ovaires Iberis amara L.	Knop 1/2	
SACHAR et BALDEV	1958	Ovaires Linaria maroccana	Knop 1/2	Nitsch
TCHAILAKIAN, BUTENKO	1959	Apex transformations bouton Perilla	Tchait (xx)	Heller
TOPONI	1960	Bractées artichaut	Heller	
CHOUARD, AGHION	1961	Hampe florale tabac	Knop 1/2	Berthelot
MAHESHWARI	1961	Ovules Papaver somniferum	-	
AGHION	1962	Hampe florale tabac	Knop 1/2	Berthelot
BALDEV	1962	Ovaires Cuscuta reflexa	White (modifié x)	
GALUN, JUNG, LANG	1963	Boutons floraux de concombre	White (modifié x)	White
TEPFER, GREYSON CRAIG,	1963	Boutons floraux Aquilegia		
PAULET, NITSCH	1964	Formation fleurs sur racines d'endive	Knop 1/2	Nitsch
S.A. SIDDIQUI	1964	Ovules tabac	Knop 1/2	Nitsch
NITSCH et NITSCH	1964	Fleurs sur racines d'endive	Knop 1/2	Nitsch
			Murashige Skoog	
MARGARA	1965	Tiges et boutons floraux: betterave, colza, endive	Murashige Skoog	

x = Selon les auteurs, milieu dérivé "empiriquement" du White

xx = F.R. Tchait (333).

## 1. Besoins du chrysanthème en éléments minéraux pendant la floraison.

La littérature sur la nutrition minérale du chrysanthème est abondante. Les auteurs que j'ai pu consulter insistent surtout sur l'importance de l'azote et du potassium. Les carences relatives en ces deux éléments provoquent des troubles assez graves qui se traduisent par une diminution du poids sec des plantes; elles empêchent la mise à fleur (TEZUKA, 334).

Selon HICKMAN et KAMP (318), la respiration des racines de chrysanthèmes carencés en azote diminue tandis qu'elle augmente dans le cas d'une carence en potassium. Mais dans un cas comme dans l'autre, on observe une accumulation de sucres dans les racines. Les sucres utiles à la mise à fleur, au lieu de migrer vers le bourgeon, se dirigeraient donc dans le sens opposé.

Les quantités d'azote et de potassium exigées par le Chrysanthème au moment de sa mise à fleur sont très importantes, mais c'est le potassium qui paraît le plus indispensable. LUNT et KOFRANEK (326) ont déterminé qu'une plante fertilisée normalement en contient au minimum 100 m.e. pour 100 g de feuilles et que lors de carences relatives, cet élément est si utile à l'organogénèse, que les faibles quantités contenues dans les vieilles feuilles migrent vers les parties jeunes de la plante. Le phosphore, le calcium et le magnésium, à moins de manquer complètement, n'entraînent pas, pour des carences relatives, de troubles aussi graves. Ainsi, pour le phosphore et le calcium, le facteur déterminant n'est pas la concentration ionique mais la quantité totale disponible (TEZUKA, 334, 335). La carence en phosphore provoque une augmentation du pourcentage en chlorophylle, tandis que celle en calcium amène un retard dans la croissance des feuilles et la nécrose du bourgeon. Avec une carence en phosphore, la respiration diminue tandis que pour une carence en calcium, c'est la photosynthèse qui décroît, mais il s'agit là de cas extrêmes.

Il est donc évident que la solution nutritive pour la culture des boutons floraux devra être riche surtout en azote et en potassium. Je n'ai pas trouvé beaucoup de renseignements sur les besoins du chrysanthème en oligo-éléments, mais SALISBURY (331) a mis l'accent sur le rôle prépondérant de l'ion cobalt dans le déclenchement de la mise à fleur de certaines plantes (Xanthium). En principe, les solutions d'oligo-éléments qui n'en contiennent pas sont donc à exclure (solution de Heller). On sait enfin d'autre part que le bore joue un rôle important dans le transport des sucres dont le métabolisme est actif au moment de la floraison (CHKOLNIK et coll. 311) et il n'est pas inutile d'augmenter la proportion de cet élément.

Les remarques précédentes concernant les divers éléments minéraux indispensables à la floraison du chrysanthème doivent être prises au sens large, car chaque variété constitue un cas particulier. Aussi, pour véri-

fier si les renseignements ci-dessus étaient applicables à la variété utilisée ici et pour connaître les rapports des macro-éléments entre eux, j'ai procédé à l'analyse des plantes au moment de leur floraison.

## 2. Analyses minérales de chrysanthème Souvenir de Georges PECHOU (Clône de serre tiède) en floraison.

Les plantes ont été mises à fleur par la méthode décrite précédemment et les parties aériennes ont été prélevées lorsque les boutons avaient un pédoncule de 15 mm. Les analyses ont porté sur les échantillons moyens suivants (chaque échantillon était le produit de 10 plantes) : tiges (partie ajoutée à la base, partie moyenne et partie jeune du sommet), feuilles (âgées de la base des plantes, moyennes adultes, jeunes feuilles du sommet) et boutons floraux.

Les dosages des principaux éléments : eau, N, S, P, K, Ca et Mg ont été effectués selon les méthodes adoptées par le Laboratoire de Physiologie Végétale de l'Institut Français des Fruits et Agrumes coloniaux (\*).

L'azote a été dosé par la méthode de Kjeldahl

Le soufre par turbidimétrie

Le phosphore par la méthode au vanado-molybdate d'ammonium

Le potassium par photométrie de flamme; Beckman alimenté au mélange oxygène-hydrogène

Le calcium par photométrie de flamme (les résultats ont été vérifiés par la méthode au versenate et par dosage manganométrique du cation à l'état d'oxalate).

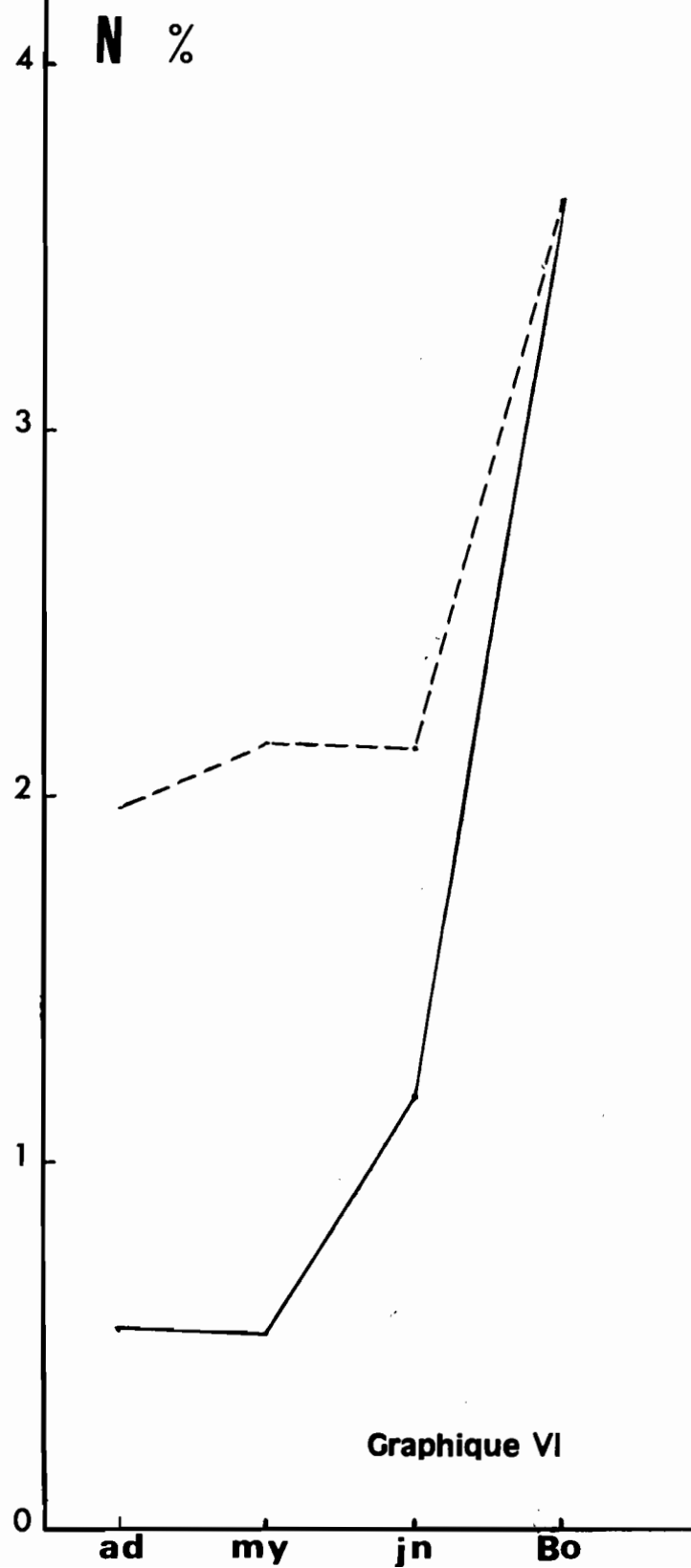
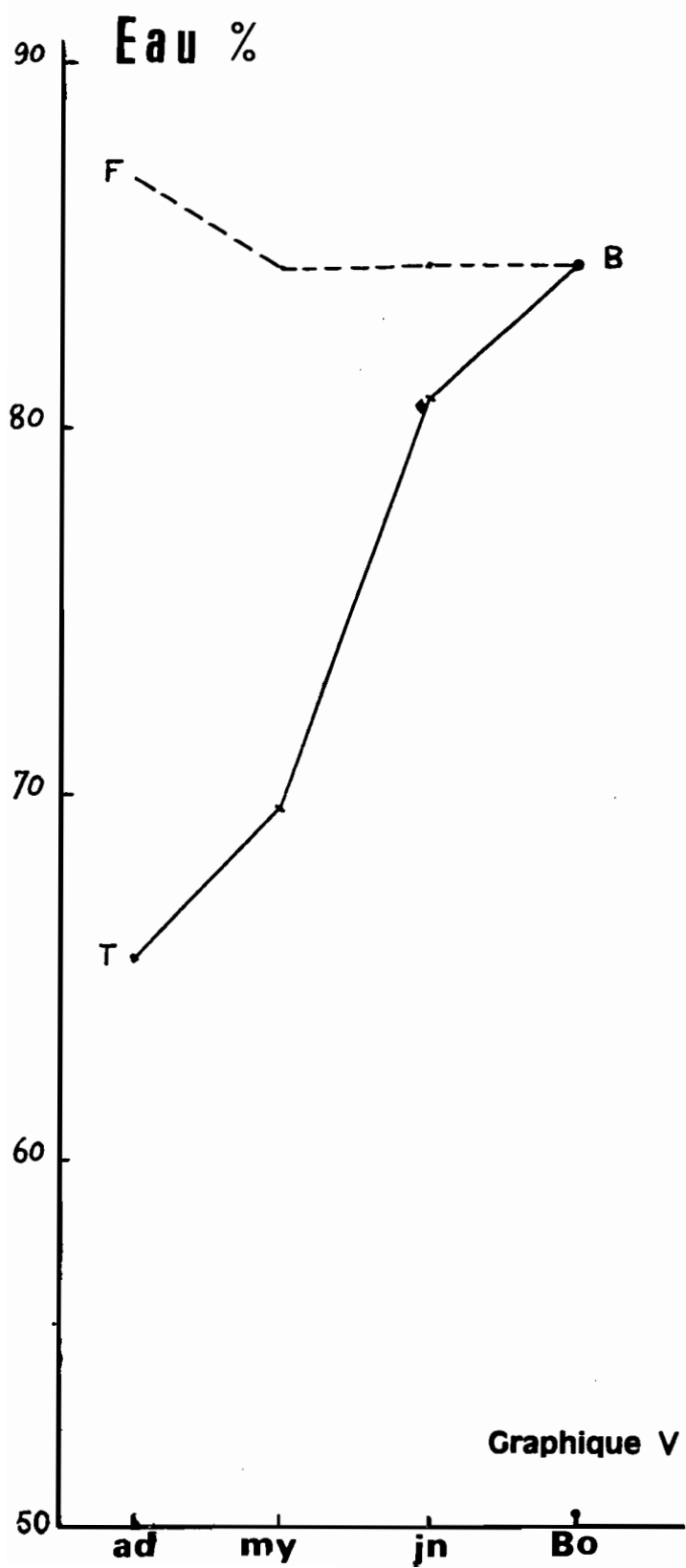
Le magnésium par complexométrie et colorimétrie.

Les résultats figurent dans le tableau VI.

---

(\*) Je remercie bien sincèrement M. MARTIN-PREVEL, Physiologiste à l'IFAC, qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire et mettre à ma disposition le matériel nécessaire aux analyses, ainsi que Mme RABECHAULT pour son aide et ses précieux conseils. Je tiens à associer également à cet hommage Melle SCHEIDECKER, Physiologiste à l'ORSTOM et Mme GUENIN qui, au laboratoire de Biochimie de l'ORSTOM à Bondy, ont fait les analyses de contrôle.





T A B L E A U V I

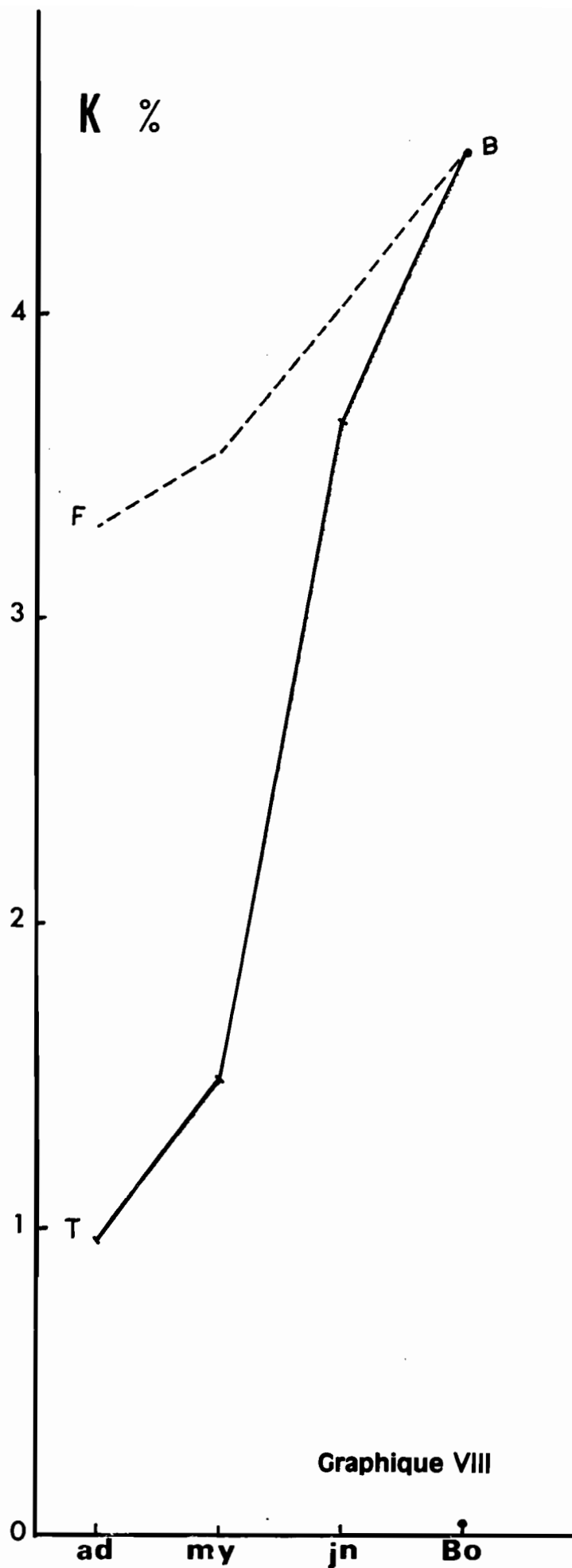
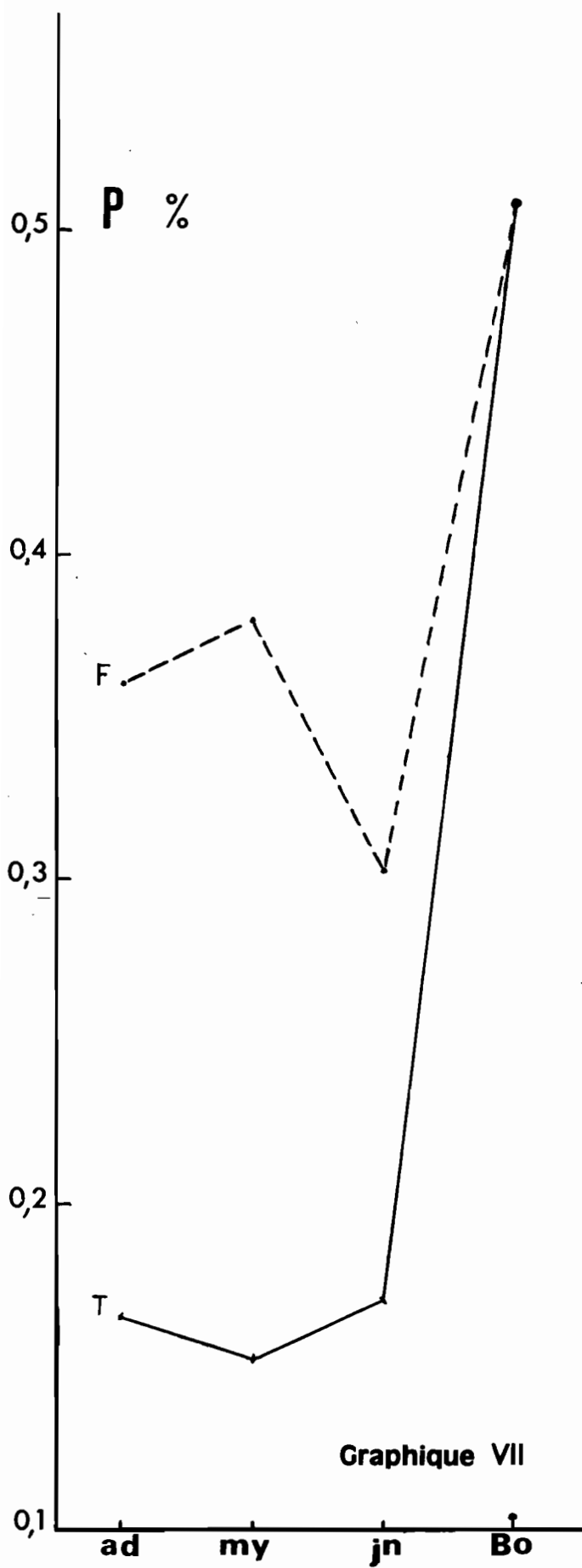
Echantillons	Eléments % matière sèche					
	N	S	P	K	Ca	Mg
Boutons floraux	3,637	0,365	0,507	4,53	1,130	0,300
Jeunes tiges	1,184	0,106	0,170	3,65	0,980	0,239
Jeunesfeuilles	2,129	0,299	0,302	4,03	1,860	0,314
Tiges moyennes	0,535	0,096	0,152	1,48	0,475	0,101
Feuilles moyennes	2,143	0,295	0,380	3,55	1,760	0,283
Tiges aoutées	0,549	0,091	0,165	0,96	0,280	0,062
Feuilles âgées	1,974	0,289	0,360	3,30	2,115	0,338

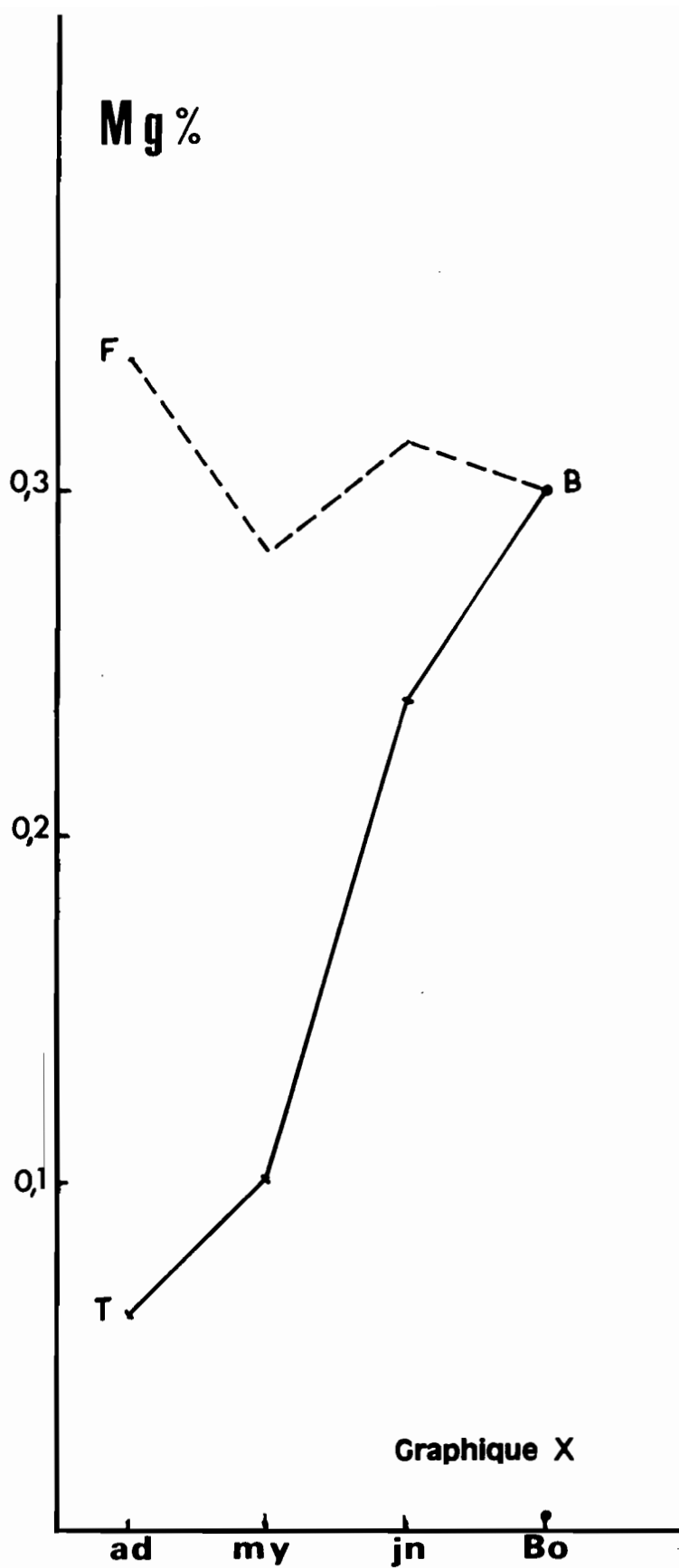
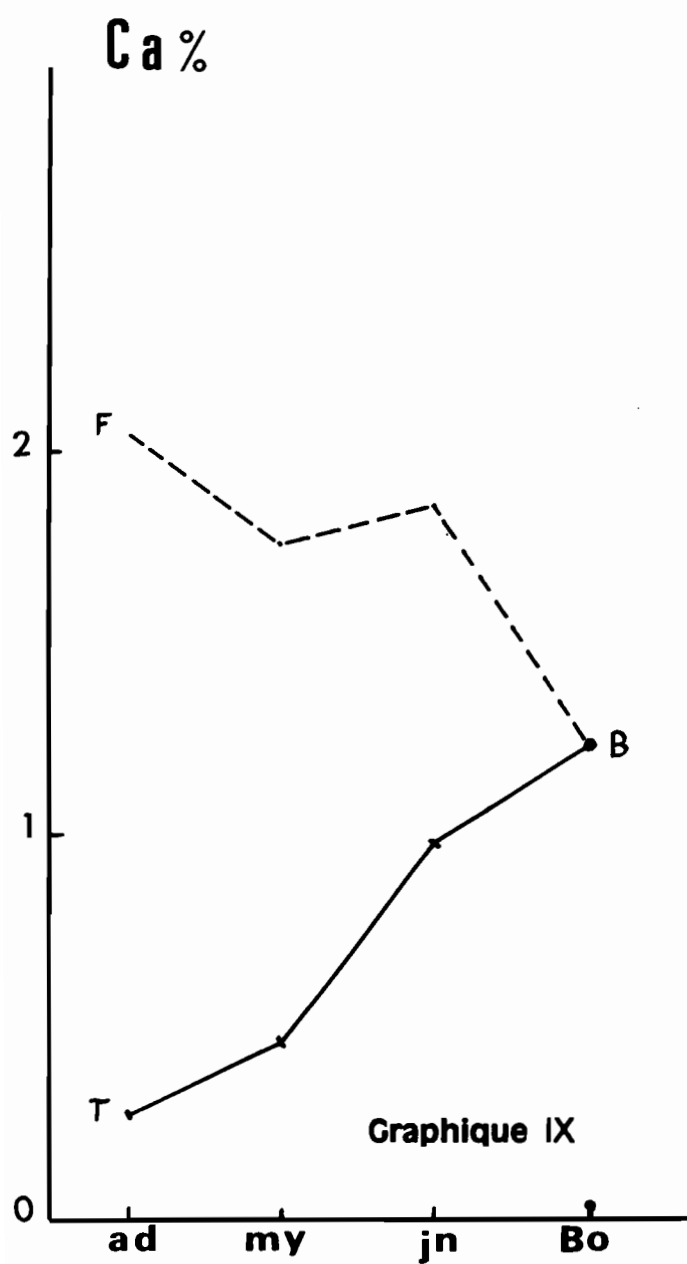
Les graphiques VI à X traduisent les teneurs des trois portions de la tige T (trait plein) ad (aoutée) my (moyenne) et jn (jeune), des trois sortes de feuilles F (trait interrompu) pour les mêmes niveaux ad (adultes) my (moyennes) jn (jeunes) et du bouton floral (bo), en eau, en azote, en soufre, en phosphore, en potassium, en calcium et en magnésium.

Examinons tout d'abord les trois éléments trouvés en plus fortes proportions : l'eau, l'azote et le potassium :

Eau (Graphique V) : On remarque que la teneur en eau dans la tige augmentait en allant vers les parties jeunes (65,4 à 80,8 %) et que celle du bouton au sommet était sensiblement dans l'axe de la courbe (84,4 %), l'accroissement en allant de la base de la tige au bouton floral est régulier. En ce qui concerne les feuilles adultes et les jeunes feuilles, la teneur était à peu près identique à celle du bouton floral et les différences n'étaient pas significatives (84,4 à 86,9 %).

Azote (Graphique VI) : La teneur en azote par rapport à la matière sèche était, comme celle de l'eau, d'autant plus importante que les parties étaient plus jeunes. Dans les tiges, la teneur passait de 0,549 (Tiges aoutées) à 1,18 % (jeunes tiges), il en était de même pour les feuilles 1,97 à 2,12. On remarque un décalage de la teneur du bouton floral nettement plus riche par rapport aux autres parties de la plante (3,63 %), ce qui confirme bien les données recueillies dans la littérature.





Le potassium (Graphique VIII), les coordonnées du graphique sont à la même échelle que celles du graphique VI précédent. Ici encore, on remarque que la teneur augmentait vers les parties jeunes de la plante, mais qu'il n'y avait que de petites différences entre les feuilles âgées et moyennes et les tiges aoutées et moyennes. Les boutons, par contre, étaient nettement plus riches (4,53 %).

En ce qui concerne les autres éléments minéraux S, P, Ca et Mg, les teneurs étaient beaucoup moins importantes : à part le calcium, elles étaient inférieures à 1 %. Aussi, il ne faut donc pas comparer les Graphiques de P et Mg avec les autres, sans tenir compte de ce que l'échelle des ordonnées est agrandie 10 fois.

Le soufre était en quantité peu importante; mais la teneur de la tige s'élevait aussi en allant vers les boutons. La teneur moyenne des tiges était de 0,096 %, celle des feuilles 0,295 %, et celle des boutons, nettement plus forte (0,365 %). Les teneurs en soufre n'ont pas été représentées sur les Graphiques.

La teneur en phosphore (Graphique VII) diminuait légèrement des vieilles aux jeunes feuilles, tandis qu'elle était sensiblement égale dans les trois portions de la tige. Les boutons floraux ici aussi, étaient plus riches que les autres parties de la plante.

Pour le calcium (Graphique IX), l'allure du graphique est différente de celle des graphiques tracés pour les autres éléments. Les teneurs augmentaient en allant vers le sommet des tiges, tandis qu'au contraire, elles diminuaient des feuilles âgées aux jeunes feuilles. Les boutons avaient là une teneur intermédiaire entre les deux organes tige et feuilles.

En ce qui concerne enfin le magnésium (Graphique X) et bien que les teneurs étaient beaucoup plus faibles que celles en calcium (toujours inférieures à 0,4 %), l'allure du graphique est à peu près la même. Toutes proportions gardées, le magnésium augmentait graduellement dans les tiges comme l'eau en allant vers le bouton floral (Graphique V). La teneur des boutons se plaçait à peu près au même niveau que celle des jeunes feuilles et des feuilles moyennes (différences non significatives).

Les résultats (moyennes de 10 échantillons) ont montré que chez le chrysanthème, la quantité totale d'ions N, S, P, K, Ca et Mg représentait 10,365 % de la matière sèche et que dans le total des ions, le pourcentage des cations (56,08 %) était plus important que celui des anions (43,9 %).

### 3. Calcul de la solution nutritive.

Les auteurs spécialisés sur la nutrition minérale des végétaux (CHOUARD, 312 - HEWIT, 317 - HOMES, ANSIAUX et VAN SCHOOR, 320) mettent en général l'accent sur la nécessité d'un équilibre entre les anions et les cations, le rapport anions/cations doit être voisin de l'unité. Une bonne solution doit renfermer 44 milliéquivalents (m.e.) ioniques environ (ex. Sol. Hoagland et Arnon, 312) et sur cette base, dans le cas du chrysanthème, 43,9 % d'anions seront traduits exactement par 19,31 m.e. Mais en tenant compte des pertes possibles d'azote et de soufre au cours des dosages, on peut estimer qu'il est nécessaire d'arrondir ce chiffre à 20 m.e. d'anions, ce qui nous laisse 24 m.e. de cations.

Si l'on respecte les rapports des éléments déterminés à partir des pourcentages donnés par les analyses, les 20 m.e. anioniques et les 24 m.e. cationiques se répartiront de la manière suivante (Tableau VII) :

T A B L E A U V I I

Anions		Cations	
	%		%
N	79,89	K	75,176
S	8,02	Ca	19,955
P	10,08	Mg	4,868

ce qui, en milliéquivalents, donne respectivement (Tableau VIII) :

T A B L E A U V I I I

Anions en m.e.		Cations en m.e.	
Calculé	Adopté	Calculé	Adopté
N 15,978	16	K 18,04	18
S 1,604	2	Ca 4,77	5
P 2,016	2	Mg 1,15	1
Total	20		24

La formule de la solution adoptée (choix des sels et proportions) figure dans le tableau IX; je l'ai baptisée "Solution F" (de floraison). Elle peut sans doute être encore améliorée mais elle donne de bons résultats. Je n'ai pas étudié notamment la possibilité d'introduction d'ions  $\text{NH}_4$  dont MOREL (294) a montré l'action stimulante sur l'organogénèse. Mais à ce point de vue, les ions K qui ont, selon le même auteur, des propriétés identiques sont en proportion largement suffisante. Cette perfection pourra être recherchée à l'aide d'expériences ultérieures, à condition que les tissus du chrysanthème tolèrent les ions ammoniacaux.

J'ai cherché tout d'abord à conserver les rapports entre les cations qui, selon les auteurs spécialisés (CHOUARD, 312 - HEWIT, 317 - TRUOG, 336, 337, etc) sont caractéristiques pour chaque espèce végétale élevée en milieu hydroponique.

TABLEAU IX

SOLUTION NUTRITIVE MINERALE POUR LA CULTURE DES BOUTONS DE CHRYSANTHEME

Sels utilisés	Poids mole.	Nb. de m.e. ch. apportés par 1 g. de sel		Titre de la sol. mère en g/l		Nb. cc de sol. de la mère pr. 1 l sol. nutr.	Titre de la sol. nu- tr. en : mg/l	Nombre de m.e. ioniques apportés					
		anions	cations					NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>- -</sup>	PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> <sup>-</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>++</sup>	Mg <sup>++</sup>
(NO <sub>3</sub> ) <sup>2</sup> Ca	164	12,2	12,2	M/2	82	5	409	5				5	
NO <sub>3</sub> K	101,1	9,9	9,9	M	101,1	11	1 111	11			11		
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K	136	22,1	7,4	M/3	45,3	3	136			3	1		
SO <sub>4</sub> K <sub>2</sub>	174,0	11,5	11,5	M/2	87,0	6	522		6		6		
SO <sub>4</sub> Mg 7H <sub>2</sub> O	246,6	8,1	8,1	M/2	123,3	1	123		1				1
							2 301	16	7	3	18	5	1
									26			24	

La plasticité des anions est plus grande et les limites de leurs variations admises pour un végétal sont plus larges, surtout en ce qui concerne l'ion  $\text{SO}_4^{--}$  vis à vis duquel le chrysanthème est peu sensible \* (la carence mise à part bien sûr <sup>4</sup>!). Le rapport des anions aux cations doit être voisin de 1 d'après les auteurs spécialisés (loc. cit.). Ici, ce rapport serait de  $20/24 = 0,83$ , ce qui traduit une certaine basicité. Quelques cations risqueraient de précipiter selon une table de leur solubilité en fonction du pH donnée par TRUOG (274). Or, le pH du suc cellulaire exprimé des boutons floraux prélevés au milieu de la journée varie de 5,8 à 6,4. Le pH de notre milieu serait donc un peu trop élevé. Il est vrai que dans les boutons, cette acidité est en partie le fait d'acides organiques.

Le problème principal était celui des ions K que j'étais obligé d'ajouter sous forme de KOH pour ne pas changer les proportions d'anions. Cette addition risquait d'entraîner la précipitation du calcium et du fer, et comme pour éviter cela il fallait acidifier à l'aide d'une solution d'acide sulfurique, cela revenait à ajouter directement du sulfate de potassium, ce que j'ai fait. Les anions gagnent ainsi 6 m.e. mais sous forme de  $\text{SO}_4^{--}$ , ce qui, étant donné la tolérance du chrysanthème pour cet élément, ne présentait pas <sup>4</sup> trop d'inconvénients. J'aurais pu acidifier à l'aide d'un ou de plusieurs acides organiques, mais comme je n'ai effectué aucun dosage de ces acides chez le chrysanthème et que je n'ai pas fait d'expériences pour en connaître les effets, j'ai donc été obligé de ne pas en tenir compte dans ce premier travail.

La "solution F" dont la composition figure au tableau IX, a après addition des oligo-éléments (Tableau XXIV), un pH voisin de 5,5.

La pression osmotique des solutions nutritives les plus courantes, préconisées dans les ouvrages consacrés aux recherches sur la nutrition minérale des plantes par la méthode de culture hydroponique (CHOUARD, 312 - HEWIT, 317, HOMES, ANSIAUX et VAN SCHOOR, 320) est en général assez faible, de manière à permettre une bonne absorption des ions par les racines. Les auteurs de ces ouvrages conseillent de ne pas dépasser 3 grammes de sels par litre, et en général, les solutions utilisées dans ce cas renferment des quantités voisines de 2 gr. par litre. Nous avons dans la formule F 2,301 g/l, ce qui correspond à 50 m.e./l au total. Sa pression osmotique est de 1,120 atmosphères. Or, la tolérance pour les végétaux supérieurs vivant sur solutions minérales est de 0,5 à 1,5 atmosphères. La solution préconisée est donc bien dans les limites permises.

Comparons à présent la solution F (solution pour un développement floral) à une solution destinée à un développement végétatif, par exemple le Knop souvent utilisé. La teneur en sels du Knop est inférieure : 1750 mg contre 2301 pour la solution F. La pression osmotique de la solution de Knop est aussi plus faible, 0,748 atmosphères (33,4 m.e.) contre 1,120 atm. (50 m.e.); le rapport des anions 18,5 sur les cations 14,9 est de 1,24, cette solution est donc nettement acide.

Quant à la répartition des ions du Knop, elle est toute différente (Tableau X)

---

\* L'addition de potassium aurait pu être effectuée sous la forme de chlorure, mais ce n'était pas très indiqué pour le chrysanthème qui est très sensible à l'ion chlore (KOSTER, 321 - LUNT, OEFFEL et KOHL, 325).



T A B L E A U X

	mg/l	$\text{NO}_3^-$	$\text{SO}_4^{--}$	$\text{PO}_4\text{H}_2^-$	$\text{K}^+$	$\text{Ca}^{++}$	$\text{Mg}^{++}$
$(\text{NO}_3)_2 \text{Ca} 4 \text{H}_2\text{O}$	1000	8,5				8,5	
$\text{NO}_3\text{K}$	250	2,47			2,47		
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	250			5,52	1,85		
$\text{SO}_4\text{Mg} 7 \text{H}_2\text{O}$	250		2,02				2,02
		10,97	2,02	5,52	4,32	8,5	2,02
Total m.e. anions-cations		18,5			14,9		
Total m.e. ioniques		33,4					

Lorsque le Knop est dilué de moitié, les données ci-dessus doivent être diminuées de moitié aussi évidemment. C'est dire que dans ces conditions, le Knop risque non seulement d'être inefficace, mais aussi qu'il peut produire des carences notamment en magnésium, en potassium et en phosphore.

Les pourcentages des ions s'équilibrent comme suit pour les deux solutions (Tableau XI) :

T A B L E A U X I

Ions	Knop		Solution F	
	m.e. anions du % du total des m.e. anioniques	m.e. ioniques	m.e. anions du % du total des m.e. anioniques	m.e. ioniques
$\text{NO}_3^-$	59,29	32,84	61,5	32,00
$\text{SO}_4^{--}$	10,91	6,04	26,92	14,00
$\text{PO}_4\text{H}_2^-$	29,72	16,52	11,53	6,00
	id. cations		id. cations	
$\text{K}^+$	29,06	12,96	76,66	36,00
$\text{Ca}^{++}$	57,04	25,45	20,83	10,00
$\text{Mg}^{++}$	13,55	6,04	4,16	2,00

Les pourcentages des divers éléments par rapport à l'ensemble des ions indiquent que la solution de Knop (pour tissus végétatifs) est surtout riche en azote et en calcium, tandis que dans la solution F, l'azote et le potassium dominant. C'est important, car nous avons vu que cela correspond à la proportion de ces deux éléments dans les boutons floraux, mais il convient de rappeler aussi, comme je l'ai indiqué dans le début de ce chapitre, que les carences relatives en ces deux éléments perturbent chez la plante entière la polarité de la migration du phosphore (Tezuka loc. cit.) et des sucres; les sucres utiles à la floraison, au lieu de s'accumuler dans le bourgeon terminal puis le bouton floral, migrent au contraire vers les racines (HICKMAN et KAMP, 318). Enfin, COMBES (313, 314) a montré que la floraison correspondait à une migration importante de substances azotées vers les organes floraux.

En ce qui concerne les oligo-éléments, HELLER (292) et GAUTHERET (291) ont longuement discuté des solutions proposées par divers auteurs pour la culture des tissus. Ces remarques pertinentes n'ont sans doute pas la même valeur pour la culture des organes floraux. Je n'ai pas fait d'expériences à ce sujet, je me suis contenté de modifier les solutions proposées en fonction des remarques faites par divers auteurs sur le rôle des oligo-éléments dans la floraison. La solution utilisée et qui m'a donné satisfaction est la suivante (Tableau XII) :

T A B L E A U   X I I  
SOLUTION D'OLIGO-ELEMENTS POUR LA CULTURE  
DES BOUTONS FLORAUX

Composition de la solution mère		Quantité apportée au milieu définitif par 1 cm <sup>3</sup> de sol. mère (en mg)	
Sels	poids en mg pour 1000 cm <sup>3</sup>	Sels	Oligo-éléments
SO <sub>4</sub> Mn 7 H <sub>2</sub> O	2000	2,000	Mn = 0,3965
SO <sub>4</sub> Zn 4 H <sub>2</sub> O	1000	1,000	Zn = 0,2273
SO <sub>4</sub> Cu 5 H <sub>2</sub> O	50	0,050	Cu = 0,0127
Cl <sub>2</sub> Co 6 H <sub>2</sub> O	50	0,050	Cl = 0,0074 Co = 0,0124
Cl <sub>3</sub> Al	30	0,030	Al = 0,0061
Cl <sub>2</sub> Ni 6 H <sub>2</sub> O	30	0,030	Cl = 0,0045 Ni = 0,0074
Mo O <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> 2 H <sub>2</sub> O	25	0,025	Mo = 0,0099 Na = 0,0024
Ik	20	0,020	I = 0,0153
BO <sub>3</sub> H <sub>3</sub>	2000	2,000*	B. = 0,3496
Eau Q.S.p.	1000 cm <sup>3</sup>		
Prise 1 cm <sup>3</sup> /Kg milieu			

(\*) La quantité d'acide borique qui empêche la chute des fleurs chez le Lupin est de 1 % selon AARTS (378).

Le Fer est ajouté séparément sous forme d'EDTA de manière à obtenir un milieu définitif renfermant 5 mg/Kg de cet élément. On peut, comme pour le Bore, doubler ou même tripler cette quantité sans craindre de dommages.

b. Les sucres.

Il y a eu jusqu'à présent très peu de travaux en ce qui concerne l'effet des sucres sur la floraison et l'évolution des fleurs "in vitro". Certains auteurs ont employé le glucose mais la majorité ont adopté le saccharose parce qu'il donne les meilleurs résultats avec les cultures de tissus végétatifs (Tableau XIII).

T A B L E A U X I I I

Auteurs	Dates	Matériel	Sucres pour 100 cm <sup>3</sup>	
			Saccharose	Glucose
LA RUE	1942	Fleurs diverses	20	-
NITSCH	1949	Fleurs de tomate	50	-
NITSCH	1951	Ovaires -	50	-
RAU	1956	Ovaires Phlox	50	-
MAHESHWARI et LAL	1958	Ovaires Iberis	50	-
SACHAR et BALDEV	1958	Ovaires Linaria	50	-
TCHAILAKIAN et BUTENKO	1959	Apex Perilla transformation fleurs	20	-
RABECHAULT	1960	Boutons floraux chrysanthème	0 à 250	*0 à 200
TOPONI	1960	Bractées artichaut	50	-
CHOUARD, AGHION	1961	Tige et hampe florale tabac		30
AGHION	1962	"	30	100
BALDEV	1962	Ovaires cuscute	50	
TEPFER, GREYSON et HINDMAN	1962	Boutons floraux Aquilegia	20	*
GALUN, YUNG, LANG	1963	Boutons floraux concombre	20	
PAULET, NITSCH	1964	Fleurs sur racine endive	30-50	
NITSCH et NITSCH	1964	"	30-40*	
AGHION-PRAT	1965	Fleurs sur hampe florale tabac		30
MARGARA et RANCILLAC	1966	Tissus de racine d'endive	40-85 *	-

(\*) Ces auteurs ont étudié les effets de plusieurs sucres.

Pour favoriser le développement des boutons de chrysanthème "in vitro", le mieux serait sans doute de mettre à leur disposition les sucres que l'on rencontre dans la plante au moment de la floraison. Le métabolisme des glucides chez le chrysanthème a fait l'objet des travaux de KAZARJAN, AVUNDZAJAN et KARAPETJAN (343) en 1960. Ces auteurs ont déterminé les variations de la teneur des divers glucides libres et des glucides issus de l'hydrolyse des polysides au cours de la vie de la plante qui comprend : la phase végétative, la floraison et ce que ces auteurs ont appelé la phase de "défloraison", ceci dans tous les organes : bourgeons, boutons floraux (pétales et réceptacles), feuilles, tiges et racines.

Ne connaissant pas cette publication, j'ai effectué la même année des analyses identiques et notamment des chromatographies d'extraits de divers organes de chrysanthèmes de la variété Souvenir de Georges PECHOU (racines exceptées) au stade végétatif et après le début de la floraison. Mes résultats ont confirmé dans leur majorité ceux des auteurs russes en ce qui concerne les organes analysés pour les périodes de développement végétatif et de la floraison.

D'une manière générale, le nombre et les concentrations des glucides libres relevés dans les divers organes (Bourgeons, feuilles, tiges et racines) pendant la phase végétative étaient à peu près identiques : pour tous les organes et en ce qui concerne le saccharose, le glucose et le fructose. Les auteurs russes ont annoncé qu'ils avaient trouvé du maltose dans les racines, alors que le dessin de leur chromatogramme indique la présence de ce sucre dans la tige.

Par l'hydrolyse à l'acide sulfurique, les polysides du bourgeon et des feuilles ont libéré : un acide uronique, du galactose, du xylose, du ribose et du rhamnose. L'acide uronique et le galactose sont remplacés dans les racines par une substance indéterminée et du sorbose. Dans les tiges, tous les sucres cités ci-dessus, issus de l'hydrolyse des polysides, excepté le sorbose, sont présents. Les concentrations en sucres libres extractibles à l'alcool à 70° étaient à peu près équivalents d'un organe à l'autre, mais c'est la tige qui renfermait le plus de polysides et les feuilles le moins.

Au cours de la floraison, les analyses ont permis de conclure à une migration des sucres vers la fleur. On observait une augmentation maximum des glucides libres dans les tiges (10 sucres); les feuilles (10 sucres) et les fleurs (9 sucres) et minimum dans le réceptacle des fleurs (3 sucres) et les racines (4 sucres). Les sucres détectés sont le maltose, le saccharose, le galactose, le xylose, le fructose, le glucose, le ribose, le rhamnose et un cétose indéterminé, seul le rhamnose manquait dans les fleurons. Pour ma part, dans la variété Souvenir de Georges PECHOU, j'ai également trouvé du raffinose et du stachyose dans les feuilles, les tiges et les boutons floraux. Il est à signaler que la plupart de ces sucres n'ont pas été rencontrés au stade végétatif, surtout dans l'hydrolysât des polysides.

Il y aurait une migration importante et une accumulation de sucres dans les tissus des plantes en floraison et en particulier dans les boutons floraux. Ceci confirme bien les résultats obtenus par d'autres auteurs chez d'autres espèces, et notamment en France par COMBES (386).

Lorsque la floraison était terminée, on observait au contraire une diminution du nombre et de la quantité des sucres libres et de ceux issus de l'hydrolysât des polysides dans tous les organes aériens, tandis qu'ils **augmentaient dans les racines**. Cette accumulation dans le système racinaire est sans doute utile pour la production des rejets qui remplaceront la tige principale l'année suivante.

Les résultats ci-dessus sont résumés dans le tableau XIV.

T A B L E A U X I V

Modification du nombre des glucides dans les différents organes du chrysanthème suivant les phases du développement (selon KAZARJAN, AVUNDZAJAN et KARAPETJAN, 343)												
Fractions	Phase du développement											
	Stade végétatif				Floraison				Défloraison			
	feuilles	tiges	racines	apex végétatif	feuilles	tiges	racines	pétales	réceptacle	feuilles	tiges	racines
Sucres libres	3	4	3	3	10	10	4	9	3	6	6	6
Hydrolysats des polysaccharides	5	8	6	6	5	5	6	5	3	6	4	2
Nombre global de sucre	6	10	6	7	10	10	6	9	4	10	6	8

La phase florale correspond donc à une biosynthèse des sucres et à un changement dans leur répartition. Il est intéressant de constater que certains d'entre eux (les hexoses et polymères) sont retrouvés avec une grande fréquence. Ce sont le saccharose, le glucose et le fructose ou lévulose qui sont à la base de nombreuses biosynthèses; les pentoses sont moins nombreux et importants.

Nous verrons dans l'exposé des "Résultats expérimentaux" que les deux sucres qui sont les mieux tolérés par les boutons floraux sont le fructose et le saccharose; les concentrations qui provoquent une croissance et un développement optima (floraison) sont pour le saccharose de 80 à 160 ‰. En réalité, l'optimum pour la floraison est à 100-120 ‰, mais pour reconnaître plus facilement l'effet de l'addition d'autres substances, j'ai préféré adopter pour le milieu de base une concentration inférieure mais qui donne malgré tout de bons résultats, soit 80 ‰.

Notons cependant que l'autoclavage des milieux en vue de leur stérilisation provoque l'hydrolyse d'une faible quantité de saccharose 3 à 4 ‰ (selon RIETSEMA, SATINA et BLAKSLER, 345), ce qui fait environ 3,20 g de glucose et de fructose libres par Kg de milieu.

#### c. Substances diverses.

La gélose est employée habituellement à la dose de 7,5 à 12 ‰; pour les boutons floraux, la concentration la meilleure était 8 ‰. La gélose peut modifier l'absorption des diverses substances du milieu et les équilibres ioniques. KOFLER (345) l'accuse de provo-

quer des carences en phosphore chez les mousses cultivées en milieu aseptique. Un moindre mal est d'utiliser une gélose purifiée Bacto-Agar Difco. Cette substance ralentit d'autre part la pénétration de l'oxygène dans le milieu, c'est la raison pour laquelle j'ai adopté à présent la culture sur milieux liquides agités.

- Le choix et les concentrations des vitamines, des auxines et des acides aminés, relevés dans la littérature, ne reposaient en général sur aucune expérimentation. J'ai utilisé (voir Tableau VI) du Panthoténate de calcium, de la Vitamine B<sub>1</sub> et de l'acide glutamique. Pour ce dernier, une expérience non rapportée ici m'a permis de déterminer que la concentration optima était de 100 mg par kilo de milieu.

#### d. Préparation du milieu définitif de base.

La normalisation n'a pas encore touché les biologistes et dans la littérature, aucun ne parle le même "langage". Certains s'expriment en grammes par litre, d'autres en mg/l, en g/l, en ppm, etc. Les chimistes, eux, donnent leurs résultats en pourcentages par rapport au poids sec ou au poids frais : x grammes % signifie que l'on a x grammes de substances pour 100-x d'autre chose.

Pour les milieux de culture, les proportions sont indiquées en général en g ou mg/l, mais dans ce cas, on ne peut faire aucun rapprochement avec les résultats d'analyse de plantes (qu'il est difficile de traduire en mg/l). Pour les éléments microtrophiques, l'erreur serait peu importante mais lorsqu'il s'agit d'introduire dans le milieu des quantités de sucre allant jusqu'à 250 g, ce n'est pas la même chose.

Dans une solution renfermant 200 g de sucre par litre, l'analyse du milieu ne permet pas de trouver 800 cm<sup>3</sup> d'eau (ou 800 g) car il faudrait pour cela que les deux constituants aient la même densité (Saccharose d = 1588 à 15° C). Il m'a donc semblé plus logique ici de parler en poids et non en volume.

La préparation du milieu de culture de base a été ainsi effectuée selon la méthode suivante :

Un bécher d'une contenance légèrement supérieure à celle nécessaire pour le milieu définitif est placé sur le plateau d'un trébuchet monoplateau K7T Mettler (ou autre marque équivalente) dont la précision est + 30 mg pour 800.000 mg (1/25.000). Le modèle K5T convient également, car il peut peser 2.000.000 mg avec une précision de + 200 mg (1/10.000). A l'aide du bouton de tarage, on ramène l'échelle de lecture à zéro. Il ne reste plus qu'à ajouter les substances du milieu.

Par exemple, pour un kg : le sucre 80 g, 3 à 400 cm<sup>3</sup> d'eau distillée, les prises des solutions mères de macro-éléments indiquées dans le tableau IX, 1 cm<sup>3</sup> de la solution d'oligo-éléments du tableau XII, 1 cm<sup>3</sup> d'une solution d'EDTate de Fer correspondent à 5 mg de Fer, les vitamines, auxines, acides aminés ou autres substances (pesées sur une balance de précision au 1/10<sup>0</sup>) et de l'eau distillée jusqu'à 950 g. Après agitation, le pH est mesuré et amené à 6,0 s'il y a lieu. On complète alors le milieu à 1000 g. par de l'eau distillée.

Si l'on veut obtenir un milieu solide, après la correction du pH, on ajoute 8 g de gélose en poudre (Bacto Agar Difco) et on porte le milieu à l'ébullition dans un ballon

T A B L E A U X V

Sels	Poids en mg	Apport sous la forme de
$(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$	409,00	} Prises de solutions mères (voir le tableau IX)
$\text{NO}_3\text{K}$	1111,00	
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	136,00	
$\text{SO}_4\text{K}_2$	522,00	
$\text{SO}_4\text{Mg } 7 \text{ H}_2\text{O}$	123,00	
$\text{SO}_4\text{Mn } 7 \text{ H}_2\text{O}$	2,00	} Prise 1 cm <sup>3</sup> solution mère (voir le tableau XII)
$\text{SO}_4\text{Zn } 4 \text{ H}_2\text{O}$	1,00	
$\text{SO}_4\text{Cu } 5 \text{ H}_2\text{O}$	0,05	
$\text{Cl}_2\text{Co } 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,05	
$\text{Cl}_3\text{Al}$	0,03	
$\text{Cl}_2\text{Ni } 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,03	
$\text{MoO}_4\text{Na}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,025	
IK	0,020	
$\text{BO}_3\text{H}_3$	2,00	} Prise 1 cm <sup>3</sup> solution (complexon II)
Fer (EDTate)	5,00	
Acide pantothénique	5,00	
Acide glutamique	100,00	} Pesées à part avec une balance au 1/10
Vitamine B <sub>1</sub>	30,00	
Gélose	8000,00	Pesée directe
Saccharose	80000,00	" "
Eau distillée dans le verre : Q.S. pour	1.000.000,00	Pesée directe

(x) Les sels minéraux font partie de la série Purissimum "Merck".

(xx) Bacto Agar Difco

(xxx) Tous les autres corps organiques sont des produits purs.

surmonté d'un réfrigérant à reflux et muni d'un dispositif d'agitation énergique. Lorsque la gélose est fondue, le milieu est mis à refroidir jusqu'à 50° C (prise en masse vers 30° C) et complété alors à 1000 g par de l'eau distillée, agité de nouveau, puis coulé immédiatement dans les tubes de culture pour limiter au minimum l'évaporation de l'eau. Le milieu définitif a donc la composition indiquée dans le tableau XV. Son volume est de 980 cm<sup>3</sup>, sa densité 1020 et son rH-208 mV. Il renferme 81,63 g de saccharose par litre.

#### IV. OBSERVATIONS ET INTERPRETATIONS DES RESULTATS.

Les expériences ont en général été répétées deux et si possible trois fois. Selon les disponibilités en matériel végétal, chaque traitement comportait 12 ou 24 tubes de culture, à raison d'un bouton floral par tube. Dans la majorité des cas, les boutons ont été cultivés avec un pédoncule de 10 mm, cependant, quelques expériences ont été faites comparativement avec des boutons sans pédoncule (effets des sucres, du 2.4 D, de la kinétine et de la kinétine+AIA), mon projet étant ultérieurement de ne mettre en culture que le réceptacle sur lequel se forment les fleurons.

Dans cette première étape, les observations ont porté sur le déroulement de la croissance et de la floraison "in vitro". La croissance était appréciée à l'aide de la mesure des pédoncules et du diamètre des boutons et la floraison à l'aide du comptage des fleurons épanouis. Le mot "floraison" s'applique en général à tous les phénomènes qui traduisent le passage de l'état végétatif à l'état floral. Il sera utilisé ici plus particulièrement pour désigner l'évolution du bouton floral en culture "in vitro".

L'examen de l'effet des divers "traitements" sur l'évolution cytohistologique de la floraison des boutons en culture "in vitro" fera l'objet d'études ultérieures; cependant, quelques observations préliminaires de contrôle ont été effectuées au cours des expériences à l'aide de coupes de boutons inclus à la paraffine (fixation au Nawashine et coloration à l'hématoxyline de Heidenhain).

Enfin, j'ai utilisé pour l'interprétation statistique des résultats la méthode d'analyse de la variance selon le test F (Snedecor, Lison)\* préconisée par GAUTHERET (291) pour la culture des tissus végétaux.

---

\* SNEDECOR, G.W.- Statistical Methods - Iowa State College Press Ames, Iowa 1937.

LISON, L.- Statistique appliquée à la biologie expérimentale - Gauthier-Villars, Paris, 1958.



## R E S U L T A T S   E X P E R I M E N T A U X

Au cours des expériences qui constituent l'objet essentiel de ce travail, j'ai cherché à préciser les meilleures conditions à réaliser pour obtenir une croissance et un développement des boutons floraux du chrysanthème, identiques à ceux de boutons floraux demeurés sur la plante.

Nous avons vu que les plantes mobilisaient beaucoup d'éléments macrotrophiques au cours de la floraison : en particulier de l'azote, du potassium et des sucres. Dans une première série d'expériences, nous allons comparer les effets de deux solutions d'éléments minéraux : la solution de Knop utilisée par la plupart des auteurs et la solution F mise au point dans le précédent chapitre, puis nous chercherons à comparer les effets des principaux sucres : saccharose, glucose et fructose dont la présence a été constatée chez le chrysanthème en voie de floraison.

Mais nous savons aussi que le développement des fleurs est réglé par divers processus de stimulations et d'inhibitions dans lesquels sont impliqués en particulier des auxines, des gibbérellines et des phytokininés agissant à faibles doses. C'est la raison pour laquelle nous chercherons à préciser dans le chapitre Eléments microtrophiques, les effets particuliers à chacun de ces groupes de substances, en incorporant dans le milieu de culture des quantités plus ou moins importantes d'acide indolyl-acétique (AIA), d'acide naphthyl-acétique (ANA), d'acide 2,4 dichlorophénoxyacétique (2,4 D) (groupe des auxines), d'acide gibbérellique (GA) (stimulateur de croissance), d'acide 2,3,5 triiodo-benzoïque (ATIB) (inhibiteur), de kinétine ou 6-furfuryl-amino purine (K) (du groupe des substances excitoformatrices) et de combinaisons kinétine-acide indolylacétique (K-AIA) et gibbérelline-kinétine (GA-K).

### A. ELEMENTS MACROTROPHIQUES.

#### I. ELEMENTS MINERAUX.

J'ai tenté de cultiver des boutons floraux sur des milieux nutritifs pour tissus végétatifs, mais je n'ai pas obtenu de bons résultats, notamment avec les solutions renfermant des chlorures, sans doute à cause de la sensibilité du chrysanthème à l'ion chlore (voir Méthodes).

La fig. 1, Planche VI, représente par exemple un bouton floral cultivé depuis plus

d'un an sur un milieu  $N_2$  de NITSCH (\*). Les fleurons ont très peu évolué : on ne voit sur cette figure qu'un fleuron à potentialité femelle avec sa couronne arrondie (à droite), toutes les autres ébauches sont des fleurons à potentialité hermaphrodite; on remarque en effet déjà les cinq proéminences qui donneront les cinq dents de la corolle tubulée.

L'évolution dans ce cas a été ralentie à cause de la composition de la solution minérale (trop riche en chlore) et sans doute aussi de la faible quantité de sucre utilisée.

Des recherches sur l'effet de chaque élément minéral seraient certainement intéressantes, mais nous nous contenterons ici de vérifier si la solution F mise au point d'après l'analyse de Chrysanthèmes en fleurs convient à la culture "in vitro" des boutons floraux en la comparant à une solution Knop utilisée par de nombreux auteurs.

- Comparaison de l'effet d'une solution minérale de Knop à celui d'une solution minérale F pour deux concentrations en saccharose.

L'expérience comportait quatre traitements :

Solution de Knop	+	30 ‰	de saccharose	(ou K 30)
Solution - -	+	80 ‰	-	(ou K 80)
- F	+	30 ‰	-	(ou F 30)
- F	+	80 ‰	-	(ou F 80)

A ces milieux ont été ajoutés les oligo-éléments, les vitamines et acides aminés du milieu de base habituel (Tableau XII).

Résultats (Planche II et Planche X).

#### 1. Croissance (Tableau XVI).

La croissance des pédoncules a été en général plus importante dans les milieux K et F renfermant 30 ‰ de saccharose et les accroissements observés étaient très significativement différents de ceux obtenus avec les milieux K et F renfermant 80 ‰ de saccharose.

(\*) Milieu  $N_2$  de Nitsch (communication personnelle)

$NO_3^-K$	2000 mg
$ClK$	1500 -
$PO_4H_2Na H_2O$	250 -
$SO_4^{4-}Mg 7 H_2O$	250 -
$Cl_2Ca$	25 -
Citrate de fer ammoniacal Q.S. p. Fer	5 mg
Oligo-éléments (selon NITSCH)	1 cm <sup>3</sup>
Saccharose	30.000mg
Glutamine	100 -
Thiamine	50 -
Eau	1.000cm <sup>3</sup>

T A B L E A U    X V I

Milieux	Croissance		Tumorisat		Rhizogénèse	
	Long. péduncule $\bar{x}$ en mm.	Diam. du bout. $\bar{x}$ en mm	Intensité (a)	Forme (b)	Nombre de boutons racinés %	Nombre de racines par bouton
K 30	26,30	11,80	3,36	digit.	0	0
K 80	20,04	12,10	2,08	nod.	8,3	10
F 30	32,10	12,8	2,60	arr.	0	0(1c)
F 80	24,30	11,9	4,30	arr. boud.	18 %	9(3c)

(a) L'intensité de la tumorisat a été évaluée en nombre de + (Voir Effets de l'AIA).

(b) digit. = digitée; nod. = nodules; arr. = arrondie; arr. boud. = arrondie parfois avec gros prolongements.

(c) avec racines aériennes pour 12 boutons.

La comparaison des deux solutions minérales pour les deux concentrations en sucre montre que la solution F amène une croissance toujours supérieure à celle provoquée par la solution K; les différences constatées étaient très significatives pour un seuil de probabilité de 5 et même de 1 %.

Et il en a été ainsi pour la floraison (nombre de fleurons épanouis), bien que l'augmentation du diamètre des boutons n'ait pas été significativement plus importante ni avec la solution F ni pour la plus forte concentration en sucre.

En outre, il y a eu une plus grande homogénéité dans les tailles finales chez les boutons cultivés sur le milieu F 80; dans les milieux F 30 et K 30 et K 80 quelques boutons ont bruni ou ont eu une croissance très lente (Planche II, fig. 6), alors que d'autres avaient un péduncule qui s'allongeait beaucoup (Planche II, fig. 8).

## 2. Formation d'un cal et rhizogénèse (Tableaux XVI et XVII).

Huit à dix jours après la mise en culture, l'extrémité du péduncule présentait quelques petites nodosités blanchâtres. Vers le 14ème jour, un renflement très net de cette zone était visible chez les boutons du milieu F 80. Au bout du 20ème jour de culture, presque tous les boutons présentaient une tumorisat, mais avec une fréquence et une importance plus grande chez ceux du milieu F 80 (58 %); les boutons du milieu F 30 ne présentaient encore aucune tumorisat. Au 25ème jour, la prolifération cellulaire du cal dans le milieu K 30 avait rattrapé et dépassé celle observée dans le milieu F 80. Cependant, dans la répétition de cette expérience (Tableau XVII), les résultats ont été légèrement différents, la tumorisat au 25ème jour atteignait 83,3 % pour le milieu F 80, tandis qu'elle était infé-

rieure à la première répétition pour le milieu K 30.

T A B L E A U   X V I I  
PROPORTION DE BOUTONS AYANT FORME UN CAL

Observations au bout de	K 30			F 30			K 80			F 80		
	Nbre cult.	cal.	%	Nbre cult.	cal.	%	Nbre cult.	cal.	%	Nbre cult.	cal.	%
1ère répétition												
16 j.	12	0	0	12	0	0	12	2	16,6	12	0	0
20 j.	12	3	25	12	0	0	12	2	25	12	7	58
25 j.	12	8	66,6	12	2	16,6	12	3	25	12	7	58
2ème répétition												
25 j.	9	5	55,5	9	4	44,4	8	2	25	12	10	83,3

Au bout de 81 jours de culture, 100 % des boutons avaient l'extrémité de leur pédoncule tumorisée, excepté ceux du milieu F 30. L'optimum pour la tumoration des pédoncules si nous cultivons des boutons floraux avec une solution de Knop et des concentrations croissantes de sucres, pourrait donc se situer vers 30 ‰ (saccharose). Tandis qu'avec la solution F, le maximum serait déplacé vers de plus hautes concentrations en sucre.

La forme du cal était différente aussi selon le milieu. Dans le milieu de Knop (Planche II) avec 30 ‰ de saccharose, la tumeur était le plus souvent digitée (fig. 2 et 3), tandis qu'avec 80 ‰ de saccharose, cette digitation ne se formait plus, mais il subsistait des nodosités (fig. 4). Dans les milieux F, avec 30 ‰ de saccharose, le cal était plus petit que dans les autres traitements, tandis que dans le milieu F 80, le cal était en général arrondi (fig. 8) et souvent légèrement comprimé verticalement, ce qui lui donnait l'aspect d'un disque épais (fig. 10). Enfin, parfois le cal de boutons du milieu F 80 présentait un ou deux gros prolongements boudinés.

La rhizogénèse a eu lieu en général après la formation du cal à l'extrémité du pédoncule.

### 3. Floraison (\*)

le premier indice du développement des fleurons dans le capitule consistait en l'écartement des bractées au bout d'une quinzaine de jours. Les premiers fleurons se sont

---

(\*) Ce terme s'applique généralement à l'ensemble des phénomènes qui traduisent le passage de l'état végétatif à l'état floral, ainsi que le développement et la croissance des fleurs jusqu'au stade de la fructification, sera utilisé dans le cours du texte, pour plus de commodité, pour désigner les étapes de l'évolution des boutons floraux en culture "in vitro".

dégagés au bout de 21 jours de culture dans les milieux les plus riches en sucre, K 80 et F 80. Ce phénomène correspondait au maximum de l'activité de prolifération cellulaire du cal et de rhizogénèse des pédoncules. Dans les milieux K 30 et F 30, la floraison a commencé beaucoup plus tard (30 à 60 jours).

Les milieux F ont stimulé la floraison dès le premier mois de culture, tandis que les milieux K ont eu un effet dépressif (Tableau XVIII), car sur ces milieux les boutons n'ont fleuri que partiellement. En effet, les premiers fleurons dégagés ont développé une corolle anormale (contournée, rubanée ou arquée), puis la floraison s'est arrêtée.

T A B L E A U X V I I I

Milieux	Nombre de cultures	Floraison		
		Nombre de boutons fleuris	Pourcentage de boutons fleuris	Nombre de fleurs épanouies par bouton
K 30	11	3	27	9
F 30	8	2	16,6	12,5
K 80	12	4	50	6,5
F 80	10	6	60	7,0

La Planche II réunit les dessins de quelques boutons les plus représentatifs de chaque traitement, au bout de 55 jours de culture; le bouton de la fig. 7, prélevé trop tardivement, alors que les primordia floraux avaient atteint un stade de développement avancé, n'a pu malgré tout développer que quelques fleurs femelles ligulées. On remarque en outre que son pédoncule n'est pas tumorisé.

Sur la Planche X, j'ai réuni les photographies des quatre boutons les mieux fleuris de chaque traitement, après 81 jours de culture. On voit que le milieu F 80 (fig. 4) est celui qui a permis le développement du maximum de fleurons. Cette photographie pourrait laisser supposer que le développement de la fleur a été à peu près similaire à celui de fleurs restées sur la plante. Or, il n'en est rien, après une floraison spectaculaire des premières rangées extérieures de fleurons ligulés, les choses en sont restées là. Les autres fleurons ligulés dont les primordia étaient à peine formés au moment du prélèvement et les fleurons hermaphrodites du centre du capitule n'ont pas évolué et sont morts par la suite. On peut remarquer aussi sur la photographie 4 de la Planche X, que les boutons du milieu F 80 qui ont le plus de fleurons épanouis, sont ceux qui ont aussi le plus grand nombre de racines.

Enfin, au cours du deuxième mois de culture, la base de quelques fleurons épanouis sur les boutons cultivés dans le milieu F 30 a commencé à s'allonger peu de temps après; vers le 65ème jour; il s'est développé un rameau au sein de chaque fleuron. Ce rameau portait à la base quelques pièces florales aplaties jaunâtres plus ou moins contournées, puis des pièces en partie jaunes et en partie vertes, puis de petites feuilles. Au bout de

81 jours, 50 % des boutons cultivés sur le milieu F 30 présentaient des réversions florales ( $\bar{x}$  2,7 réversion par bouton).

Des réversions florales sont apparues également sur le milieu F 80, après 81 jours de culture sur 20 % des boutons fleuris, mais comme ces boutons racinés n'avaient pu être repiqués sur un milieu fraîchement préparé, il est possible que la réversion des fleurs était due dans ce cas à l'appauvrissement du milieu en sucre.

Il n'y a pas eu de réversion chez les boutons des milieux K 30 et K 80, mais il est vrai que la floraison sur ces milieux a été peu importante.

En r é s u m é : Les boutons floraux de chrysanthème peuvent survivre sur un milieu de base sans auxine ni substance excitoformatrice, mais leur croissance et leur développement (floraison) sont toujours limités.

L'allongement du pédoncule est favorisé par de faibles concentrations en sucre et par la solution F comparativement à celle de Knop.

Le pédoncule des boutons floraux est capable de développer un cal important surtout avec les milieux K 30 et F 80 (sans auxine), ce qui indique sans doute la présence dans le bouton d'auxines et de substances excitoformatrices (Phytokinines ?).

Le développement des fleurs a été plus important sur les milieux F et surtout sur le milieu F 80; sur le milieu F 30, la plupart des fleurons ont "réversé" (au sein de la fleur s'est développé un rameau végétatif sur lequel on pouvait distinguer à la base quelques pièces florales déformées).

La floraison a été partielle sur tous les milieux; quelques fleurons épanouis étaient presque toujours anormaux même dans le cas le plus favorable avec le milieu F 80. Seuls les fleurons femelles de la périphérie se sont développés; les fleurons du centre n'ont pas évolués et sont morts après deux ou trois mois de culture.

## II. EFFETS DES SUCRES

J'ai étudié les effets des trois principaux sucres présents dans les boutons floraux : le Saccharose, le Glucose et le Lévulose.

### a. Le Saccharose.

Ce sucre semble le plus important; on le trouve dans toutes les parties de la plante, et notamment dans les boutons floraux où il accompagne d'autres polysides tels que le raffinose et le stachyose. Il a été en général utilisé par d'autres auteurs à la dose de 20 à 50 g/l mais en réalité, les tissus floraux ont besoin, semble-t-il, de doses nettement supérieures, 75 à 100 g/l (AARTS, 378 - RABECHAUULT, 135, 136 - AGHION-PRAT, 62).

Au cours de mes premiers essais de culture "in vitro", j'ai déjà signalé que beaucoup de boutons floraux brunissaient et mouraient après quelques jours.

J'ai constaté que la méthode de désinfection dans la plupart des cas n'était pas en cause, et que la solution minérale intervenait également très peu dans ce phénomène. Le brunissement était dû presque toujours aux faibles concentrations en sucre. Ainsi, au cours d'un essai préliminaire dans lequel j'ai utilisé les concentrations 0, 25, 50 et 100 ‰ de saccharose, j'ai constaté que seuls les boutons, dans les deux derniers traitements, restaient tous bien verts et sains.

Dans l'expérience suivante, j'ai essayé onze teneurs en saccharose : 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, et 200 ‰.

## Résultats (Planche III).

### 1. Brunissement.

Dans le milieu sans sucre (Témoin), 6 boutons sur 12 présentaient au 2ème jour une tache brune à l'extrémité du pédoncule et au sommet du bouton. Au 3ème jour, deux boutons sur les 6 tachés ont bruni entièrement. Au 10ème jour, 10 boutons étaient bruns, deux étaient brun foncé et morts. Le 11ème jour, les 12 boutons étaient morts.

Avec 20 ‰ de saccharose, il y avait 4 boutons sur 12 avec des taches brunes le 2ème jour et 6 ont bruni le 3ème jour. A ce moment, chez les boutons sans pédoncule, à la même concentration, 9 boutons sur 12 étaient bruns. Au 11ème jour, il y a eu 76 ‰ (9 boutons sur 12) de boutons bruns et morts parmi les boutons avec pédoncule et 10 boutons sur 12, soit 83 ‰ parmi les boutons sans pédoncule.

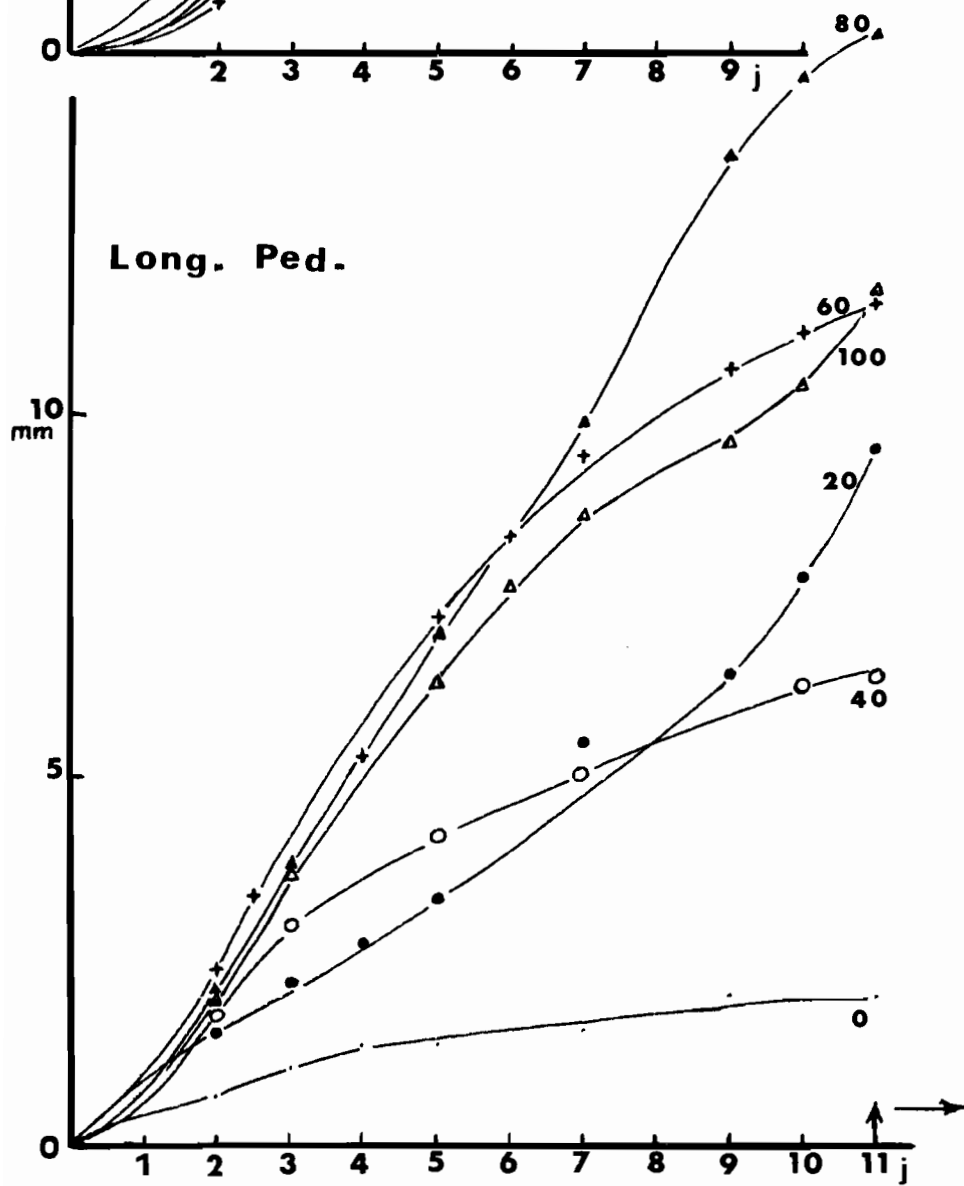
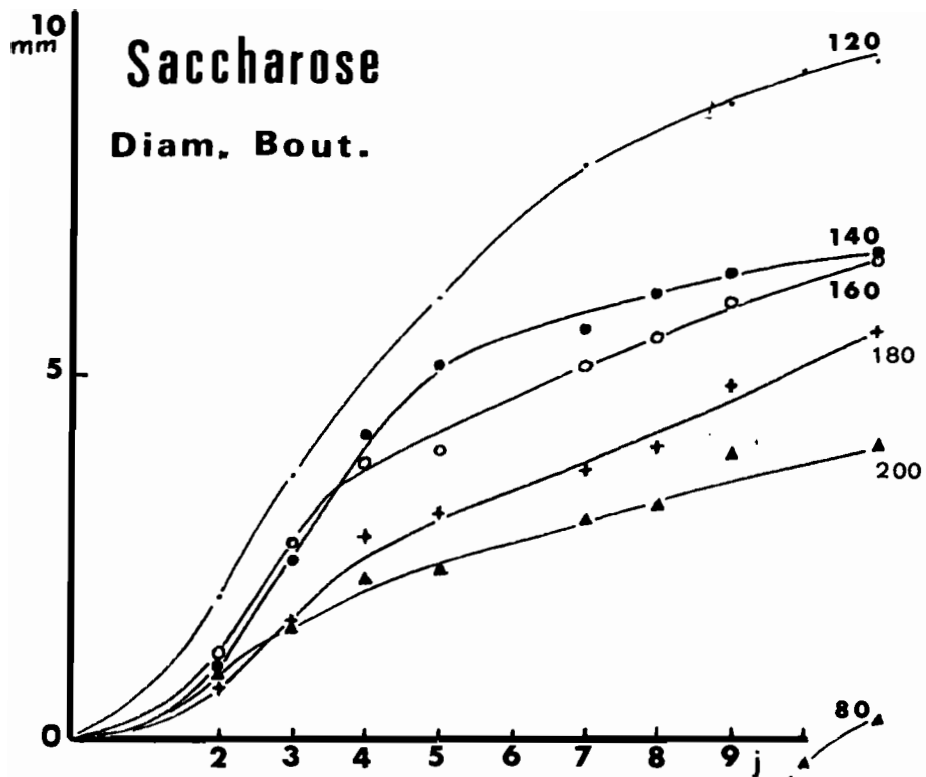
Avec 40 ‰ de saccharose, 2 boutons sur 12 présentaient des taches brunes (boutons avec pédoncule, le 2ème jour, et 4 sont devenus bruns le 3ème jour, soit 33 ‰. Cette proportion est restée inchangée par la suite, tandis que chez les boutons sans pédoncule, un seul bouton présentait des taches brunes et il n'y a pas eu d'autres boutons d'atteints.

Chez les autres concentrations, lorsqu'un bouton brunissait, il était peu après entouré de colonies bactériennes ou de mycélium de champignons, ce qui prouvait que, dans ce cas, la désinfection était en cause mais non la concentration en sucre.

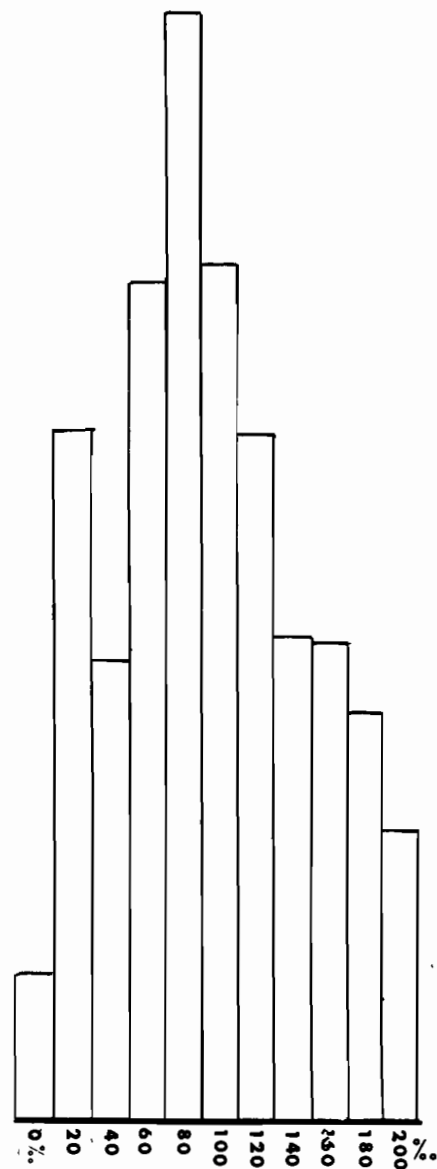
### 2. Croissance.

La première manifestation du développement des boutons se traduisaient par un allongement du pédoncule. Cet allongement (Graphique XI) a commencé dès les premières 24 h. et s'est accéléré du 2ème au 7ème jour. Un ralentissement a été observé vers les 8ème et 9ème jours pour toutes les concentrations et chez les boutons survivants sur les milieux témoins (sans sucre). Cependant, entre 80 et 120 ‰, le ralentissement n'a eu lieu que vers le 11ème jour. Chez les boutons survivants sur le milieu 20 ‰, l'accélération était encore notable au 11ème jour, et s'est poursuivie jusqu'à la mort des boutons survenue quelques jours après.

L'examen du Graphique XI (à droite) de l'augmentation comparative de la taille des pédoncules au 11ème jour, montre que l'optimum se situe entre 60 et 120 ‰, le maximum étant à 80 ‰.



**Graphique XI**





L'augmentation du diamètre des boutons (Tableau XX) a été moins importante, quelques millimètres seulement. Le maximum était observé à 120 et 140 ‰, mais n'était pas significativement différent de l'augmentation du diamètre des boutons développés sur les autres milieux.

### 3. Formation du cal à l'extrémité du pédoncule.

Quelques jours après l'ensemencement (4ème au 7ème jour) et dans presque toutes les concentrations, l'extrémité du pédoncule des boutons présentait un renflement qui a augmenté ensuite peu à peu de diamètre. Des coupes histologiques m'ont permis de constater la présence de nombreuses divisions cellulaires, tout d'abord dans le cambium et qui se généralisaient ensuite au parenchyme cortical et à la moelle. Je n'ai pas constaté de cellules hypertrophiées dans les tissus du cal au cours de ce premier examen. Les nodosités qui sont apparues alors à la surface du renflement correspondaient à autant de racines qui se sont développées par la suite.

Avec 20 ‰ et 40 ‰ de saccharose, chez les boutons qui ont survécu et sont restés en partie verts, le renflement de l'extrémité du pédoncule s'est formé vers le 7ème jour de culture.

Avec 60 ‰, le renflement était visible dès les 3ème et 4ème jours. Il y a eu un maximum de tuméfaction vers le 9ème jour pour les concentrations 20 à 100 ‰. C'est au moment de l'augmentation la plus importante du volume des cals au 7ème jour, que s'est déclenchée en général la floraison (écartement des bractées du bouton).

Le volume maximum atteint par la prolifération cellulaire de l'extrémité du pédoncule a eu lieu dans les concentrations 20 et 40 ‰; c'est dans ces milieux qu'il s'est formé par contre le moins de racines. La forme du cal a été légèrement différente selon les milieux : avec 20 et 40 ‰ de saccharose, elle était sphérique ou subconique (Planche III, fig. 2 a et 2 b) et le bouton ressemblait ainsi à une petite haltère (Planche III, fig. 2); dans les autres milieux, l'extrémité du pédoncule s'est élargie en une sorte de disque (Planche III, fig. 3 b) qui a déjà été observé dans l'expérience précédente.

### 4. Rhizogénèse (Tableau XIX).

Les petites nodosités, de couleur plus claire, apparues sur le renflement de la base du pédoncule, ont donné naissance vers les 8ème et 9ème jours, et bien que le milieu ne renfermait pas d'auxine, à autant de racines. Celles-ci se sont allongées de façon plus active entre le 10ème et le 12ème jours, ce qui correspondait au moment de la plus grande fréquence des épanouissements (fleurons) et à l'arrêt de l'allongement des pédoncules (Tableau XIX).

Au 13ème jour, 80 à 83 % des boutons pédonculés en survie étaient racinés dans les concentrations 60 à 140 ‰. Cette proportion tombait à 66,6 % pour la concentration 160 ‰. Avec 180 et 200 ‰ de saccharose, l'émission de racines a eu lieu 4 à 5 jours plus tard; dans ce cas, le renflement des pédoncules a bien commencé à la même date que pour les concentrations optima, mais les racines ne sont apparues et n'ont commencé à se développer qu'au 13ème jour (180 ‰) et au 14ème jour (200 ‰) de culture.

Le nombre de racines émises par bouton n'était pas significativement différent entre les concentrations 80 à 160 ‰. L'allongement maximum des racines a diminué graduellement de la concentration 60 à la concentration 180 ‰. Cela est sans doute dû à l'augmentation de la pression osmotique du milieu. La concentration 40 ‰ a permis la production des plus grandes racines.

Enfin, des boutons floraux avec pédoncules placés à l'obscurité n'ont pas développé un nombre beaucoup plus important de racines. Quant aux boutons cultivés sans pédoncule, leur rhizogénèse a été très faible.

## T A B L E A U   X I X

### NOMBRE DE RACINES PAR BOUTON ET LONGUEUR MAXIMUM DES RACINES AU 13ème JOUR

	Concentrations en saccharose ‰										
	0	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200
Nombre moyen de racines par bouton	0	0	3	4,6	4,2	7,7	7,5	3,8	6,5	6,0	0
Longueur maximum en mm	0	0	111,6	33,0	26,5	18,3	13,9	14,0	13,0	0,3	
		cal impor tant									

### 5. Floraison (Tableau XX).

Nous avons vu que le début de l'épanouissement, marqué par l'écartement des bractées du bouton floral, débutait sensiblement en même temps que la tumourisation de l'extrémité du pédoncule. La sortie des fleurons a eu lieu lorsque la croissance du pédoncule a marqué un net ralentissement. C'est à ce moment aussi que le pédoncule vert, jaunissait légèrement et cette évolution correspondait absolument à celle des fleurs demeurées sur la plante. Il semblait exister une relation entre la "potentialité" de la rhizogénèse et l'épanouissement des fleurons femelles ligulés, car si les racines ne se formaient que d'un seul côté de l'extrémité du pédoncule, seuls les fleurons situés du même côté dans le bouton se dégageaient des bractées et s'épanouissaient. De même, les premiers fleurons qui se dégageaient des boutons étaient ceux qui étaient situés du même côté que les premières racines formées. Ce phénomène n'a pas été observé par la suite dans les autres expériences, notamment lorsque j'ai ajouté des substances de croissance au milieu de culture. Cette hétérogénéité était peut être due à une distribution anormale de l'auxine endogène.

En général, la floraison s'est déroulée de la manière suivante : l'écartement des bractées a commencé vers le 7ème jour de culture, les pétales jaunes étaient visibles au

centre du bouton mais restaient arqués. La sortie des premiers fleurons ligulés a eu lieu vers les 9ème et 10ème jours, et ils étaient presque tous dégagés et commençaient à se redresser le 11ème jour. Leur épanouissement a eu lieu vers les 13ème et 14ème jours.

Ainsi que dans l'expérience précédente, le développement de la fleur ne s'est pas déroulé complètement comme sur la plante entière; l'épanouissement n'a été complet sur aucun milieu. Dans les cas les plus favorables (100, 120 % de saccharose), les fleurons ligulés femelles des premières rangées extérieures se sont dégagés des bractées et se sont épanouis normalement. Mais le développement des fleurs s'est ensuite arrêté vers l'intérieur du capitule où les autres fleurons femelles n'ont pu former qu'une corolle courte, arquée ou contournée. Quelques fleurs hermaphrodites arrivaient à se développer (les plus extérieures) mais en allant vers le centre du réceptacle, on remarquait que l'évolution des primordia floraux s'était arrêtée très tôt. Les ébauches florales du centre du capitule sont mortes souvent après deux à trois mois de culture (bouton creux).

La photographie de la Planche X (expérience précédente milieu F 30 et F 80) et les dessins de la Planche III qui représentent le bouton le plus développé et le mieux fleuri de chaque traitement, traduisent mal cet état de déficience au sein des capitules. La forme générale du capitule elle-même est quelque peu différente de celle des fleurs restées sur la plante parce que les fleurons ligulés extérieurs ont dû se développer verticalement, dans l'axe du tube de culture.

#### T A B L E A U X X

DEVELOPPEMENT DE BOUTONS FLORAUX DE CHRYSANTHEME VARIETE  
"SOUVENIR DE GEORGES PECHOU" EN FONCTION DE LA CONCENTRATION  
DU MILIEU NUTRITIF EN SACCHAROSE (APRES 12 JOURS DE CULTURE)

Observations	Concentrations										
	0	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200
Diamètre moyen des boutons floraux (en mm)	7 morts brunis sement	7	7,5	8	8	8,5	9	9	8,5	7,5	7
Pourcentage moyen de boutons épanouis	0	0	3	12,5	44	66	45	60	39	15	6
Nombre de fleurs épanouies par bouton	0	0	8	12	10	16	19	14	14	2	3
Longueur des fleurs (en mm)	0	0	30	28	31	19	21	19	15	pas d'épanouissement ou pétales effilés courts	
Réversion après 65j de culture (appauvrissement des milieux)				50%	19%						

Il n'y a pas eu d'épanouissement (Tableau XX) ni même un début d'écartement des bractées chez les boutons restés en survie sur les milieux Témoin et 20 ‰ de saccharose et il n'y a eu qu'un quart environ des boutons restés en survie sur le milieu 40 ‰, qui ont fleuri (floraison irrégulière). Si l'on compte comme fleuris les boutons qui ont manifesté même un début de floraison (écartement des bractées), on en arrive à estimer que la concentration 60 ‰ a provoqué 45 ‰ de floraison. En réalité, le pourcentage de boutons épanouis, c'est-à-dire ayant au moins quelques fleurons femelles développés et dégagés du capitule, était plus faible : 12,5 %. Chez beaucoup de boutons, en effet, les bractées ont commencé à s'entr'ouvrir montrant les pétales jaunes à l'intérieur, mais le processus s'est arrêté là.

Le maximum de boutons épanouis et de fleurons ligulés normalement développés, a été observé pour des concentrations en saccharose de 80 à 140 ‰ (44 à 66 % après 12 jours de culture).

Dans les concentrations de 180 et 200 ‰, les sépales se sont écartés, mais les fleurons ne sont pas sortis. Avec 200 ‰, quelques boutons écartaient leurs sépales et leurs fleurons se redressaient, mais ils sont restés courts (maximum 11 mm) et filiformes. L'allongement des pétales a été maximum pour les concentrations 60 à 120 ‰ où leur longueur maximum variait (non significativement) de 21 à 31 mm, tandis qu'ils n'atteignaient que 9 à 11 mm pour les concentrations 200 et 180 ‰.

Comme dans l'expérience précédente relative à la comparaison des solutions nutritives d'éléments minéraux, des réversions florales sont apparues chez 50 % des boutons fleuris sur le milieu 60 ‰, à partir du 20ème jour de culture (Planche III, fig. 12) et chez 19 % des boutons du milieu à 80 ‰ de saccharose vers le 65ème jour. Les réversions semblent donc se produire à la suite d'un appauvrissement en sucre du milieu de culture, car ici encore le pourcentage était d'autant plus élevé et le délai de l'apparition d'autant plus court, qu'il y avait moins de sucre au départ dans le milieu de culture.

Chez les boutons sans pédoncule, le déroulement de la floraison a été identique, mais le nombre de fleurons épanouis a été un peu plus important que chez les boutons munis de leur pédoncule (Planche III, fig. 13, 14 et 15) pour les concentrations supérieures à 140 ‰. A 160 ‰, il y a eu en moyenne 8 grandes fleurs femelles épanouies normales et 17 fleurs femelles épanouies plus courtes et recourbées par bouton; et pour 180 ‰, certains boutons ont épanoui jusqu'à 47 fleurs femelles ligulées (28 normales à corolle courte et 19 anormales, courtes et recourbées).

En r é s u m é :

- Le brunissement des boutons cesse pour des concentrations supérieures à 40 ‰.
- La concentration qui donne l'allongement maximum du pédoncule dans le minimum de temps, est 80 ‰, mais les concentrations 60 à 140 ‰ donnent également de bons résultats.
- Un cal s'est formé à l'extrémité des pédoncules dans toutes les concentrations (maximum pour 20 et 40 ‰ de saccharose).
- La production de racines ne s'effectue que pour les concentrations supérieures ou égales à 40 ‰ et commence au moment de la libération des premières fleurs.

- L'optimum d'épanouissement des fleurons est légèrement déplacé par rapport à celui de l'allongement des pédoncules, il coïncide avec le maximum d'augmentation du diamètre des capitules, c'est-à-dire pour les concentrations 100 et 140 ‰. Les concentrations 0, 20 et 40 ‰ ont développé à la fois peu ou pas de racines et peu ou pas de fleurs (ligulées). Tandis qu'à l'autre extrémité de la gamme, les concentrations 180 et 200 ‰ ont provoqué un ralentissement du développement et de l'épanouissement des fleurs et ont inhibé l'allongement des racines et des pétales.

- La présence de racines favorise l'épanouissement des fleurons.

- Enfin, 50 % des boutons fleuris sur le milieu 60 ‰, et 19 % sur le milieu 80 ‰, ont produit des réversions florales, sans doute dues à un appauvrissement du milieu en sucre.

On peut donc estimer que les concentrations 80 à 160 ‰ de saccharose ont stimulé le développement "floral".

#### b. Le Glucose.

L'expérience comprenait un Témoin et 12 concentrations en sucre : 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 et 250 ‰.

#### Résultats (Planche IV).

##### 1. Brunissement.

On aurait pu penser que ce sucre rendant le milieu plus réducteur empêcherait l'oxydation des tanins des pédoncules et des boutons, et serait, de ce fait, plus efficace que le saccharose contre le brunissement. Or, le brunissement a été dans les expériences réalisées, plus important dans l'ensemble qu'avec le saccharose.

Le tableau XXI réunit les pourcentages de boutons avec le pédoncule entièrement ou partiellement brun et de boutons entièrement bruns et morts au 17ème jour.

Comparativement au saccharose, le brunissement a été plus lent et moins important pour les faibles concentrations 20 à 40 ‰, mais il n'a été annulé dans aucun traitement. Dans le milieu sans glucose (Témoin), au bout du 4ème jour, 83 % des boutons étaient bruns ou partiellement bruns et 67 % étaient morts au 7ème jour. Les boutons demeurés verts ont arrêté leur croissance entre les 3ème et 4ème jours.

Dans les concentrations 40 à 140 ‰, tous les boutons étaient encore verts au 2ème jour, tandis que pour les concentrations supérieures, il y avait déjà le même pourcentage de boutons bruns ou partiellement bruns, que dans le milieu sans glucose et à 250 ‰, tous les boutons étaient déjà morts.

# TABLEAU XXI

## BRUNISSEMENT DES BOUTONS AU 17ème JOUR DE CULTURE EN PRESENCE DE GLUCOSE

	Concentrations en glucose ‰											
	0	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200	250
Pédoncules bruns	16,6	16,6	0	0	0	0	<u>33,3</u>	0	0	0	0	0
Boutons entièrement bruns (morts)	66,6	16,6	17	17	17	67	33,3	83,3	83,3	87	100	100
Pourcentage total de boutons partiellement ou entièrement bruns	83,2	33,2	17	17	17	67	66,6	83,3	83,3	87	100	100

Le pourcentage souligné dans la concentration 120 ‰ est celui de pédoncules dont l'extrémité seulement était brune.

### 2. Croissance.

L'allongement maximum des pédoncules a été observé aux concentrations 20 et 40 ‰. Il diminuait ensuite graduellement jusqu'à la concentration 200 ‰.

L'augmentation maximum du diamètre des boutons fut légèrement décalée vers les fortes concentrations (60 à 80 ‰) par rapport à l'optimum d'allongement des pédoncules, comme pour le saccharose.

### 3. Formation du cal et rhizogénèse.

La prolifération cellulaire de l'extrémité des pédoncules a été aussi précoce qu'avec le saccharose et débutait au 3ème jour de culture dans la concentration 20 ‰, sur les deux tiers des boutons vivants. Entre 40 et 80 ‰, elle apparaissait seulement du 7ème au 9ème jour, et tous les pédoncules des boutons étaient tumorisés au 17ème jour. A 120 ‰, quelques petits cals étaient visibles à partir du 9ème jour, mais à 140 ‰, il a fallu attendre le 14ème jour. Dans les concentrations supérieures (160 à 250 ‰), le cal ne s'est pas formé.

Chez la plupart des boutons, le renflement n'était pas localisé à l'extrémité du pédoncule comme avec le saccharose, mais il y avait une augmentation progressive du diamètre du sommet à la base. A 40 ‰, deux boutons avaient ainsi un pédoncule tronconique allongé, à surface granuleuse (Planche IV, fig. 2 g). Parfois, l'augmentation de diamètre était uni-

forme d'une extrémité à l'autre (Planche IV, fig. 3g).

La rhizogénèse a été très irrégulière, il y a eu peu de racines formées, celles-ci sont apparues très tardivement du 12ème au 14ème jour, et seulement dans les concentrations 60 et 80 ‰ (50 et 40 ‰). J'ai compté au 17ème jour : 2 racines par bouton (longueur maximum 8,5 mm) à 60 ‰ et 5,5 racines par bouton (longueur maximum 15 mm) à 80 ‰ de glucose. Dans une autre expérience, il n'y a eu de formation de racines qu'à la concentration 80 ‰ (8 boutons sur 12, soit 66,6 ‰).

#### 4. Floraison.

La floraison a été moins importante qu'avec le saccharose. Sans glucose, les quelques boutons qui ont pu survivre ne se sont pas épanouis.

L'écartement des sépales a commencé comme avec le saccharose, au 7ème jour de culture, dans les concentrations 60 et 80 ‰. Tandis que cet écartement n'était observé que du 12ème au 14ème jour avec les concentrations inférieures : 20 et 40 ‰, et le déroulement de la floraison a été ainsi plus lent et décalé de 6 à 7 jours par rapport aux deux concentrations précitées.

Le maximum d'épanouissements a été observé à la concentration 60 ‰ (100 ‰ des boutons restés en survie, au 17ème jour). Aux concentrations voisines, les boutons épanouis étaient presque aussi nombreux (81 à 100 ‰ des boutons restés en survie), mais il y a eu ensuite une diminution rapide des épanouissements, à 120 ‰ il n'y avait plus que 48 ‰ des boutons en survie d'épanouis. Puis, il n'y a eu aucun épanouissement à 140 ‰ de glucose et au-delà; excepté cependant à 180 ‰, où dans une expérience il y a eu deux boutons sur quatre restés en survie qui ont écarté leurs sépales au 14ème jour seulement, et dégagé quelques pétales au 17ème jour de culture. Le développement des fleurons femelles a été rarement complet. Ainsi, beaucoup de fleurons sont restés petits et recourbés vers le centre du capitule. Ceux qui ont réussi à se dégager ont formé une corolle très courte. Le pourcentage de fleurons qui, par bouton, se sont ainsi dégagés des bractées, ont amorcé leur redressement ou se sont épanouis, était très faible : 10,6 à 20 ‰, 13 à 40 ‰, 27 à 60 ‰.

Dans les cas les plus favorables, quelques fleurons hermaphrodites se sont développés, mais en général, comme pour le saccharose, les ébauches florales ont peu évolué au centre du capitule. J'ai constaté chez certains boutons, notamment à 40 ‰, après le redressement des premiers fleurons ligulés, qu'une cicatrice s'était formée au milieu du réceptacle. Parfois, le réceptacle était devenu plus volumineux, très bombé, presque sphérique. Dans la majorité des cas, les fleurons à potentialité hermaphrodite sont morts au cours du premier mois de culture.

J'ai observé, comme pour le saccharose, quelques réversions de fleurs ligulées 2 boutons sur 12 pour la concentration 40 ‰ et 4 boutons sur 12 pour la concentration 60 ‰, au 22ème jour de culture.

Autre détail curieux, les fleurs ligulées étaient de couleur verte à la concentration 20 ‰; certaines fleurs avaient l'extrémité blanche. Entre 40 et 80 ‰, la coloration était normale (jaune), mais à partir de 100 ‰, la coloration devenait plus foncée (jaune orangé).

En r é s u m é : le glucose n'empêche pas le brunissement, bien qu'il rende le milieu plus réducteur et donne à égale quantité, une pression osmotique deux fois plus forte que le saccharose. Les concentrations optima pour la floraison sont inférieures à celles du saccharose 60 ‰ (au lieu de 100 à 120 ‰) bien que les concentrations voisines : 40 à 80 ‰ donnent également de bons résultats. La tolérance est moins grande et en dehors de ces limites, le glucose devient néfaste et perturbe notamment la rhizogénèse et la floraison. En ce qui concerne la floraison, ces perturbations sont : le verdissement des fleurs (20 ‰), la réversion et la tuméfaction du centre du réceptacle (40 ‰), l'inhibition de l'épanouissement.

### c. Le fructose (Planche IV).

Ce sucre a le même poids moléculaire que le glucose vu précédemment, c'est dire que la pression osmotique des milieux de culture était la même aux mêmes concentrations. Cependant, je n'ai pas cru bon d'expérimenter la concentration 250 ‰, qui n'a donné aucun résultat avec le glucose.

#### Résultats.

##### 1. Brunissement.

Le brunissement (Tableau XXII) était beaucoup moins important qu'avec le glucose et proche de celui obtenu avec le saccharose. Les boutons dans le milieu sans fructose ont commencé à brunir dès les premiers jours; au 9ème jour, 83 % d'entre eux étaient bruns ou partiellement bruns (péduncule). Au 12ème jour, les 100 % étaient atteints. Le brunissement débutait aussi très tôt dans la concentration 20 ‰ mais se stabilisait par la suite dès le 5ème jour. Il n'y a eu de brunissement ensuite pour les concentrations 40 à 80 ‰. Cependant, dans une autre expérience, pour une cause indéterminée, il s'est présenté de 18 à 33 % de brunissement dès le 2ème jour pour ces dernières concentrations.

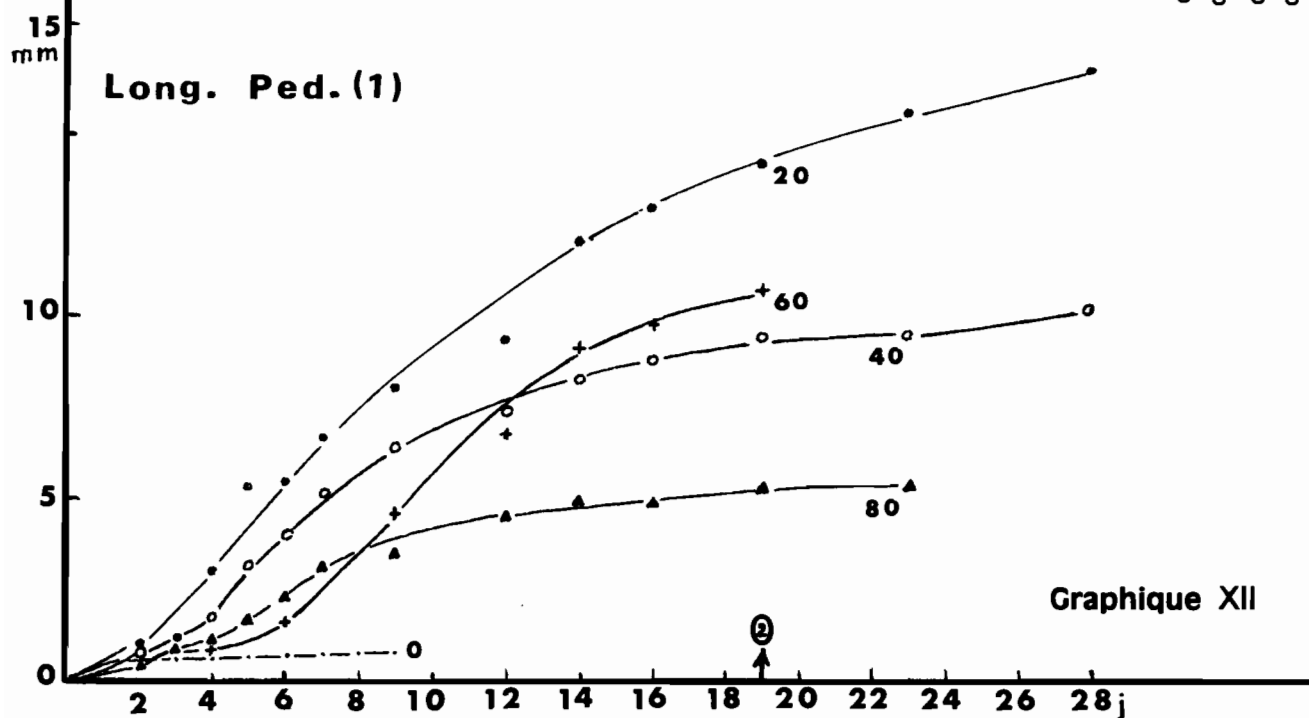
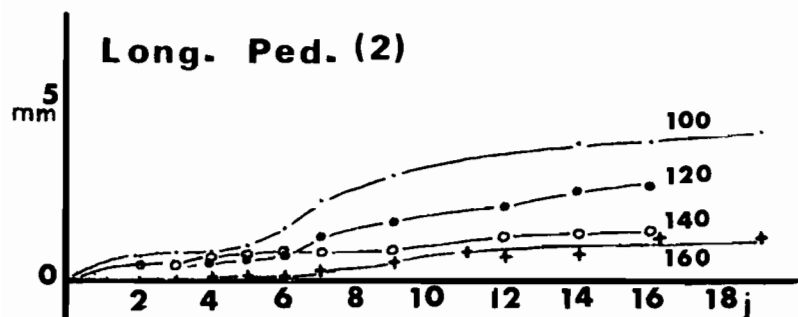
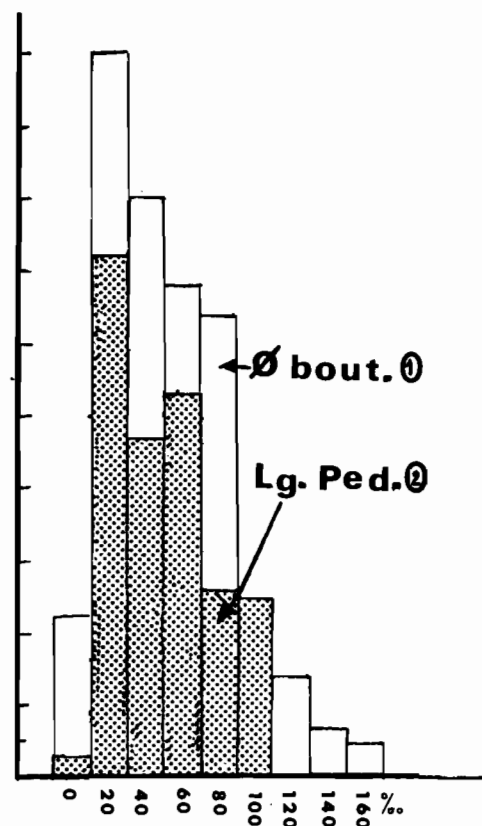
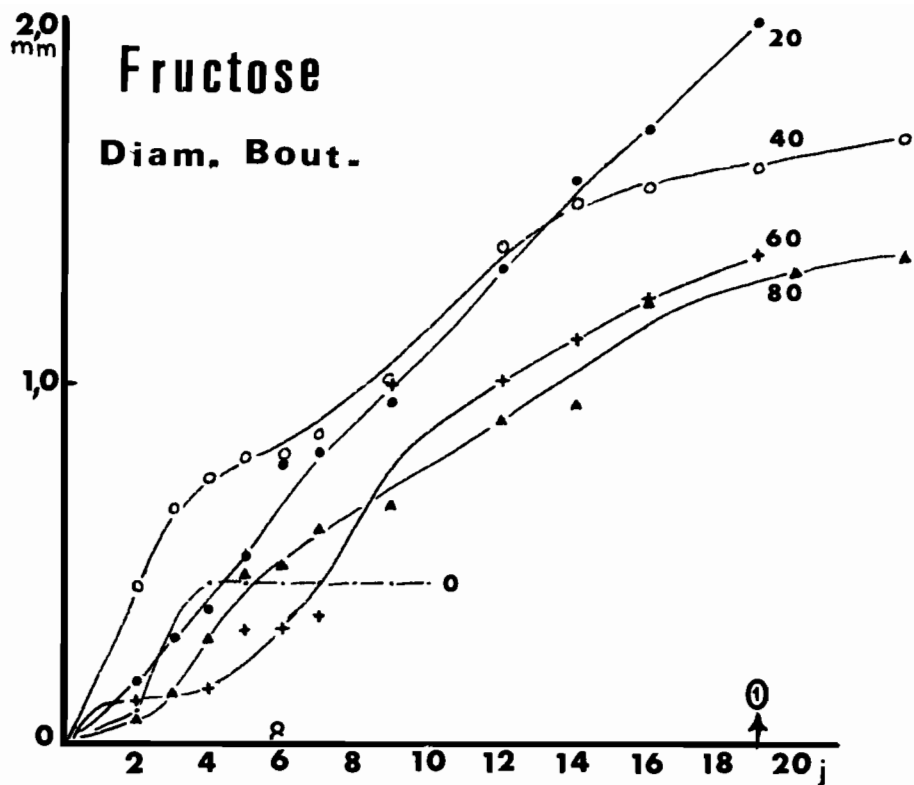
A 100 ‰ et jusqu'à 200 ‰, le taux de brunissement a été variable, mais toujours voisin de 83 à 100 ‰.

##### 2. Croissance (Graphique XII).

Avec le fructose, l'allongement des pédoncules (Graphique XII, fig. 1 et 2) est souvent supérieur à celui obtenu avec du saccharose. L'optimum se trouvait à 20 ‰ où les pédoncules doublaient ou triplaient leur longueur initiale. A 40 et 60 ‰, il y avait encore une nette stimulation de la croissance, tandis qu'à 80 et 100 ‰, l'allongement n'était que de la moitié de la longueur initiale. Le fructose a provoqué une inhibition de la croissance au-delà de 20 ‰, d'autant plus forte que la concentration était élevée (Graphique XII à droite, tailles à 20 j. en grisé).

L'augmentation du diamètre du capitule fut légèrement plus importante qu'avec le saccharose et le glucose; l'optimum s'étalait sur trois concentrations : 20, 40 et 60 ‰ (Graphique XII, à droite diamètre à 20 j. partie grisée + partie non grisée).





Graphique XII

# T A B L E A U   X X I I

## BRUNISSEMENT DES BOUTONS EN PRESENCE DE FRUCTOSE AU 17ème JOUR DE CULTURE

	0	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200
Pourcentage de pédoncules bruns	0	0	0	0	0	3,3	16,6	83	0	0	16,6
Pourcentage de bou- tons entièrement bruns (morts)	100	33	0	0	0	6,6	33	0	100	100	83
Pourcentage total de boutons par- tiellement ou entiè- rement bruns	100	33	0	0	0	9,9	49,6	83	100	100	99,6

### 3. Formation du cal et rhizogénèse (Planche IV).

Il y a eu très peu de boutons dont la prolifération cellulaire était localisée à l'extrémité du pédoncule. J'ai quelquefois observé aussi un début de digitation du cal (Planche IV, fig. 10, 11, 16 et 17) comme dans l'expérience sur les Eléments minéraux (milieu K 30). En général, l'augmentation du diamètre était étendue à toute la longueur du pédoncule dont la surface prenait un aspect granuleux. Dans les concentrations 20 à 60 ‰, le diamètre était malgré tout plus important à la base qu'au sommet, de sorte que le pédoncule avait une forme tronconique (Planche IV, fig. 3, 4, 5).

La rhizogénèse a été en général peu active. Dans les concentrations optima 60 à 100 ‰, les premières racines sont apparues au bout du 14ème jour et au 28ème jour, il n'y avait que 50 % de boutons racinés. Les racines étaient le plus souvent très courtes, soit en moyenne 3,5 à 10 mm.

### 4. Floraison (Planche IV).

Dans l'ensemble, la floraison obtenue avec le fructose était meilleure qu'avec le glucose et se rapproche de celle observée en présence du saccharose, mais elle fut plus tardive. Elle a débuté par l'écartement des bractées au 16ème jour dans les concentrations 100 ‰ et 120 ‰ au niveau desquelles se situe l'optimum d'action du fructose sur la floraison. Le tableau XXIII montre en effet au 28ème jour de culture, que de part et d'autre de ces deux concentrations, le nombre de boutons épanouis est moins important; il est nul de 0 à 40 ‰ et tombe à un tiers environ du nombre total de boutons en survie chez les autres concentrations.

# TABLEAU XXIII

## NOMBRE DE BOUTONS EPANOUIS

	0	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200
Nombre de boutons épanouis sur 12	0	0	0	4	7	6	8	2	2	2	2
Pourcentage	0	0	0	33	58,3	50	66	33	33	33	33

La floraison des boutons à la concentration 60 ‰, rappelle celle obtenue avec les concentrations 80 à 120 ‰ de saccharose, par le fait que ce sont les fleurons ligulés de l'extérieur du capitule qui se dégagent les premiers.

Au-dessus de 80 ‰, la floraison en présence de fructose avait un aspect particulier caractérisé par un ralentissement du développement des fleurons ligulés femelles au profit d'un certain nombre de fleurons hermaphrodites. Le dégagement des fleurons ligulés et leur redressement s'effectuaient après, ou simultanément avec l'apparition des fleurons du centre du capitule. Chez de nombreux boutons, la floraison ne débutait pas par l'écartement d'une ou deux bractées extérieures et le dégagement des fleurons ligulés. Les bractées s'écartaient ensemble, et comme les fleurons femelles n'avaient pas eu le temps de se développer, on pouvait apercevoir les fleurons hermaphrodites au centre du capitule. Quelques fleurons hermaphrodites se développaient et se coloraient en jaune, puis les fleurons femelles ligulés périphériques se redressaient avec ensemble.

Un autre effet particulier au fructose réside en ce qu'il provoquait une intensification de la couleur des bractées et du pédoncule qui, de vert jaunâtre au départ, devenaient vert très foncé, surtout aux concentrations 20 à 60 ‰ au 19ème jour (bractées et pédoncule).

Dans les concentrations inférieures à 80 ‰, qui permettaient un déroulement presque normal de la floraison, c'est-à-dire l'épanouissement des fleurons femelles avant celui des fleurons hermaphrodites, les pétales ligulés ressemblaient à ceux des boutons cultivés en présence de saccharose, mais ils étaient en général plus courts et plus larges (Planche IV).

Pour les concentrations supérieures à 120 ‰ de fructose, ils étaient en général déformés ou courts ou fripés.

En résumé : En présence de fructose, le brunissement fut retardé ou légèrement diminué avec des concentrations de 20 à 80 ‰. L'optimum pour la croissance du pédoncule était situé à 20 ‰, mais s'étendait de 40 à 60 ‰ pour l'accroissement du diamètre des boutons. La prolifération cellulaire n'était en général pas localisée (cal.). Elle intéressait l'ensemble du pédoncule qui prenait une forme tronconique à surface granuleuse.

De même, la rhizogénèse faible était très tardive. L'optimum de concentration pour la floraison était très différent de l'optimum nécessaire à la croissance et se situait à 80, 100 et 120 ‰. Cependant, dès 120 ‰, des déformations de pétales étaient observées.

Enfin, le fructose a provoqué un verdissement marqué des bractées et du pédoncule, peut-être dû à une augmentation de la teneur en chlorophylle.

#### d. Conclusions sur l'effet des sucres.

Les sucres réducteurs : glucose et fructose, ne peuvent empêcher le brunissement. Ils sont mal supportés par les boutons et provoquent un développement "végétatif", augmentation générale du diamètre du pédoncule (tumorisation généralisée). Sous l'influence du glucose, les pétales verdissent et le fructose intensifie la coloration verte des bractées et des pédoncules. Au-dessus de 40 ‰, ils deviennent rapidement inhibiteurs de la croissance et de la floraison. Le fructose permet une floraison équivalente à celle du saccharose, mais les fleurons sont en général plus courts.

Seul le saccharose a pu empêcher tout à fait le brunissement des boutons floraux (oxydation des composés phénoliques ?) à des concentrations supérieures à 60 ‰. Les sucres réducteurs : glucose et fructose sont moins efficaces.

Le saccharose est bien supporté par les boutons floraux et pour des concentrations allant de 60 à 160 ‰. Les concentrations faibles 20 à 60 ‰ ont stimulé le développement des parties végétatives du bouton, tandis que 180 à 200 ‰ inhibaient la croissance des pédoncules et la floraison.

Les concentrations en saccharose qui donnent les meilleurs résultats pour la floraison vont de 80 à 140 ‰. J'ai adopté la concentration 80 ‰ pour le milieu de base, car elle est située légèrement au-dessous de l'optimum pour la floraison (100 à 120 ‰).

En règle générale, les concentrations de glucose, de fructose ou de saccharose les plus favorables à la floraison des boutons en culture "in vitro" n'ont pas permis un développement complet comparable à celui des capitules restés sur la plante; la floraison n'a été que partielle et seuls les fleurons les plus périphériques qui avaient déjà atteint un certain stade de développement (formation de l'ovaire) ont pu poursuivre leur évolution et s'épanouir. Au centre du réceptacle, les fleurons hermaphrodites ont rarement atteint le stade de l'anthèse; en général, les ébauches florales sont restées au stade où elles étaient parvenues au moment du prélèvement du bouton; elles sont mortes souvent après un ou deux mois de culture et parfois le coeur du réceptacle s'est cicatrisé à leur place ou s'est tumorisé (observations dans une expérience avec le fructose).

## B. ELEMENTS MICROTROPHIQUES (SUBSTANCES DE CROISSANCE).

Parmi les éléments qui agissent à de faibles doses, j'ai choisi d'étudier ceux qui agissent en général sur la croissance et les divisions cellulaires, en les stimulant ou en les inhibant selon leur nature et leur concentration.

Ces substances ont été ajoutées au milieu de base renfermant 80 % de saccharose, seules ou en mélange. Ce sont :

- I - L'acide  $\beta$  indolyl-acétique (AIA)
- II - L'acide  $\alpha$  naphtyl-acétique (ANA)
- III - L'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4 D)
- IV - L'acide gibbérellique ou gibbérelline  $A_3$  (GA)
- V - L'acide 2, 3, 5-triiodobenzoïque (ATIB)
- VI - La kinétine ou 6-furfurylaminopurine (K)
- VII - La kinétine + l'acide  $\beta$  indolyl-acétique (K + AIA)
- VIII - L'acide gibbérellique + la kinétine (GA + K).

### I. ACIDE $\beta$ INDOLYL-ACETIQUE (AIA).

Rappelons que les auxines, notamment l'AIA, inhibent la mise à fleur des plantes de jours courts (AUDUS, 401 - BONNER et THURLOW, 402 - BONNER et BANDURSKI, 403 - HAMNER et NANDA, 408 - RAGHAVAN, 137, etc), bien que selon MARRE (413) elles participent malgré tout à la régulation de la migration des sucres dans la fleur. Elles peuvent agir sur l'expression du sexe des fleurs (concombre, GALUN et coll. 84, 85 - chanvre, HESLOP-HARRISON, 409). En culture "in vitro", nous avons vu dans l'Historique que l'AIA stimule la croissance des ovaires (NITSCH, 118, 119), mais empêche la néoformation des fleurs de Tabac (AGHION-PRAT, 62) ou d'endive (PAULET, 129).

Le dispositif expérimental comprenait : un Témoin (milieu de base) et 6 traitements : concentrations  $10^{-8}$  (0,00001 g %),  $10^{-7}$  (0,0001 g %),  $10^{-6}$  (0,001 g %),  $10^{-5}$  (0,01 g %),  $10^{-4}$  (0,1 g %) et  $10^{-3}$  (1 g %). Chaque traitement comportait 12 tubes de culture et il a été fait deux répétitions les 10 et 12 novembre.

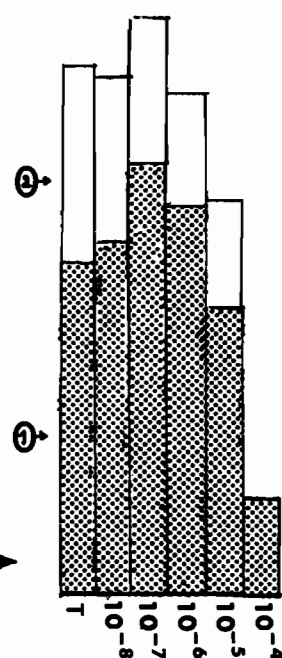
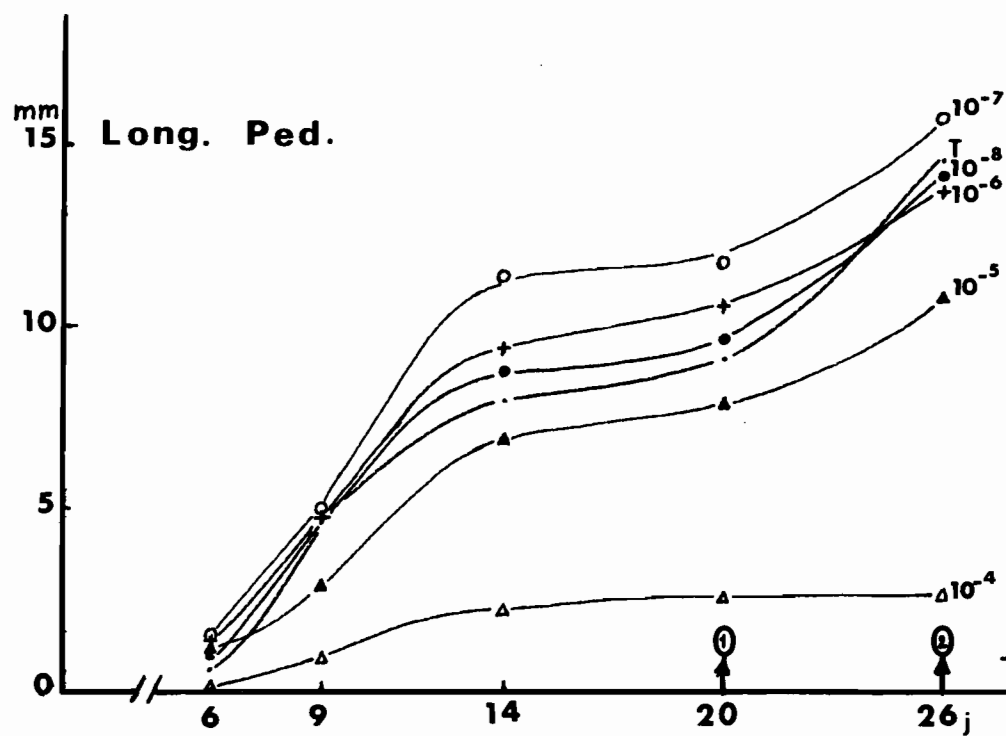
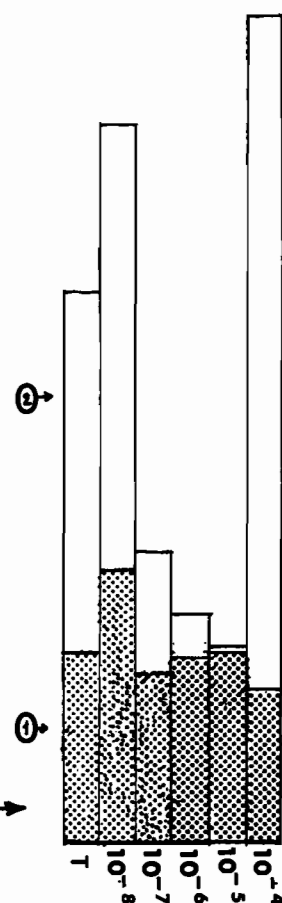
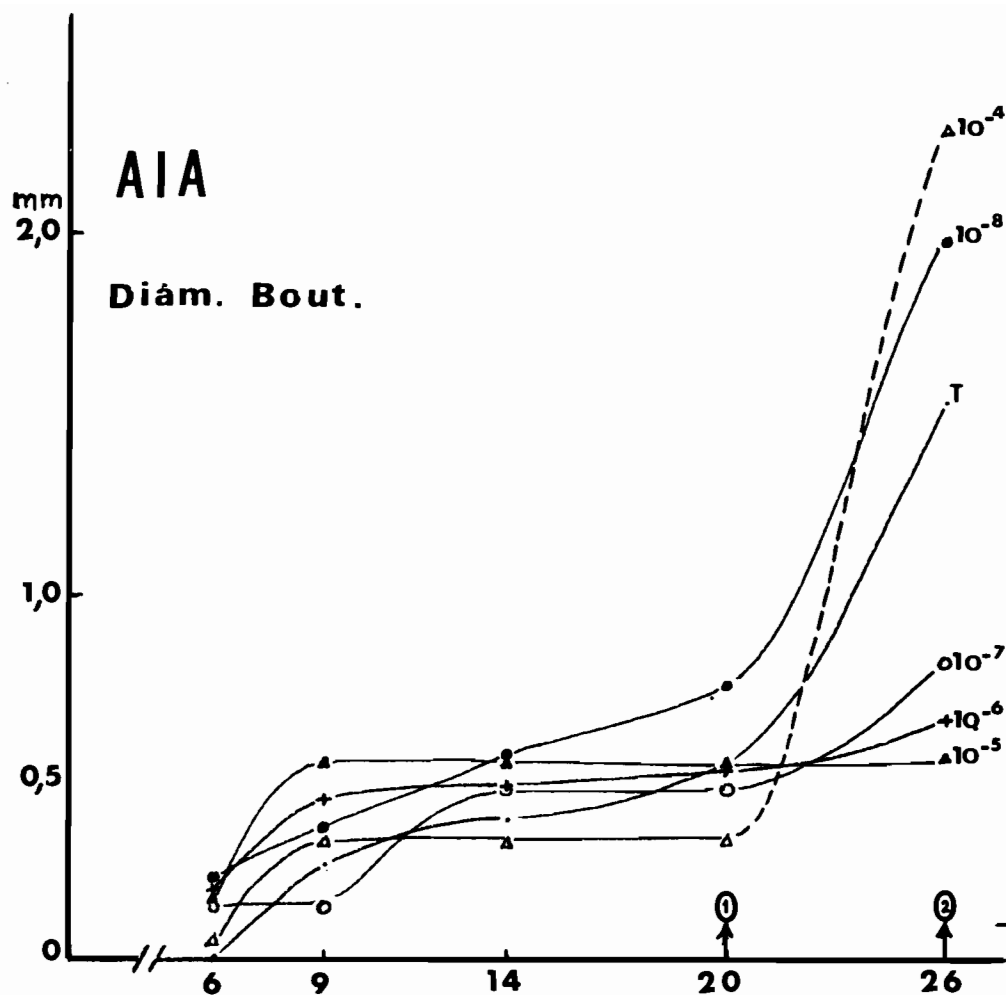
### Résultats (Planches XI et XII).

Le maximum d'homogénéité des réponses à l'auxine a été observé pour les plus fortes concentrations  $10^{-6}$  à  $10^{-4}$ .

#### 1. Croissance.

L'examen du graphique XIII de l'accroissement moyen de la longueur des pédoncules, montre une action légèrement stimulante par rapport au Témoin à la concentration  $10^{-7}$ , ce qui traduit mieux le graphique des tailles moyennes au bout de 20 j. (grisé) et de 26 j. de culture (blanc).

Graphique XIII



Les concentrations  $10^{-6}$  et  $10^{-5}$  ont provoqué une légère inhibition de la croissance encore plus accentuée pour la concentration  $10^{-4}$ . Ainsi que nous le verrons, cette inhibition de l'allongement du pédoncule est associée à une stimulation de la tumorigénèse.

L'accroissement de diamètre du bouton (Graphique XIII) a été stimulé significativement pour la concentration  $10^{-8}$  par rapport au Témoin sans auxine. Par contre, toutes les concentrations supérieures n'ont pas donné d'augmentation du diamètre différent du Témoin jusqu'au 20ème jour de culture. L'augmentation spectaculaire du diamètre des boutons entre les 20 et 26ème jours de culture pour la concentration  $10^{-4}$  (partie de la courbe correspondante en pointillés) ne correspondait pas en réalité à une activation de la floraison, mais à une tumorigénèse générale des organes floraux (bractées, pétales, ovaires, etc) provoquée par l'auxine.

## 2. Formation du cal, rhizogénèse et caulogénèse.

Le renflement de l'extrémité du pédoncule a commencé chez les boutons des concentrations  $10^{-5}$  et  $10^{-4}$  vers le 7ème jour de culture et presque tous les boutons avaient un cal très net au bout de 12 à 18 jours dans tous les traitements et le Témoin. Cependant, chez les plus fortes concentrations, il est apparu vers le 12ème jour au-dessus du cal terminal habituel, des nodosités le long des stèles principales du pédoncule; la prolifération cellulaire commençait donc à se généraliser (tumorigénèse).

Au bout de 40 jours de culture, la tumorigénèse était d'autant plus importante que la concentration en auxine était plus élevée : chez les témoins (sans auxine), la prolifération cellulaire s'est limitée à la formation d'un cal arrondi ou plus ou moins comprimé verticalement, ce qui lui donnait la forme d'un disque épais. Le cal du pédoncule dans les concentrations  $10^{-8}$  et  $10^{-7}$  était identique à celui des Témoins (Planche XI, fig. 1 et 2). Cependant, du 35 au 40ème jour, à la concentration  $10^{-7}$ , il est apparu des nodosités au-dessus de la tumeur terminale (cal) sur les stèles du pédoncule (Planche XI, fig. 2). Ces nodosités ont évolué ensuite de façon irrégulière mais n'ont pas gagné la partie du pédoncule développée hors de la gélose.

Dans le milieu  $10^{-6}$ , la prolifération cellulaire s'est déroulée de la même manière que dans le milieu  $10^{-7}$ , le cal était de même forme mais un peu plus gros. Cependant, le long des stèles, les nodosités étaient plus petites et plus nombreuses, surtout près de la surface de la gélose où elles ont formé une masse plus ou moins volumineuse (Planche XI, fig. 3).

Chez les boutons de la concentration  $10^{-5}$ , la tumorigénèse s'est généralisée du cal à la surface de la gélose et ainsi la partie du pédoncule immergée avait une forme générale tronconique (Planche XI, fig. 4); cette partie entièrement tumorigénisée était de couleur brun rougeâtre caractéristique.

Dans le milieu  $10^{-4}$ , le pédoncule des boutons, ainsi que je l'ai dit plus haut, s'est peu allongé. En revanche, il s'est entièrement et fortement tumorigénisé (même sur les quelques millimètres développés hors de la gélose) et comme le phénomène s'est déclenché en même temps d'une extrémité à l'autre, la forme générale de la tumeur était celle d'un cylindre court irrégulièrement bosselé. Comme dans la concentration  $10^{-5}$ , toute la région tumorigénisée était de couleur brun rouge.

# T A B L E A U    X X I V

## FORMATION DU CAL, RHIZOGENESE ET FLORAISON DE BOUTONS FLORAUX EN PRESENCE D'AIA AU BOUT DE 40 JOURS DE CULTURE

Concen- trations en au- xine	Formation d'un cal à l'extrémité du pédoncule			Rhizogénèse		Floraison	
	% de bout. avec un cal	Importan- ce du cal (1)	Forme (2)	% de bou- tons ra- cinés	Nombre de racines par bou- ton	% de bou- tons fleu- ris (3)	Nombre de pétales par bou- ton
0 (Témoin)	81,8	24	cal loc.	18	9,0	54,5	16,2
10 <sup>-8</sup>	82,0	32	cal loc.	16,6	10,5	81,8	10,5
10 <sup>-7</sup>	84,6	38	cal & nod.	76,9	6,2	41,5	14
10 <sup>-6</sup>	91,6	36	gén. nod.	91,6	94,6	25,0	13
10 <sup>-5</sup>	100,0	40	gén. nod.	91,6	62,6	25,0	6
10 <sup>-4</sup>	100,0	42	gén.	44,4	32,5	22,2	4

1) Evalué en nombre de croix (+) selon une échelle arbitraire qui tenait compte du diamètre du cal et de l'étendue et de l'importance de la généralisation des proliférations cellulaires le long du pédoncule.

2) cal. loc. = cal localisé, cal et nod. = cal terminal et quelques nodosités au-dessus sur le pédoncule, gén. nod. = cal et nodosités sur la partie du pédoncule dans la gélose, gén. = tumorigénèse de tout le pédoncule.

3) ont été comptés comme fleuris même les boutons qui n'ont développé qu'un seul fleuron.

Les premières racines sont apparues vers le 18ème jour chez le Témoin (sans auxine) et chez les concentrations 10<sup>-8</sup> et 10<sup>-7</sup> et seulement du 20ème au 28ème jours chez les concentrations les plus fortes 10<sup>-6</sup> à 10<sup>-4</sup>. La rhizogénèse dans ces deux groupes était différente. Les racines des boutons témoin, 10<sup>-8</sup> et 10<sup>-7</sup> étaient peu nombreuses (Tableau XXIV) grosses et longues de 30 à 40 mm au 40ème jour de culture (Planche XI, fig. 1 et 2). Tandis qu'à partir de 10<sup>-6</sup>, les racines étaient nombreuses, courtes (5 à 12 mm) et fines. Chez les boutons des concentrations 10<sup>-6</sup> et 10<sup>-5</sup>, elles formaient une couronne juste au-dessus de la tumeur de l'extrémité du pédoncule (Planche XI, fig. 3 et 4). Au contraire, à la concentration 10<sup>-4</sup>, elles ont pris naissance de façon irrégulière sur toute la partie tumorigénisée du pédoncule immergée dans la gélose (Planche XII, fig. 1).

Le nombre de racines a été augmenté de façon spectaculaire et très significative à partir de la concentration 10<sup>-6</sup> (Tableau XXIV). Tandis que le pourcentage de boutons racinés a été augmenté significativement à partir de la concentration 10<sup>-7</sup>, mais nous avons vu qu'à cette concentration, les racines (nombre et forme) étaient identiques à celles des



boutons témoins.

On peut donc considérer que l'effet de l'auxine endogène s'est exercé jusqu'à la concentration  $10^{-7}$  et celle de l'auxine du milieu (exogène) à partir de la concentration  $10^{-6}$ . Enfin, l'auxine a provoqué chez 8,3 % des boutons dans les concentrations  $10^{-6}$  et  $10^{-4}$ , la néoformation de bourgeons sur la partie du pédoncule située en dehors de la gélose (Planche XI, fig. 3, flèche). La croissance de ces bourgeons a été inhibée avec  $10^{-4}$  d'auxine, mais avec  $10^{-6}$ , ils ont donné des rameaux qui sont restés végétatifs malgré les jours courts appliqués aux cultures.

### 3. Floraison.

La floraison des témoins s'est déroulée comme à l'habitude sur le milieu de base : les bractées ont commencé à s'écarter dès le 7ème jour et surtout vers le 12ème jour de culture, au moment de la formation du cal à l'extrémité du pédoncule. L'épanouissement des fleurons a eu lieu ensuite jusqu'au 20ème jour.

Pour traduire l'effet de l'auxine sur la floraison (Tableau XXIV), j'ai dû compter comme épanouis même les boutons qui n'avaient développé ou partiellement dégagé qu'un seul fleuron. C'est la raison pour laquelle le pourcentage des boutons "fleuris" chez le témoin est plus élevé que celui donné pour le milieu de base habituel. De cette manière, on peut constater que l'effet dépressif de l'auxine s'est fait sentir dès la concentration  $10^{-7}$ . L'inhibition de la floraison a été ensuite proportionnelle à la concentration; les ébauches florales n'ont pratiquement pas évolué et ont tumorisé parfois dans la concentration  $10^{-4}$ . Cet effet est visible également sur les photographies des Planches XI, fig. 1 à 4 et XII, fig. 1 qui représentent les quatre boutons les mieux fleuris de chaque traitement; des photographies de l'ensemble de l'expérience auraient été moins spectaculaires.

En r é s u m é : L'acide indolyl-acétique a eu peu d'effet sur la croissance. Il a provoqué une tumorigénèse des pédoncules à partir de la concentration  $10^{-6}$ ; l'importance des tumeurs formées augmentait avec la teneur du milieu en auxine.

La proportion de boutons racinés a été augmentée dès  $10^{-7}$  d'auxine, mais l'influence de l'hormone sur la rhizogénèse proprement dite, n'était significative. qu'à partir de  $10^{-6}$  (racines fines, nombreuses, en couronne). On peut donc considérer que la formation des racines au-dessous de cette dernière dose est due à l'auxine endogène. En présence de  $10^{-6}$  à  $10^{-4}$  d'auxine, des bourgeons végétatifs se sont formés sur les pédoncules; les rameaux issus de ces bourgeons n'ont pu être mis à fleur en jours de 9 h.

Enfin, l'acide indolyl-acétique a exercé une action fortement inhibitrice sur la floraison à partir de la concentration  $10^{-7}$ , ce qui confirme les résultats déjà obtenus par d'autres auteurs.

## II. ACIDE 2-(NAPHTHYL)-ACETIQUE : (ANA).

Les doses utilisées étaient les suivantes : 0 (Témoin),  $10^{-8}$  (0,00001 ‰),  $10^{-7}$  (0,0001 ‰),  $10^{-6}$  (0,001 ‰),  $10^{-5}$  (0,01 ‰),  $10^{-4}$  (0,1 ‰) et  $10^{-3}$  (1 ‰).

### Résultats :

A quelques détails près, les effets de l'ANA ont été identiques à ceux de l'AIA.

#### 1. Croissance.

La croissance des pédoncules a été stimulée dans les milieux avec :  $10^{-7}$  à  $10^{-6}$  d'auxine. Au-dessus de  $10^{-6}$ , il y avait une inhibition proportionnelle à la concentration. L'accroissement de la longueur initiale dans les premiers jours a permis de distinguer deux modes de croissance. Chez les Témoins, sans auxine, au 7ème jour, la croissance était active et s'arrêtait vers le 11ème jour. Au contraire, tous les boutons cultivés en présence d'auxine ont ralenti leur croissance dès le 6ème jour pour les concentrations  $10^{-7}$  et  $10^{-6}$  et dès le 4ème jour pour les  $10^{-5}$  et  $10^{-4}$ . Tous les boutons sont morts à  $10^{-3}$ . Certains boutons ont montré sous l'effet de l'auxine un géotropisme positif; le pédoncule s'inclinait ou se courbait, entraînant le bouton vers la surface du milieu (Planche V, fig. 5 a).

Le diamètre des boutons n'a augmenté en moyenne que de 1,5 mm chez les Témoins et les concentrations  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  et  $10^{-6}$  et de 2 mm pour les concentrations  $10^{-5}$  et  $10^{-4}$ . Certains boutons de cette dernière concentration ont atteint 14 mm de diamètre par suite de la tumorigénisation des pièces florales du capitule.

#### 2. Formation du cal et rhizogénèse.

La formation d'un cal arrondi à l'extrémité du pédoncule des boutons sur le milieu sans auxine a commencé du 7ème au 9ème jour de culture. En présence d'auxine à  $10^{-7}$  et  $10^{-6}$ , le **renflement** était visible dès le 3ème jour chez 30 % des boutons et dès le 4ème jour, chez 75 et 82 % des boutons des concentrations  $10^{-5}$  et  $10^{-4}$  (Planche V, fig. 2 a et 3 a). Le renflement de l'extrémité (**cal**) était en général plus étendu le long du pédoncule chez les boutons cultivés en présence d'auxine que chez les boutons témoins et la tumorigénisation se généralisait souvent à toute la partie du pédoncule plongeant dans la gélose de la même manière qu'avec l'AIA. Dans les premiers stades de cette généralisation, il se formait comme un fin plissement transversal (par rapport au grand axe) de l'épiderme (concentration  $10^{-5}$ ) (Planche V, fig. 4 a).

Les boutons Témoins ont formé en moyenne quatre ou cinq racines, ceux des concentrations  $10^{-8}$  et  $10^{-7}$  quatre, et ceux des concentrations  $10^{-6}$ , huit à dix après 12 jours de culture. Pour  $10^{-5}$  et  $10^{-4}$ , il s'est produit des déformations du pédoncule et des tumeurs plus ou moins généralisées mais pas de racines. La production de racines a continué dans le traitement  $10^{-6}$ , après deux mois de culture il y en avait 20 à 25 par bouton. Je n'ai pas observé de néoformation de bourgeons végétatifs comme avec l'AIA.

### 3. Floraison.

Les boutons témoins sans auxine ont fleuri normalement; à partir du 7ème jour, 8 à 12 fleurons ligulés ont réussi à se dégager du capitule. La floraison était identique pour les concentrations  $10^{-8}$  et  $10^{-7}$  (7 à 8 fleurons par capitule), bien que pour cette dernière, il y a eu un retard de trois à quatre jours. Avec  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  et  $10^{-4}$ , il n'y a pas eu de floraison.

En résumé : Cette auxine inhibe donc comme l'AIA la croissance et stimule la tumorigénèse pour les concentrations égales ou supérieures à  $10^{-6}$ . Elle provoque la rhizogénèse, surtout à la concentration  $10^{-6}$  et inhibe la floraison pour les concentrations supérieures à  $10^{-7}$ .

### III. ACIDE 2-4 DICHLOROPHENOXYACETIQUE (2-4 D).

Les expériences ont porté sur des boutons avec ou sans pédoncule et les traitements comprenaient les concentrations suivantes : 0 (Témoin),  $10^{-7}$  (0,0001 %),  $2.10^{-7}$  (0,0002 %),  $5.10^{-7}$  (0,0005 %),  $10^{-6}$  (0,001 %),  $2.10^{-6}$  (0,002 %),  $5.10^{-6}$  (0,005 %) et  $10^{-5}$  (0,01 %).

#### Résultats (Planche V).

Dès la plus faible concentration utilisée, le 2-4 D a exercé une action stimulante sur la tumorigénèse et la rhizogénèse et une action dépressive sur la floraison comme l'AIA et l'ANA.

#### 1. Croissance.

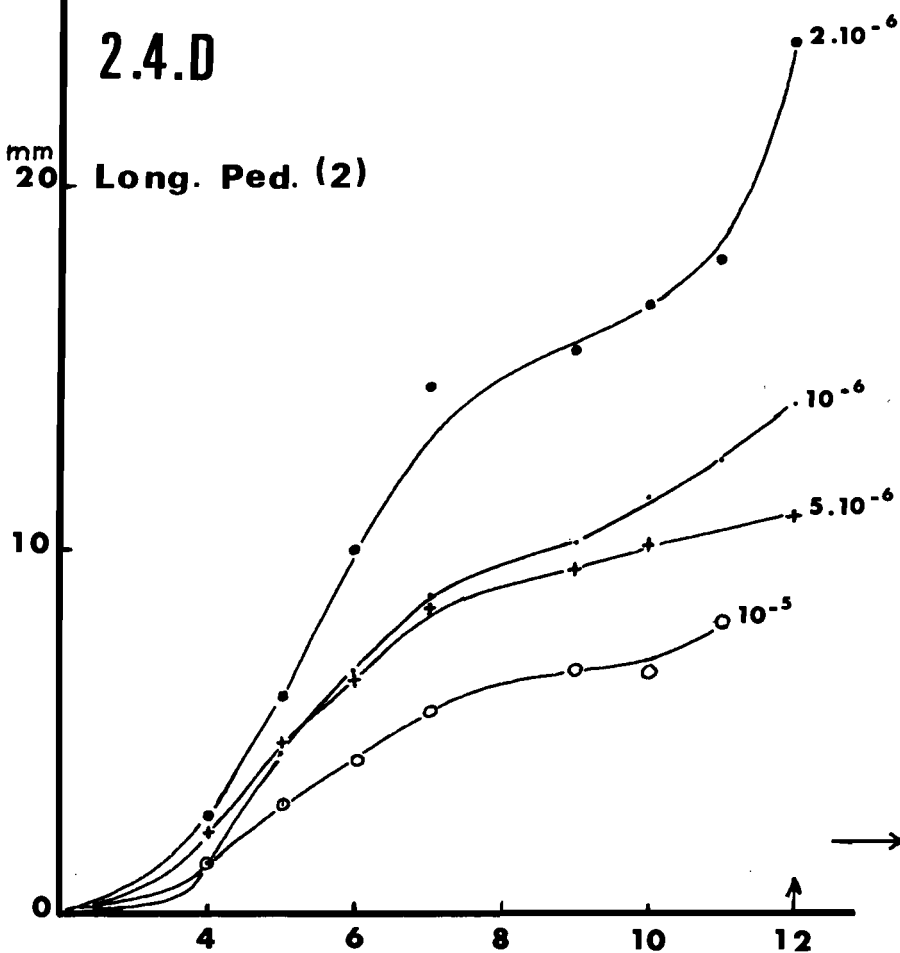
Le 2-4 D a provoqué un allongement des pédoncules supérieur à l'AIA et à l'ANA, visible dès la première semaine de culture. L'optimum était atteint à  $2.10^{-6}$  (Graphique XIV), au-dessus de cette concentration, le 2.4.D devenait de plus en plus inhibiteur. Seules, les concentrations  $10^{-6}$  et  $2.10^{-6}$  ont donné des allongements significativement différents du témoin. Les augmentations rapides de la longueur des pédoncules, survenues à partir du 10ème jour chez les deux concentrations  $10^{-6}$  et  $2.10^{-6}$  précédaient puis bénéficiaient ensuite de l'augmentation considérable du volume de la tumeur apparue à leur base (Planche V, fig. 6 à 11).

Il n'y a pas eu de différence sensible dans l'accroissement du diamètre des boutons munis de leurs pédoncules et il en était de même pour les boutons sans pédoncule pendant les premiers 15 jours. Mais, chez ces derniers, j'ai observé ensuite une augmentation subite du diamètre, proportionnelle à la concentration en 2-4 D. La floraison ici n'était pas en cause, il s'agissait d'une tuméfaction généralisée des organes floraux et en particulier des bractées comme nous l'avons observé avec les plus fortes concentrations en AIA et en ANA; des racines (Planche V, fig. 15) sont apparues sur ces bractées tuméfiées.

2.4.D

mm  
20

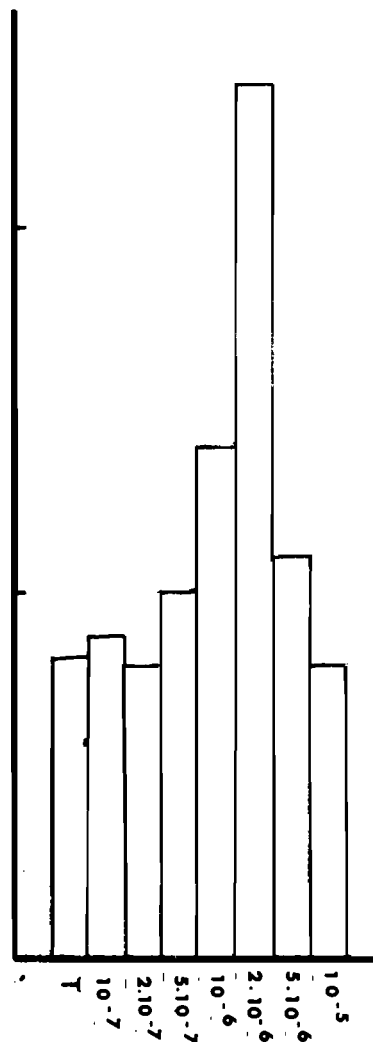
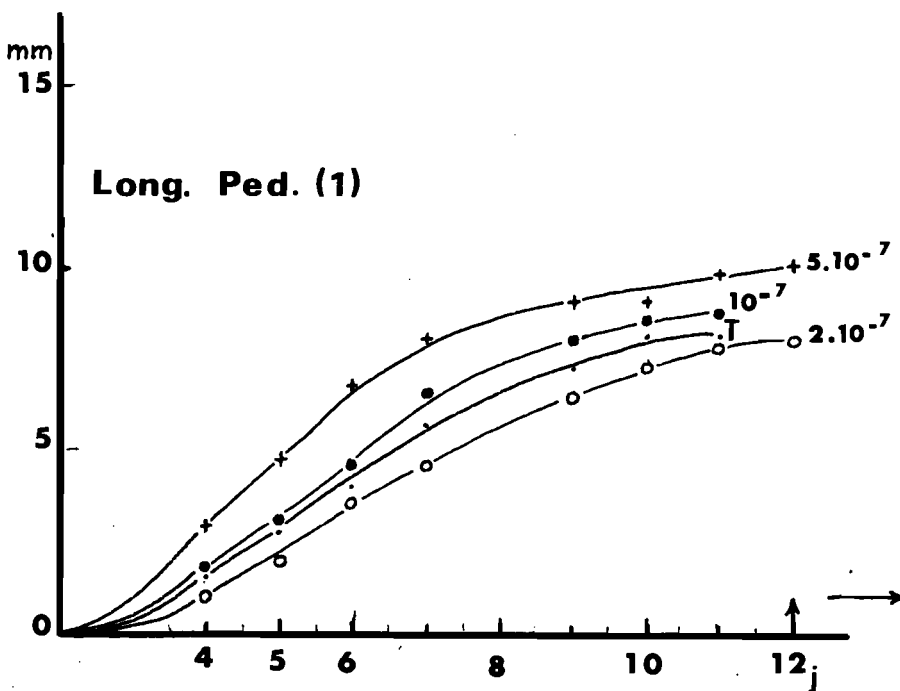
Long. Ped. (2)



Graphique XIV

mm  
15

Long. Ped. (1)



## 2. Formation du cal et rhizogénèse.

La formation du cal a commencé du 5ème au 7ème jour de culture dans les concentrations  $5.10^{-7}$  à  $5.10^{-5}$ . Au 10ème jour, au dessous de  $10^{-6}$ , le renflement de l'extrémité du pédoncule était arrondi et sa surface unie. A  $2.10^{-6}$ , dès le 8ème jour, les petites nodosités indiquant la formation d'autant de racines étaient régulièrement distribuées tout autour du renflement (Planche V, fig. 3).

A  $5.10^{-6}$  et au-dessus, le renflement était en général irrégulier aux 7ème et 8ème jours; plus gros d'un côté que de l'autre, il obligeait l'extrémité du pédoncule à se couder légèrement (Planche V, fig. 4). J'ai rencontré également cette malformation chez quelques boutons de la concentration  $2.10^{-6}$  (Planche V, fig. 6). Du 9ème au 11ème jour, la prolifération cellulaire se généralisait, de façon irrégulière, à toute la partie du pédoncule immergée dans le milieu nutritif (Planche V, fig. 7 et 8). A cet endroit, le diamètre augmentait irrégulièrement et la partie tumorisée présentait de nombreuses nodosités de couleur jaunâtre. Il n'a pas été possible de faire une distinction entre la tumorigénèse et la rhizogénèse comme avec l'AIA et l'ANA, parce que pour les plus faibles concentrations en 2,4 D utilisées, les deux phénomènes étaient presque simultanés au cours des deux premières semaines de culture. Le dénombrement des boutons à pédoncules tumorisés ou racinés a donné les résultats suivants dès le 11ème jour (Tableau XXV).

T A B L E A U   X X V

	Concentrations							
	Témoin	$10^{-7}$	$2.10^{-7}$	$5.10^{-7}$	$10^{-6}$	$2.10^{-6}$	$5.10^{-6}$	$10^{-5}$
Nbre % de boutons racinés ou tumorisés	77 %	83 %	91	94	100	100	100	100
Nbre racines par bouton	4,2	17	15	11	11	0 (tum.)	0 (tum.)	0 (tum.)

On peut prendre comme exemple, pour suivre l'évolution de la tumorigénèse, les boutons de la concentration  $2.10^{-6}$ , car chez les autres concentrations, le phénomène était identique et d'autant plus rapide et amplifié que la teneur du milieu en 2,4 D était élevée : le renflement noduleux irrégulier jaunâtre du pédoncule augmentait de diamètre progressivement tandis qu'un gros cal sphérique se formait à l'extrémité; l'ensemble cal et tuméfaction noduleuse prenait une forme générale conique irrégulière (Planche V, fig. 9). Peu à peu, la tumorigénèse gagnait les portions du pédoncule situées au-dessous du niveau de la gélose pendant les deux premiers mois de culture. Le cal bientôt "s'organisait" chez la plupart des boutons, je veux dire par là qu'il se formait des rangées verticales de nodosités, orientées radialement par rapport à l'axe du pédoncule. Ces nodosités étaient si rapprochées qu'elles semblaient accolées les unes aux autres en des formations aplaties, sortes d'ailes courtes qui rayonnaient verticalement à partir de la surface de la tumeur comme les aubes d'un petit moulin (Planche V, fig. 10). A ce stade (60 ou 72ème jour), la partie tumorisée du pédoncule

comprenait donc à l'extrémité une grosse tumeur de 8 à 10 mm de diamètre, subsphérique et ailée radialement, correspondant à la portion du pédoncule plongeant dans la gélose et au-dessus, une tumorigénération conique noduleuse qui allait en diminuant de diamètre jusqu'à une portion supérieure du pédoncule (non atteinte) située immédiatement sous le bouton. A travers les nodosités de la tumeur principale, sont apparues de fines racines vers le 98ème jour de culture (Planche V, fig. 11).

Avec  $10^{-5}$  de 2.4.D, ce dernier stade était atteint bien avant, vers le 50ème jour. Lorsque la concentration du milieu dépassait  $5.10^{-6}$ , il semblait s'établir un gradient dans la migration du 2.4.D à l'intérieur du pédoncule, notamment à la concentration  $10^{-5}$  lorsqu'une partie trop éloignée de la gélose ne tumorigénérait pas. La migration du 2.4.D du milieu à travers les régions tumorigénées s'effectuait sans doute difficilement, ce qui préservait les régions encore saines. A cet endroit, l'atmosphère du tube favorisant le phénomène, des racines fines recouvertes de nombreux poils absorbants apparaissaient vers le 65ème jour. Or, ces racines se développaient horizontalement et ce n'est qu'après avoir rencontré la paroi du tube de culture qu'elles reprenaient leur géotropisme positif (Planche V, fig. 13 et 14). Le même phénomène (racines aériennes) s'est produit chez les concentrations  $2.10^{-6}$  et  $5.10^{-6}$ , mais plus tardivement.

Dans certains cas, avec des concentrations plus fortes, et surtout lorsque le pédoncule était enfoncé profondément dans la gélose, la tumorigénération gagnait le bouton et des racines se formaient à la base des bractées. Celles-ci tentaient de rejoindre le milieu mais leur extrémité tumorigénérait à son tour dès qu'elles entraient en contact avec la surface de la gélose (Planche V, fig. 12). Je n'ai pas observé de néoformation de bourgeons végétatifs sur le pédoncule comme avec l'AIA.

Sur les boutons sans pédoncule, nous avons vu aussi que les concentrations égales ou supérieures à  $5.10^{-6}$  ont provoqué la tumorigénération des bractées extérieures, surtout de leur partie touchant la gélose et la formation de racines aériennes (Planche V, fig. 15). Enfin, la floraison a été inhibée par le 2.4. D dès la plus faible concentration utilisée.

En résumé : Le 2.4. D a une activité supérieure à l'AIA et à l'ANA. Il stimule légèrement la croissance du pédoncule à  $2.10^{-6}$ , stimule la rhizogénèse, mais surtout la prolifération cellulaire des tissus du pédoncule qui tend à se généraliser (tumorigénération). Il empêche la floraison dès la concentration  $10^{-7}$ .

#### IV. L'ACIDE GIBBERELLIQUE OU GIBBERELLINE A<sub>3</sub> (GA)

Rappelons que cette substance stimulatrice de la croissance provoque en général la mise à fleur des plantes de jours longs (BRIAN, 264, 266 - CHOUARD, 269, 270 - LANG, 281, etc.). Elle lève la dormance des drageons chez certaines variétés de chrysanthème et peut donc remplacer le traitement de vernalisation par le froid. Elle peut agir aussi chez les chrysanthèmes sur l'induction florale et le développement des fleurons, selon l'époque du traitement et la concentration (voir la littérature citée et en particulier CATHEY et STUART (268)).

Des substances analogues à la gibbérelline ont été mises en évidence par HARADA (272 à 279) chez le chrysanthème (substance E) qui participeraient, selon cet auteur, à la

biosynthèse de l'hormone hypothétique de floraison (florigène).

Le clône de la variété Souvenir de Georges PECHOU utilisé ici, qui n'a pas besoin de vernalisation et qui est indifférent au photopériodisme, ne réagit à la gibbérelline que par un allongement de ses tiges et un très faible allongement de ses pédoncules floraux.

En ce qui concerne les effets de cette hormone sur la floraison "in vitro", nous avons vu (Historique) que les avis sont partagés et que les réactions dépendent surtout du matériel végétal utilisé : si elle stimule la néoformation des fleurs sur les fragments de racines d'endives vernalisées par exemple (PAULET, 129), en revanche elles inhibent celle des fleurs sur des fragments de hampe de Tabac (AGHION-PRAT, 62) et de tige de *Plumbago indica* L. (NITSCH et NITSCH, 117).

L'expérience comportait un Témoin (sans gibbérelline) et quatre traitements correspondant aux quatre doses suivantes :  $10^{-7}$  (0,0001 ‰),  $10^{-6}$  (0,001 ‰),  $10^{-5}$  (0,01 ‰) et  $10^{-4}$  (0,1 ‰).

Résultats (Planche XII, fig. 3, 4, 5 et 6).

Les effets principaux de cette hormone ont porté sur la croissance et sur la floraison.

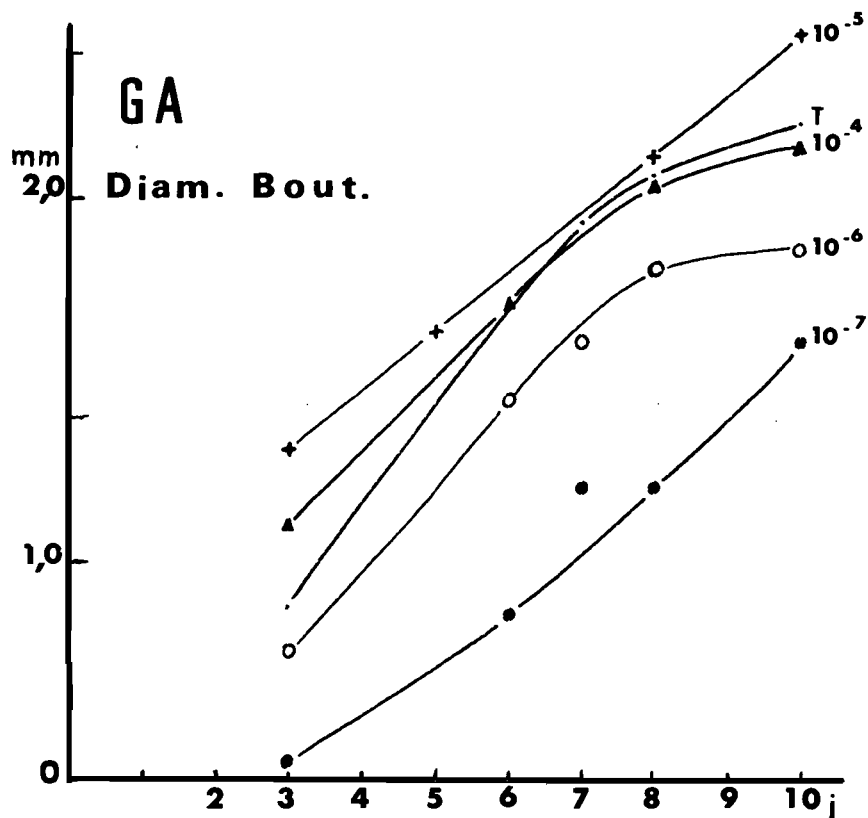
#### 1. Croissance.

L'effet le plus spectaculaire est certainement celui exercé par l'acide gibbérellique sur la croissance du pédoncule des boutons, dès le 3<sup>ème</sup> jour de culture, ainsi que le montre le graphique XV et les photographies 3 à 6 de la Planche XII. Les accroissements étaient significativement différents dès la concentration  $10^{-7}$  (Graphique XV). Si l'on considère l'augmentation de longueur obtenue avec la concentration  $10^{-7}$  par rapport au témoin, on peut penser qu'une concentration plus faible encore ( $10^{-8}$ ) aurait stimulé la croissance de façon significative.

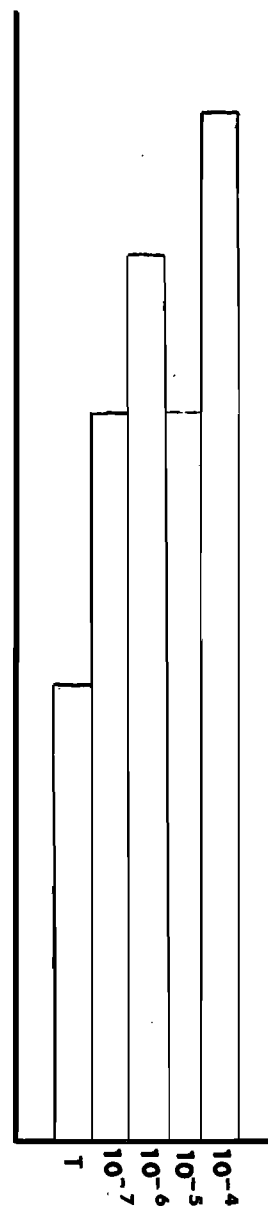
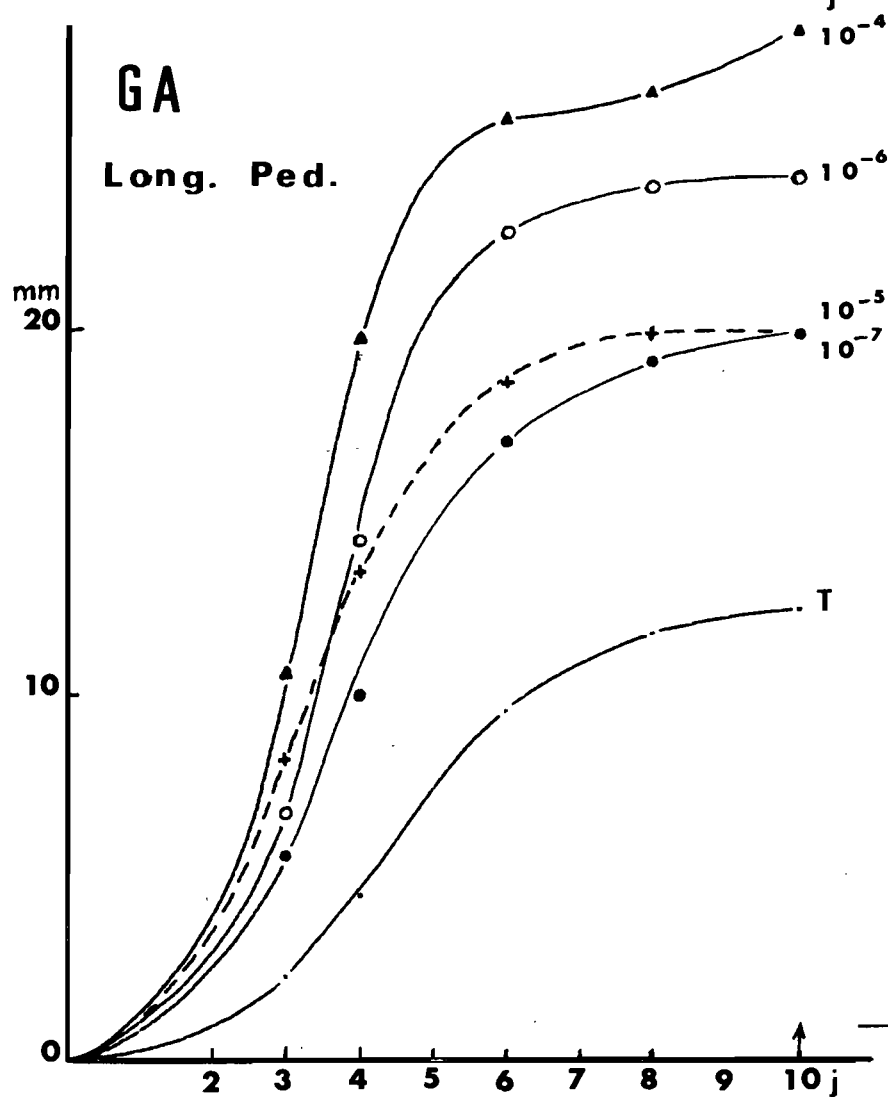
La concentration  $10^{-5}$  était aberrante dans la présente expérience, mais restait significativement différente des Témoins. Si l'on en fait abstraction, on voit que l'allongement des pédoncules a été proportionnel à la teneur du milieu en acide gibbérellique. Dans une autre expérience (Planche XII, fig. 3, 4 et 5), les boutons cultivés en présence de  $10^{-5}$  de gibbérelline ont d'ailleurs eu un allongement important 37,3 mm, soit de 373 % et pour la concentration  $10^{-4}$ , le pédoncule de certains boutons avait atteint 4 à 5 fois la longueur initiale.

J'ai constaté enfin, comme sur les plantes entières, un jaunissement du pédoncule sous l'influence de l'acide gibbérellique. C'est un caractère généralement attaché à l'action de cette hormone sur les végétaux supérieurs (136, 141, 150, 153).

L'augmentation du diamètre des boutons a été inférieure aux Témoins pour les concentrations  $10^{-7}$  et  $10^{-6}$ ; elle fut plus importante mais non significativement différente pour la concentration  $10^{-4}$  par rapport aux Témoins (Graphique XV).



Graphique XV





## 2. Formation du cal et rhizogénèse.

La formation du cal et des racines était diminuée de 45 à 60 % à la concentration  $10^{-6}$  par rapport aux témoins. A  $10^{-5}$  et  $10^{-4}$ , quelques boutons ont présenté un léger renflement blanchâtre et à peine visible à l'extrémité et très rarement des racines.

Cependant, en fin de croissance, à la concentration  $10^{-6}$ , quelques boutons étant morts sans s'épanouir, l'extrémité du pédoncule légèrement renflée et encore vivante a brusquement augmenté de diamètre; la tumorigénèse intensifiée s'est traduite par un foisonnement de cellules blanchâtres (Planche XII, fig. 6).

## 3. Floraison.

L'épanouissement des boutons n'est pas sensiblement influencé par l'acide gibbérellique. Le début de l'écartement des bractées pour les deux plus fortes concentrations a été légèrement retardé (10ème jour au lieu des 7ème et 8ème jours) par rapport aux Témoins, mais l'épanouissement des fleurons ligulés a été légèrement stimulé ensuite.

Le nombre des fleurons ligulés épanouis au 17ème jour a été identique et non significativement différent entre le traitement  $10^{-7}$  et les témoins. Avec  $10^{-6}$  et  $10^{-5}$ , il y a eu une stimulation de la floraison et de nombreux fleurons ont pu s'épanouir.

En résumé : L'acide gibbérellique stimule la croissance des pédoncules jusqu'à 300 à 400 % de la longueur initiale. Il empêche la prolifération cellulaire du cal et la rhizogénèse dès la concentration  $10^{-6}$ . Il favorise la floraison et stimule légèrement la croissance des fleurons, bien qu'il n'agit pas sensiblement sur le diamètre du bouton avant l'épanouissement.

Enfin, je n'ai pas observé de réversion florale sous l'influence de l'acide gibbérellique tout au moins chez les boutons munis de leur pédoncule, comme BRULFERT chez le mouron (71, 267), ni de modification dans l'expression des sexes comme ATAL (262) chez le Chanvre, ou SAITO et ITO (434) chez le Concombre. Sur les boutons sans pédoncule, il y a eu quelques réversions, mais je ne peux pas avancer que l'acide gibbérellique ait eu dans ce cas une action spécifique. D'autres expériences seraient nécessaires.

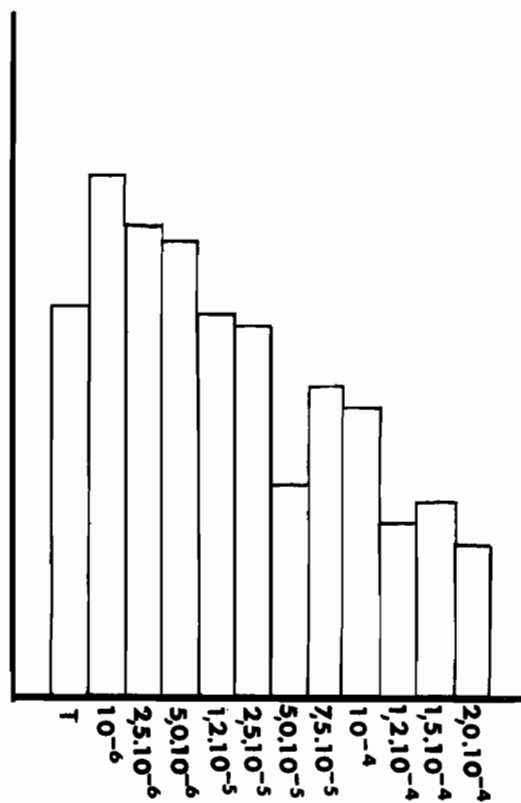
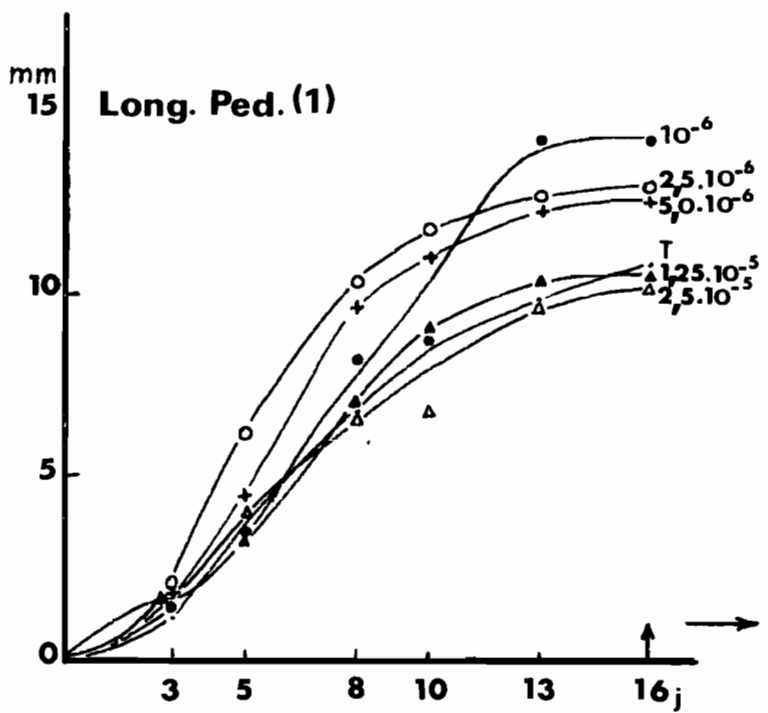
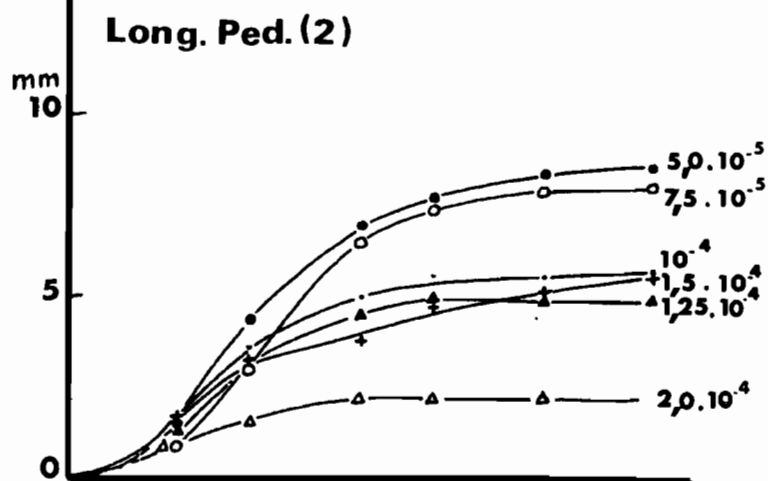
L'acide gibbérellique agit donc sur la croissance des pédoncules plus qu'aucune autre hormone. Il diminue très légèrement la tuméfaction et semble inhiber la rhizogénèse. Enfin, il stimule légèrement la floraison.

## V. ACIDE 2-3-5 TRIODOBENZOIQUE (ATIB).

Cet inhibiteur de croissance présente les propriétés d'une antiauxine. Il est intéressant par le fait qu'il peut déclencher la mise à fleur chez certaines plantes (expériences ZIMMERMAN et HITCHCOCK, 423, sur de jeunes plantes de tomate, conc. 1,25 à 5 mg par plante. En ce qui concerne la floraison "in vitro", nous avons vu que les avis sont partagés, sur des racines d'endive, elle la stimule pour MARGARA, RANCILLAC et BECK (110); elle

T I B

Graphique XVI



n'a aucune action ~~sur~~ PAULET (129).

J'ai utilisé une gamme assez étendue de concentrations, afin de couvrir toutes les possibilités de réactions des boutons de chrysanthème :  $10^{-6}$ ,  $2,5 \cdot 10^{-6}$ ,  $5 \cdot 10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $1,25 \cdot 10^{-5}$ ,  $2,5 \cdot 10^{-5}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$ ,  $7,5 \cdot 10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $1,25 \cdot 10^{-4}$  et  $2 \cdot 10^{-4}$  (soit 0,001 à 0,2 ‰). Aux concentrations les plus fortes,  $1,5 \cdot 10^{-4}$  et  $2 \cdot 10^{-4}$ , presque tous les boutons ont bruni et sont morts. Il s'agit probablement de la limite de toxicité de cette substance pour les boutons de chrysanthème.

## Résultats.

### 1. Croissance.

La croissance du pédoncule des boutons était inversement proportionnelle à la concentration, ainsi que le montre le graphique XVI, et il s'est produit chez de nombreux boutons une arcure du pédoncule indiquant une perturbation dans la distribution des auxines (Planche V, fig. 17, 18 et 19). Par contre, et bien que les différences entre les traitements ne soient pas significatives, le diamètre de nombreux boutons a augmenté de façon appréciable pour les concentrations  $1,25 \cdot 10^{-5}$  à  $1,25 \cdot 10^{-4}$ . Avec  $1,25 \cdot 10^{-4}$  en particulier qui se trouvait à la limite de la toxicité, le diamètre du capitule augmentait de 46,3 % par rapport au témoin (Planche V, fig. 22). Mais le coefficient de variation était important et la différence apportée par ce traitement peu significative.

### 2. Formation du cal et rhizogénèse.

Nous avons vu que les boutons floraux sur le milieu de base sans auxine présentent un cal à l'extrémité de leur pédoncule, précédant l'émission de racines. Avec l'ATIB, j'ai observé la disparition de cette prolifération cellulaire à partir de la concentration  $5 \cdot 10^{-5}$  et de la rhizogénèse à partir de la concentration  $2,5 \cdot 10^{-6}$ .

### 3. Floraison.

La floraison en présence d'ATIB a pris un aspect tout à fait particulier. J'ai déjà décrit la floraison des boutons "in vitro" sur le milieu de base (Témoins). En présence d'ATIB, l'écartement des bractées du capitule vers le 7ème jour était suivi comme chez les Témoins, du dégagement des fleurons ligulés entre le 10ème et le 11ème jour. Ces fleurons se redressaient vers les 14ème et 17ème jours, mais restaient d'autant plus courts que la concentration en ATIB augmentait, de sorte que l'on pouvait apercevoir les fleurons hermaphrodites du centre du capitule. Le même processus a été observé jusqu'à la concentration  $5 \cdot 10^{-5}$  (Planche V, fig. 17 à 20). Au dessous de cette dose, l'inhibition de la croissance de la corolle des fleurons ligulés mise à part, la floraison semblait donc s'être déroulée de façon identique à celle des témoins.

A la concentration  $7,5 \cdot 10^{-5}$  (Planche V, fig. 21) et au-delà, l'écartement des bractées et le dégagement des fleurons ligulés ont été retardés de deux à trois jours. La corolle ligulée des fleurons femelles ne s'est pas ensuite développée, de sorte que le capitule ne semblait formé que de fleurs hermaphrodites.

Cependant, l'ATIB a stimulé la floraison des fleurons hermaphrodites situés le plus à la périphérie du réceptacle, c'est-à-dire le plus près des fleurs ligulées. Malheureusement, cette stimulation n'a pas été régulière et proportionnelle à la concentration.

A la concentration  $1,25 \cdot 10^{-4}$ , 39 % des boutons sont morts. Mais ceux qui ont subsisté (Planche V, fig. 22) ont évolué de la même manière que ceux de la concentration  $7,5 \cdot 10^{-5}$  et de plus, ont augmenté de diamètre (46,3 % par rapport au Témoin), mais il y avait de grandes variations et cette différence était statistiquement peu significative. Ceci sans doute parce que la limite de toxicité du TIB était proche ( $1,5 \cdot 10^{-4}$ ).

En résumé : L'ATIB inhibe les phénomènes qui sont le plus liés à une influence auxinique comme la croissance du pédoncule, la formation du cal et la rhizogénèse. Il retarde légèrement, sans l'empêcher, l'éclosion des boutons. A partir d'une certaine concentration ( $7,5 \cdot 10^{-5}$ ) il inhibe l'épanouissement et le développement des fleurons femelles ligulés et provoque une augmentation du diamètre du capitule et le développement des fleurons hermaphrodites de la périphérie du réceptacle.

## VI. KINETINE OU 6-FURFURYL-AMINO-PURINE (K).

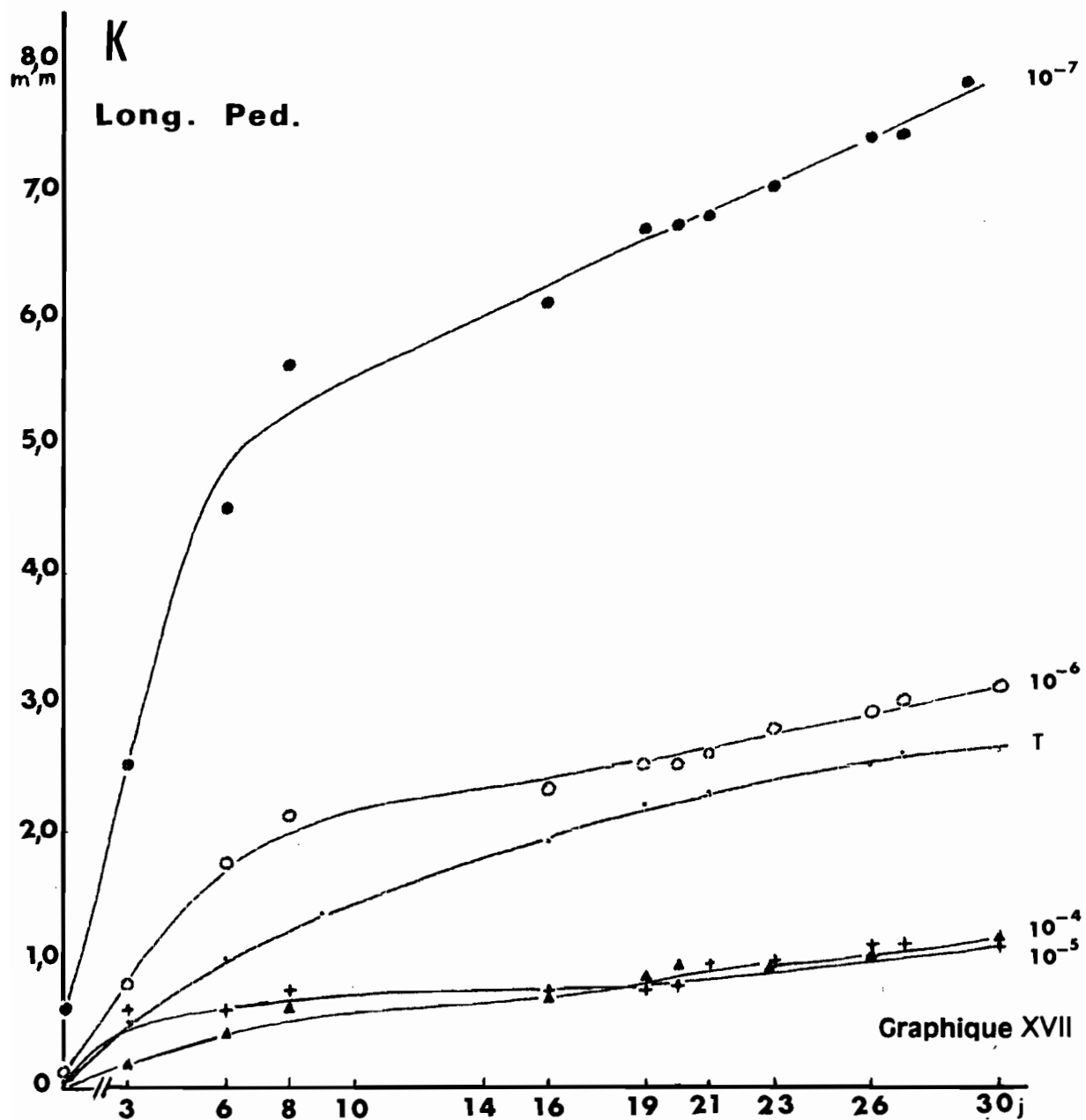
Cette substance excitoformatrice a la propriété de stimuler la division cellulaire dans le parenchyme interne (moelle) des tiges de tabac (SKOOG et Coll. 450, 451, 452). Il est possible que des Kinétines naturelles ou phytokinines interviennent aussi dans la formation du capitule. En effet, il se produit à ce moment là une intensification des divisions cellulaires et une augmentation importante du parenchyme interne qui occupe la majeure partie du volume au sein du réceptacle (fig. 2, Planche VIII). De même, la faculté de formation du cal à l'extrémité du pédoncule chez les boutons témoins, cal dont la forme n'est pas sans rappeler souvent celle du bouton situé à l'autre extrémité, indique sans doute que le capitule en voie de développement renferme ou peut biosynthétiser une quantité importante d'auxine, mais aussi peut-être de phytokinines. Dans le but de déterminer les principaux effets d'une élévation du taux de kinétine, j'ai cultivé des boutons floraux sur le milieu de base seul (Témoin) ou additionné de kinétine, selon différentes concentrations  $10^{-7}$  (0,0001 %),  $10^{-6}$  (0,001 %),  $10^{-5}$  (0,01 %) et  $10^{-4}$  (0,1 %).

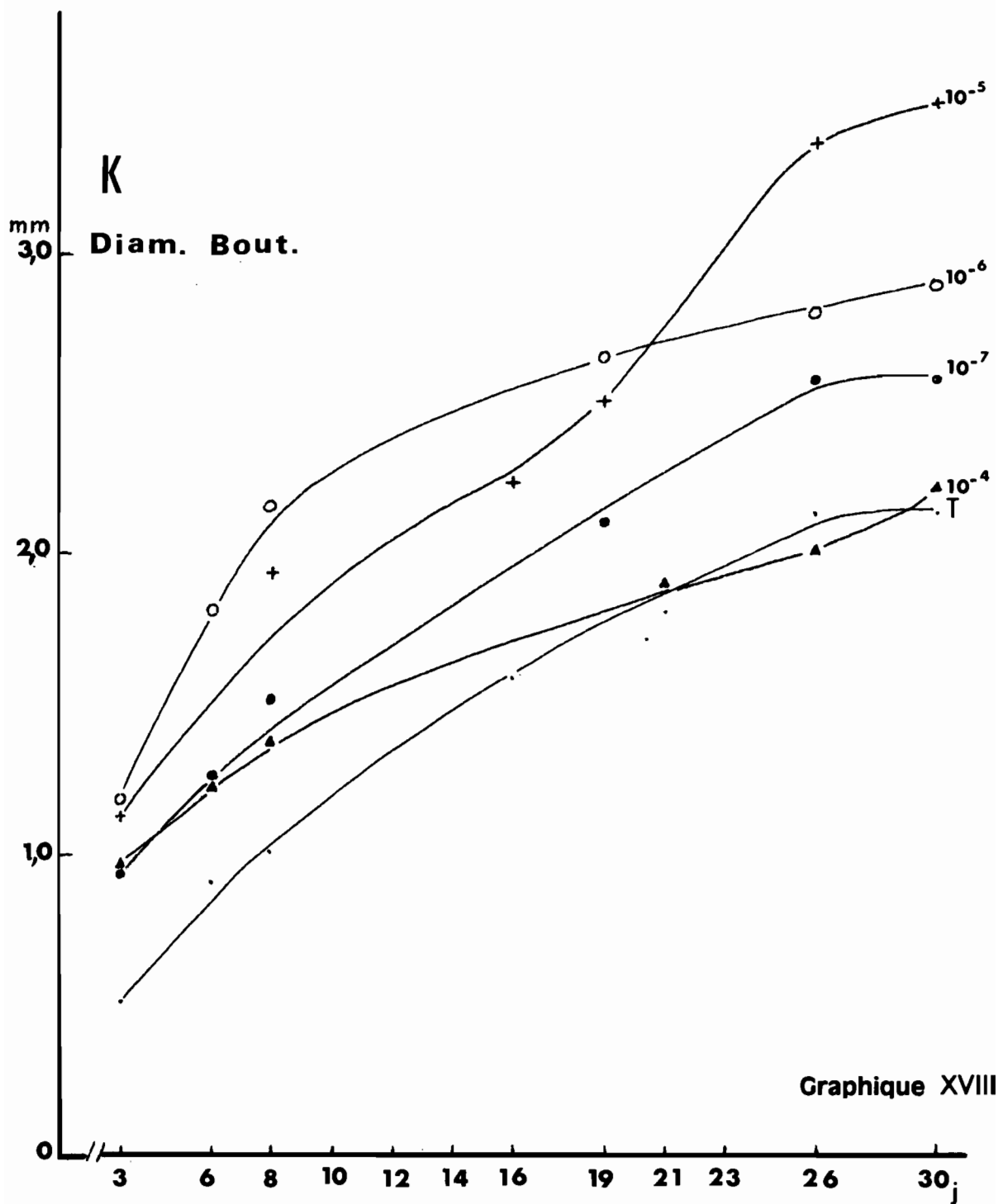
L'expérience a été effectuée à l'aide de boutons avec leur pédoncule et avec des boutons sans pédoncule.

### Résultats.

#### 1. Croissance.

La kinétine a stimulé la croissance des pédoncules aux concentrations  $10^{-7}$  et  $10^{-6}$  (Graphique XVII) de façon significative par rapport aux Témoins. Par contre, les concentrations  $10^{-5}$  et  $10^{-4}$  étaient nettement inhibitrices et provoquaient l'apparition d'une pigmentation rouge sur la partie du pédoncule immergée dans le milieu.





Le diamètre des boutons (Graphique XVIII) cultivés sur le milieu  $10^{-4}$ , n'a pas augmenté significativement par rapport aux Témoins, mais il y a eu une légère stimulation avec les trois autres concentrations.

## 2. Formation du cal et rhizogénèse.

A la concentration  $10^{-7}$ , la prolifération cellulaire de l'extrémité du pédoncule a été sensiblement égale à celle des Témoins; 83 % des boutons avaient un cal le 20ème jour. Elle n'a débuté que le 30ème jour pour la concentration  $10^{-6}$  où il n'y a eu en définitive que 30 % des boutons qui ont formé un cal. Enfin, aux concentrations  $10^{-5}$  et  $10^{-4}$ , il n'y a pas eu de cal. A la limite de l'inhibition ( $10^{-6}$ ), les cals n'étaient pas aussi réguliers que chez les Témoins et présentaient des excroissances et un très faible développement.

Chez les boutons sans pédoncule (Planche XII, fig. 2), la suppression de ce dernier n'a pas été complète et les quelques dixièmes de millimètres restants se sont allongés et ont donné des racines chez les Témoins (à gauche) et une énorme tumeur dans la concentration  $10^{-6}$  (à droite). Cette partie jeune du pédoncule a donc des propriétés histogènes particulièrement importantes.

La rhizogénèse en présence de kinétine a été inhibée dans la même proportion que la tumorigénèse, c'est-à-dire dès la concentration  $10^{-6}$ .

## 3. Floraison.

Avec les doses les plus faibles ( $10^{-7}$  et  $10^{-6}$ ), le déroulement de la floraison s'est effectué de façon identique aux témoins. Le nombre de fleurons ligulés normaux épanouis a été augmenté légèrement par la kinétine. Ainsi, au 20ème jour, il y a avait en moyenne 15 fleurons épanouis par bouton chez les témoins et 18 chez ceux de la concentration  $10^{-6}$ . Mais la kinétine a augmenté surtout la proportion de fleurons anormaux à pétales arqués, contournés et courts, à partir de la concentration  $10^{-6}$  et à  $10^{-5}$  et  $10^{-4}$ , la floraison était tout à fait anormale. A la concentration  $10^{-5}$ , certains boutons ont commencé à s'épanouir tôt, mais leurs fleurons sont restés de taille réduite et en général la plupart ont eu de grandes difficultés à se dégager des bractées; leur développement a été très lent.

A la concentration  $10^{-4}$ , 4 boutons sur 12 ont réussi à développer quelques fleurons ligulés; ces derniers présentaient une corolle courte vert jaunâtre. En général, les fleurons femelles sont restés à l'état juvénile dans le bouton, de sorte que lorsque, tardivement, les bractées réussissaient à s'écarter on pouvait apercevoir les fleurons hermaphrodites et les primordia floraux au centre du capitule. Les fleurs hermaphrodites les plus extérieures sur le réceptacle se sont alors développées et leur style dépassait largement le niveau de l'extrémité des bractées. Il semble que ce développement tardif ait été stimulé par la kinétine, mais ce qui est possible aussi, par l'absence de développement des fleurons ligulés. On sait en effet, depuis les expériences de TEPFER et ses collaborateurs (160, 161, 162) sur les fleurs d'Aquilegia et celles de ZANONI (172) sur le capitule des composées, qu'il existe au sein des fleurs des corrélations de croissance; la suppression d'un organe peut stimuler le développement d'un autre.

Cette stimulation a été encore plus nette chez les boutons qui refusaient encore de s'épanouir après 23 jours de culture "in vitro", dans ce cas, les fleurons hermaphrodites

en s'allongeant ont réussi à forcer un passage au sommet du bouton, au centre des bractées et à dégager leur style.

Enfin, sur le cal des boutons cultivés sur le milieu  $10^{-7}$  (expérience du 20 janvier 1961), il est apparu de petits bourgeons florifères après 100 et 114 jours de culture. La photographie 4 de la Planche XIV montre un bouton observé le 14 mai et qui présente une réversion florale (sortant du champ) due vraisemblablement à l'appauvrissement du milieu en sucre, et sur le cal du pédoncule deux amas de bourgeons floraux néoformés et qui rappellent ceux obtenus par CHOUARD et AGHION (75) sur des fragments de hampe florale de Tabac Wisconsin 38.

En résumé : La kinétine utilisée seule se comporte comme un stimulant peu énergique de la croissance du pédoncule et du diamètre du bouton aux faibles concentrations ( $10^{-7}$  et  $10^{-6}$ ). Elle devient inhibitrice de la croissance et de la floraison des fleurons ligulés femelles pour les concentrations  $10^{-5}$  et  $10^{-4}$ , mais l'inhibition du développement des fleurons femelles a souvent pour conséquence un développement plus important des fleurons hermaphrodites les plus extérieurs sur le réceptacle.

Enfin, la kinétine à la plus faible concentration utilisée, a provoqué chez un tiers environ des boutons, la néoformation de fleurs sur le cal du pédoncule.

## VII. KINETINE ET ACIDE $\gamma$ -INDOLYL-ACETIQUE (K - AIA).

On sait que les effets de la kinétine sont en général exaltés par la présence d'auxine (PATAU, DAS et SKOOG, 447 - PILET, 448, 449). Que se passera-t-il si nous augmentons à la fois la proportion de kinétine et d'auxine ? J'ai retenu ainsi, à titre de Témoin, la concentration en kinétine  $10^{-6}$ , concentration moyenne qui n'est pas encore trop inhibitrice de l'élongation du pédoncule et qui n'agit pas sensiblement sur le déroulement de la floraison, et j'ai ajouté pour les divers "traitements" de l'expérience, de l'auxine à des doses allant de  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  et  $10^{-5}$  (soit 0,00001 à 0,01 ‰).

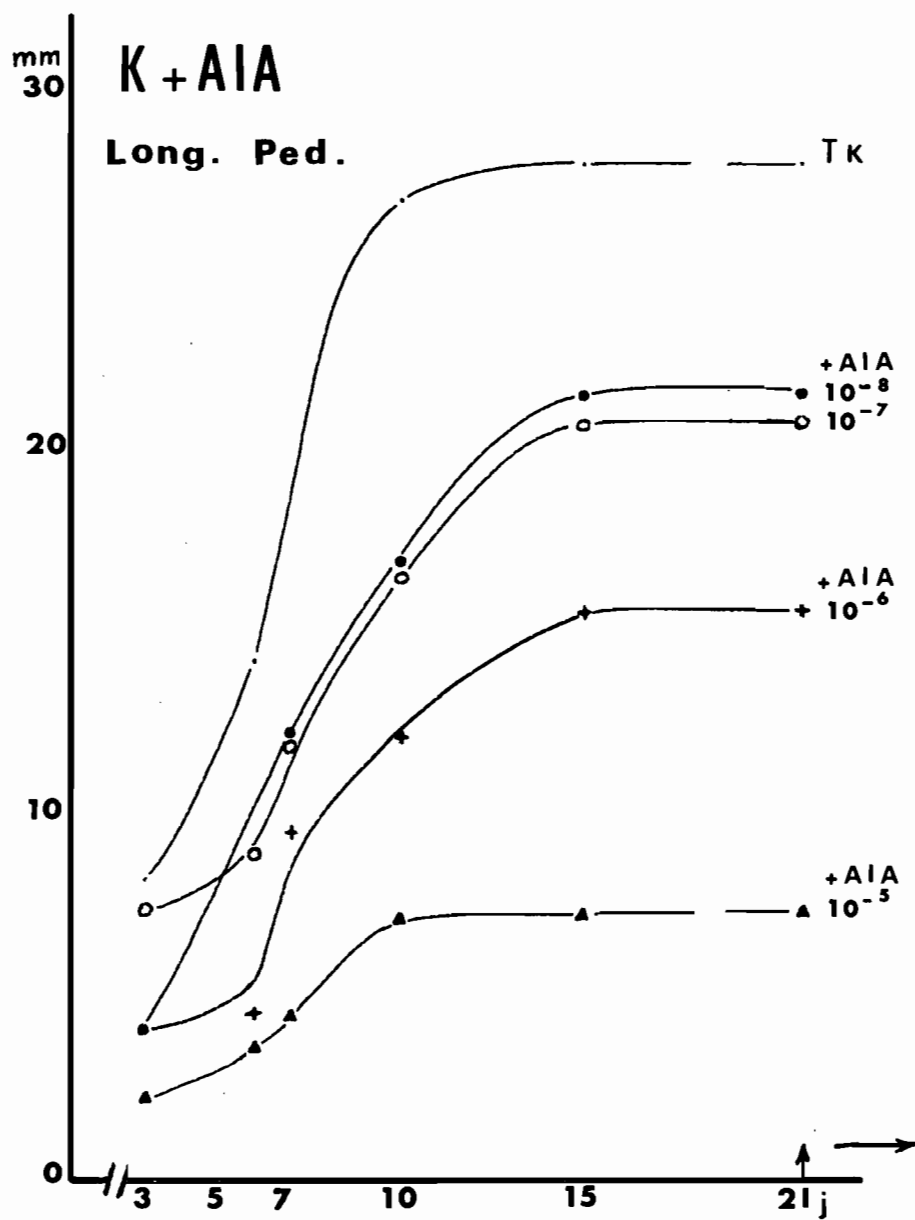
### Résultats.

#### 1. Croissance.

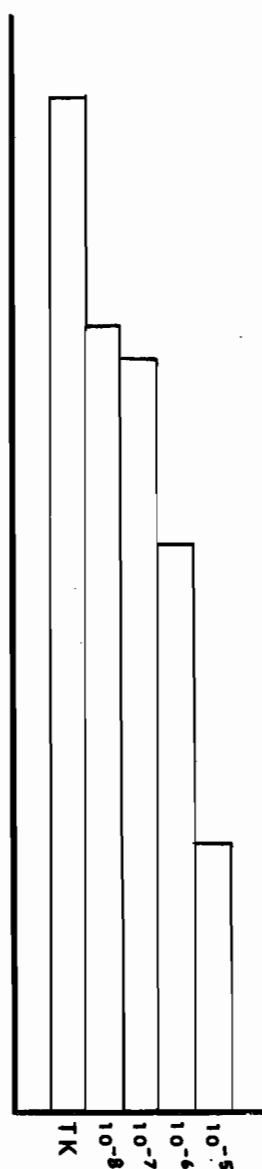
La présence d'auxine a exalté la pigmentation rouge des pédoncules qui avait été constatée avec la kinétine seule. Dans l'expérience précédente, la kinétine ne provoquait cette pigmentation que pour les fortes concentrations  $10^{-5}$  et  $10^{-4}$ . Ici, la pigmentation est apparue dès le 6ème jour pour  $10^{-6}$  de kinétine additionnée de  $10^{-8}$  à  $10^{-5}$  d'AIA.

L'effet inhibiteur de la kinétine sur l'allongement du pédoncule a été également renforcé par la présence de l'AIA (Graphique XIX) même à la plus faible concentration ( $10^{-8}$ ), les différences constatées étaient hautement significatives.





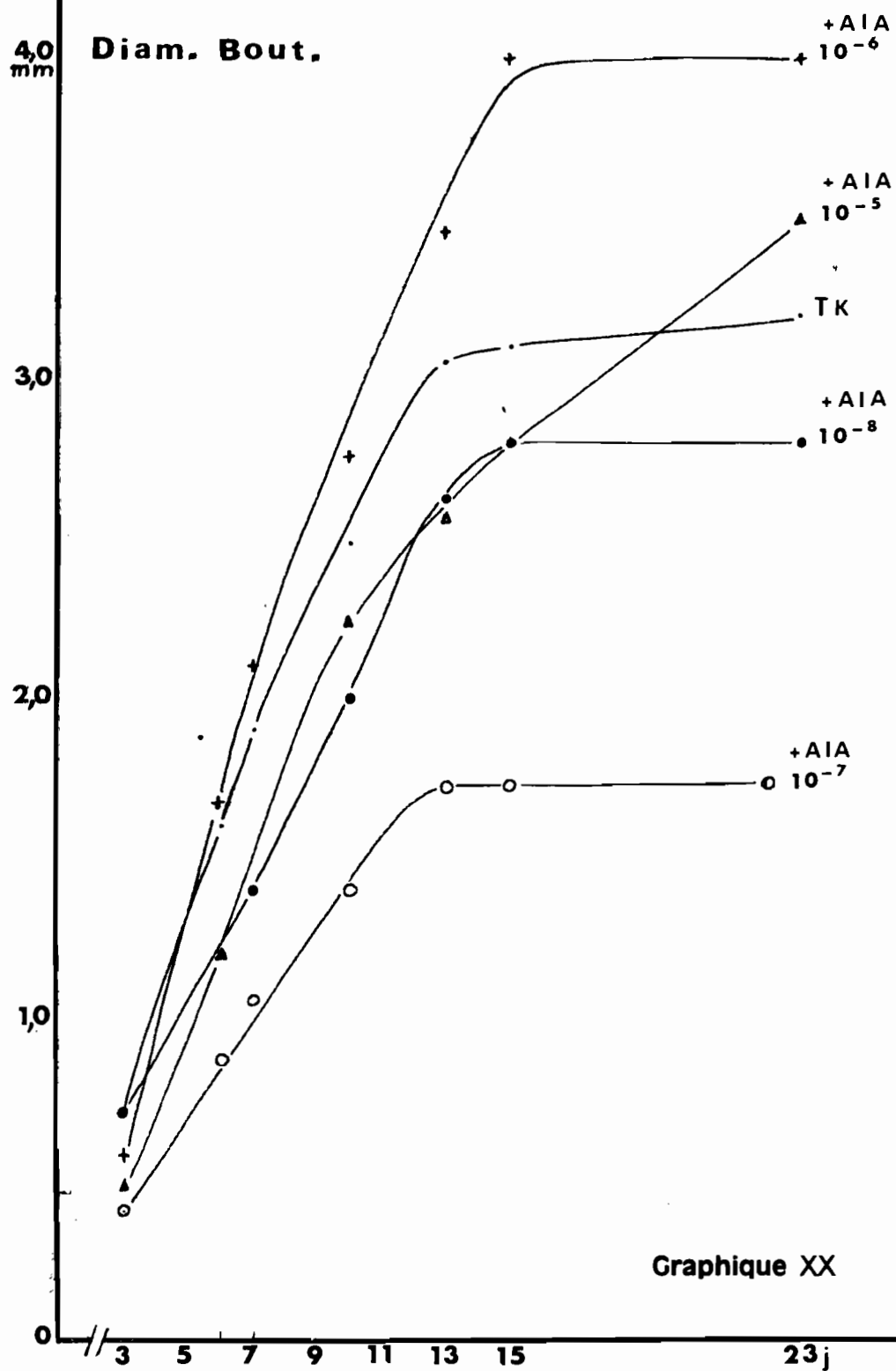
**Graphique XIX**



K + AIA

4,0  
mm

Diam. Bout.



De même (Graphique XX), il y a eu une légère inhibition de l'augmentation du diamètre du bouton par rapport au témoin pour les combinaisons ( $K 10^{-6} + AIA 10^{-8}$  et  $AIA 10^{-7}$ ). Par contre, un résultat intéressant est la stimulation de l'accroissement du diamètre des capitules avec les mélanges  $K 10^{-6} + AIA 10^{-6}$  et  $10^{-5}$ .

## 2. Formation du cal et rhizogénèse.

La prolifération cellulaire a été retardée d'une dizaine de jours pour tous les traitements par rapport aux témoins (kinétine  $10^{-6}$ ) pour les combinaisons kinétine  $10^{-6}$  et  $AIA 10^{-8}$  à  $10^{-6}$ . Mais les cals ont eu ensuite un développement deux fois plus important que chez les témoins avec kinétine seule.

La rhizogénèse n'a pas été améliorée par la présence d'AIA; au 24ème jour, il n'y avait pas de racines ni chez le témoin (kinétine seule), ni chez les mélanges kinétine + AIA.

## 3. Floraison.

La floraison a été stimulée par la présence d'AIA jusqu'à la concentration  $10^{-6}$ . Avec  $10^{-8}$  et  $10^{-7}$  d'AIA, les pétales (fleurons femelles) étaient plus longs et plus larges que ceux des boutons avec kinétine seule (Planche VI, fig. 2, 3 et 4). En présence du mélange kinétine +  $AIA 10^{-6}$ , la plupart des fleurons femelles ont eu un développement anormal (arcure de la corolle) (Planche VI, fig. 5).

Les boutons ont écarté leurs bractées en même temps que les boutons avec kinétine seule, mais les fleurons ligulés ne se sont pas développés, de sorte que tout le coeur du réceptacle ainsi dégagé était visible (\*). Ces boutons ont eu au maximum 4 fleurons femelles qui ont manifesté un léger développement, mais la croissance de la partie ligulée a été arrêtée au 13ème jour et les pétales sont ainsi restés courts et filiformes. L'augmentation du diamètre du bouton était la conséquence d'une augmentation du plateau du réceptacle et le nombre des fleurons femelles et hermaphrodites n'a pas été augmenté de façon significative par la présence d'AIA. La photographie 7, Planche XII, représente un bouton sans pédoncule du traitement kinétine  $10^{-6} + AIA 10^{-5}$  au début de l'expérience à gauche, et en fin d'expérience à droite (95 jours), on remarque l'augmentation très nette du diamètre du réceptacle et l'inhibition des fleurons femelles. Sur la photographie 8, le bouton du mélange Kinétine + AIA de la photographie précédente, vu par en dessus a été agrandi deux fois et comparativement à gauche est présenté dans la même position un bouton débarrassé de ses bractées au moment du prélèvement. On remarque l'augmentation spectaculaire du diamètre du réceptacle, quelques fleurons hermaphrodites extérieurs ont développé leur corolle, mais au centre les primordia floraux (zone un peu plus claire) sont toujours à l'état de petits mamelons arrondis bien qu'en évolution lente.

Quelques boutons cultivés en présence de kinétine et d'AIA de  $10^{-8}$  à  $10^{-6}$  ont présenté au bout de trois mois de culture des "réversions florales" que l'on peut qualifier non de réversion, mais de surfloraison (Planche XIV). En effet, un à deux fleurons épanouis ont développé à partir de leur ovaire une pousse qui, après avoir porté quelques bractées puis

(\*) Ce phénomène a déjà été observé avec des concentrations égales ou supérieures à  $7,5 \cdot 10^{-5}$  de ATIB et  $10^{-5}$  de kinétine.

quelques feuilles dentées ont reformé un nouveau capitule ( $K + AIA 10^{-7}$ ). Rappelons que ce phénomène a été déjà observé au cours des expériences sur le saccharose. Des "réversions végétatives" s'étaient formées sur des boutons laissés plusieurs mois sur le même milieu. Le fructose pour plusieurs concentrations a également donné des réversions identiques, mais dans ce cas, il s'agissait de véritables "réversions", les rameaux demeurant à l'état végétatif.

En résumé : L'addition d'AIA à un milieu renfermant de la kinétine exalte l'effet inhibiteur de cette dernière sur la croissance et sur la prolifération du cal des pédoncules. La rhizogénèse n'est pas améliorée sensiblement. La floraison est stimulée jusqu'à la concentration  $10^{-6}$  et surtout avec  $10^{-8}$  et  $10^{-7}$  d'AIA. Le développement des fleurons ligulés est inhibé pour des concentrations supérieures à  $10^{-6}$ , tandis que celui des fleurons hermaphrodites n'a pas été sensiblement amélioré. Le diamètre du réceptacle a été augmenté avec  $10^{-5}$  d'AIA. Je n'ai observé la néoformation de fleurs que sur le cal d'un seul bouton  $K + AIA 10^{-8}$ , mais il s'est produit quelques réversions des fleurons ligulés des boutons cultivés sur les milieux  $K + AIA 10^{-8}$  et  $K + AIA 10^{-7}$ .

#### VIII. ACIDE GIBBERELLIQUE ET KINETINE (GA-K).

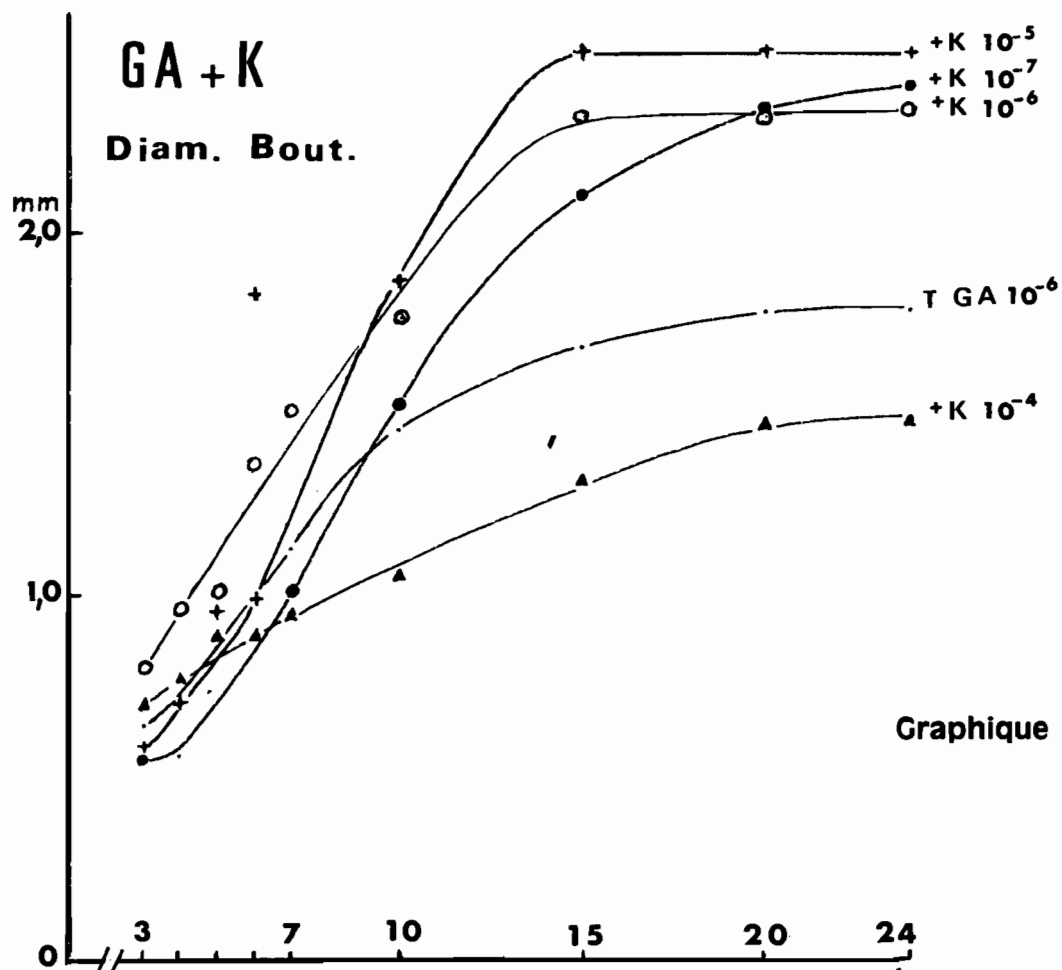
Puisqu'il y a un effet de synergisme entre la kinétine et l'AIA selon la concentration en auxine utilisée, il m'a semblé intéressant de voir aussi quel serait le comportement de boutons floraux cultivés en présence d'un mélange d'acide gibbérellique et de kinétine. VASIL (435, 436) a pu obtenir avec ces deux substances un développement des étamines excisées d'*Allium cepa* L., de manière tout à fait identique à celui des étamines restées sur la plante. J'ai pris comme témoin le milieu de base habituel additionné de gibbérelline à la concentration  $10^{-6}$  (0,001 ‰), concentration moyenne qui a donné un allongement appréciable des pédoncules dans l'expérience sur la gibbérelline seule. Quatre traitements comportaient ce milieu de base auquel j'ai ajouté quatre concentrations différentes de kinétine  $10^{-7}$  (0,0001 ‰),  $10^{-6}$  (0,001 ‰),  $10^{-5}$  (0,01 ‰) et  $10^{-4}$  (0,1 ‰).

#### Résultats.

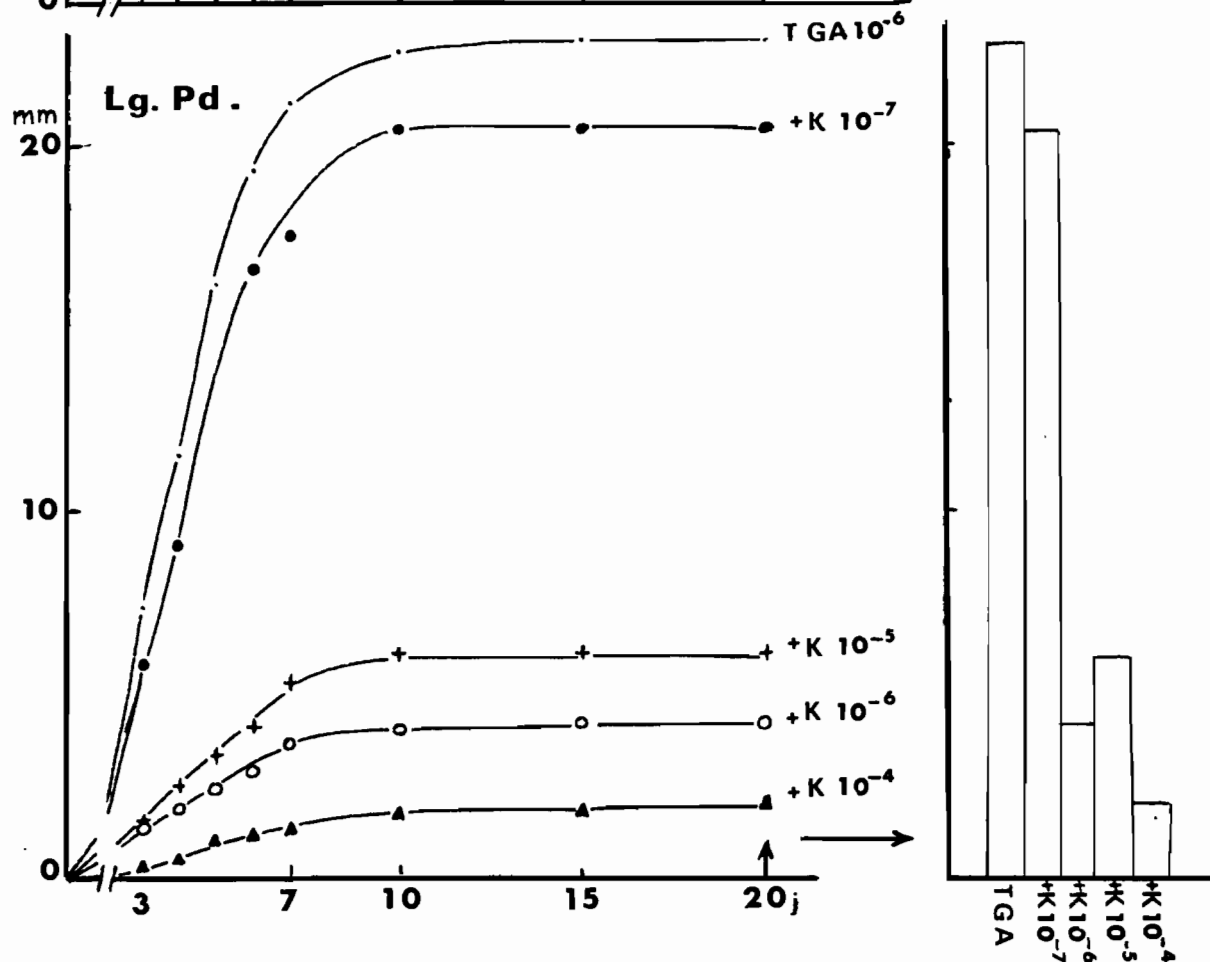
##### 1. Croissance.

La pigmentation rouge des pédoncules provoquée par la kinétine seule était visible ici à son maximum d'intensité pour la concentration la plus forte en kinétine ( $10^{-4}$ ). Avec  $10^{-6}$  et  $10^{-5}$  de kinétine, il n'y avait que de petites taches disséminées sur toute la longueur du pédoncule.

L'allongement du pédoncule (Graphique XXI) a été spectaculaire (5 fois la longueur initiale au 24ème jour) pour les témoins gibbérelline seule et la gibbérelline + kinétine  $10^{-7}$ , mais pour des concentrations plus importantes de kinétine, il y avait une inhibition hautement significative (Graphique XXI et Planche XIII, fig. 1, 2 et 3). La kinétine a stimulé légèrement l'augmentation du diamètre des boutons pour les concentrations  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  et  $10^{-5}$  (Graphique XXI), mais les résultats n'étaient pas significatifs par rapport aux Té-



Graphique XXI



moins avec gibbérelline seule ( $10^{-6}$ ).

## 2. Formation du cal et rhizogénèse.

Les pédoncules de 25 à 37 jours des boutons ont présenté de rares et faibles tuméfactions à leur extrémité lorsqu'ils étaient cultivés sur le milieu Témoin avec gibbérelline seule ( $10^{-6}$ ) mais avec les milieux gibbérelline + kinétine  $10^{-7}$  à  $10^{-6}$ , l'augmentation du diamètre de l'extrémité des pédoncules a été améliorée et rappelait parfois celle obtenue avec les mélanges kinétine + AIA (Planche XIII, fig. 1, 2 et 4). Dans les mélanges gibbérelline  $10^{-6}$  + kinétine  $10^{-5}$  ou  $10^{-4}$ , la formation du cal a été inhibée complètement, ainsi que la rhizogénèse (Planche XIII, fig. 3 et 4). La prolifération cellulaire a débuté sensiblement en même temps que la sortie des premiers fleurons ligulés au 10ème jour (31 à 66 % des boutons).

La rhizogénèse a été très tardive et faible chez les boutons cultivés en présence de gibbérelline seule ou en mélange avec la kinétine, ceci est conforme également avec ce que nous avons constaté dans les expériences précédentes sur les effets de ces deux substances.

## 3. Floraison.

La gibbérelline seule à  $10^{-6}$  a amélioré sensiblement la floraison par rapport à celle de boutons cultivés sur un milieu de base sans substance de croissance, comme dans l'expérience précédente consacrée aux effets de la gibbérelline (Planche XIII, fig. 4 T).

La combinaison acide gibbérellique  $10^{-6}$  et kinétine  $10^{-7}$  n'a rien apporté, si ce n'est une très légère stimulation de l'évolution des fleurons ligulés qui se sont épanouis un peu plus rapidement. L'écartement des bractées a commencé plus tôt pour les combinaisons GA  $10^{-6}$  + kinétine  $10^{-7}$  et  $10^{-6}$ . Dans ces traitements, le 5ème jour, il y avait déjà 33 % des boutons chez lesquels la floraison était déclenchée et le 10ème jour, 83 à 95 % avaient des bractées écartées en partie ou en totalité et leurs premiers fleurons ligulés épanouis.

C'est la combinaison GA  $10^{-6}$  + kinétine  $10^{-6}$  qui a été la meilleure, les boutons se sont épanouis dans leur presque totalité. Les fleurons ligulés développés étaient plus nombreux que dans aucune expérience décrite précédemment puisque certaines fleurs en avaient jusqu'à cinquante trois et de même, la majeure partie des fleurons hermaphrodites ont eu un bon développement qui les a conduits jusqu'à l'anthèse. Cependant, le nombre total de fleurons du capitule n'a pas été augmenté de façon significative. Il manquait donc encore dans le milieu des éléments indispensables à cette organogénèse.

Dès la concentration  $10^{-6}$  (Planche XIII, fig. 4), il y avait cependant une légère inhibition du pédoncule, ainsi que nous l'avons vu précédemment. Cette inhibition était de plus en plus accentuée au fur et à mesure que la proportion de kinétine était augmentée et pour la combinaison GA  $10^{-6}$  + kinétine  $10^{-5}$ , il y a eu également une inhibition de la floraison et en particulier de l'épanouissement des fleurons ligulés. Il existe donc vraisemblablement un antagonisme entre la gibbérelline et les kinétines dans les processus de la floraison.

La photographie 4 de la Planche XIII a été prise en fin d'expérience (2 mois après la mise en culture). On peut remarquer l'effet antagoniste de la kinétine sur l'allongement des pédoncules provoqué par la gibbérelline et l'inhibition de la floraison avec le mélange gibbérelline  $10^{-6}$  + kinétine  $10^{-4}$ . Au cours du 2ème mois de culture (40 jours), la floraison en présence de GA  $10^{-6}$  + kinétine  $10^{-5}$  était également inhibée, ce que ne montre plus la photographie prise trop tard, lorsque l'inhibition commençait à disparaître; cette floraison tardive est probablement due à un appauvrissement du milieu de culture en gibbérelline et en kinétine.

En r é s u m é : L'addition de kinétine à un milieu renfermant de l'acide gibbérellique empêche la stimulation de la croissance du pédoncule provoquée par ce dernier, rétablit la prolifération cellulaire de l'extrémité du pédoncule (cal), mais non la rhizogénèse. La floraison est grandement améliorée : tous les fleurons en état de se développer s'épanouissent. Il y a un stade en deçà duquel cependant la poursuite de l'évolution n'a pu se faire. Ce stade resterait à préciser par une étude cytohistologique. La combinaison qui favorise le plus la floraison est GA  $10^{-6}$  + K  $10^{-6}$ . Avec  $10^{-5}$  et plus de kinétine, on observe non seulement une inhibition des pédoncules, mais aussi de la floraison.

## DISCUSSION

L'étude de la physiologie de la floraison à l'aide de la culture "in vitro" de tissus et d'organes se propose d'éliminer le plus possible de facteurs incontrôlables qui affectent les plantes entières.

Nous avons vu dans l'historique que plusieurs auteurs ont déjà utilisé cette technique soit en provoquant la mise à fleur d'apex végétatifs (WHITE, 169 - 100, 103, 104 - BALDEV, 65 - TCHAILAKIAN et BUTENKO, 158 - RAGHAVAN et JACOBS, 138, etc) ou la néoformation de fleurs à partir de tissus inflorescentiels ou végétatifs à "propension florale" (SKOOG et TSUI, 156 - PEREIRA, 141 - CHOUARD et AGHION, 75 - PAULET et NITSCH, 130, 131 - NITSCH et NITSCH, 117, etc), soit en suivant le développement de fleurs isolées ou d'inflorescences (PURI, 134 - RABECHAUULT, 135, 136 - GALUN et coll., 84, 85 - TEPFER et coll. 160, 161, 162). Mais rien ne permet d'espérer que ces travaux permettront une meilleure connaissance des processus physiologiques de la floraison à cause de l'extrême hétérogénéité du matériel généralement utilisé.

En ce qui concerne les apex par exemple : seule l'étude cytologique permet de connaître leur état de développement et encore les spécialistes arrivent à s'y tromper. C'est ainsi que POPHAM et CHAN (369) ont donné une mauvaise interprétation selon LANCE-NOUGAREDE (358, 364) de la structure des apex de chrysanthème, parce que leurs plantes étaient placées en jours longs pour empêcher leur floraison et que déjà le méristème apical avait acquis à leur insu une forme et une constitution préinflorescentielles. Le stade de développement, la vigueur peuvent influencer la réponse des apex, caractères qui dépendent du génotype (plantes issues de graines), de l'état nutritionnel, des variations des facteurs éco-physiologiques subies pendant le développement de la plante, etc. Les mêmes causes de variations, auxquelles il faut ajouter l'existence d'un gradient de la propriété de néoformation des fleurs, affectent les tissus végétatifs à "potentialité florale".

Au contraire, le stade floral est lui plus nettement défini et facilement contrôlable parce que l'on possède des critères bien précis appréciables même par un simple examen morphologique, comme la différenciation des pièces florales et en particulier des organes sexuels. Bien sûr, il existe chez les fleurs des causes d'hétérogénéité similaires à celles des apex et des tissus (hétérogénéité génotypique, position de la fleur, etc), mais elles peuvent être presque complètement éliminées dans le cas d'une plante à multiplication végétative et à l'aide de traitements de mise à fleur toujours identiques amenant la production de fleurs standards prélevées toujours sur la même partie de la plante. Le chrysanthème, sur lequel nous possédons déjà de nombreuses informations quant à la physiologie de la floraison, présente toutes les qualités requises pour servir à une étude de la floraison "in vitro" à l'aide de boutons floraux. Il est bon de rappeler ici le principe de la méthode proposée : il s'agit de restituer au bouton isolé et cultivé "in vitro", tous les éléments qui lui sont habituellement fournis par la plante, afin qu'il puisse poursuivre un développement normal.



Ce projet nécessitait de s'assurer à la fois d'un matériel végétal stable, homogène, dont les qualités, les défauts et les exigences soient parfaitement connus et la mise au point d'une technique de culture "in vitro" spécialement adaptée.

#### a. Préparation du matériel végétal.

Le premier objectif était de standardiser le matériel végétal de manière à obtenir des réponses toujours identiques avec un même milieu de culture. Pour cela, plusieurs années d'expériences ont été nécessaires pour choisir une variété stable, présentant les qualités requises et pour définir le plus parfaitement possible les réactions écophysologiques de celles-ci en vue de la mise au point d'une méthode de production de boutons floraux standards. Or, nous avons vu que plus une plante présente de "barrières" physiologiques à la mise à fleur (besoin de vernalisation, de jours longs avant les jours courts, etc.), plus les fleurs obtenues risquent d'être hétérogènes quant à leur forme, à leur structure, à leur composition, à leur vitesse de développement, etc. La variété Souvenir de GEORGES PECHOU présente de nombreuses qualités à ce point de vue, sur toutes les autres variétés étudiées :

1. Elle peut être maintenue indéfiniment à l'état végétatif par un bouturage en jours longs et il a été vérifié, grâce à un examen cytohistologique, que les apex conservaient une structure végétative caractéristique selon les descriptions qui ont été données pour le *Chrysanthemum segetum* par LANCE (358, 364), et non une forme et une structure pré-florale, forme intermédiaire entre les apex végétatifs et les méristèmes floraux, comme celle observée par POPHAM et CHAN (369).

2. Elle a perdu son exigence de froid (vernalisation) grâce à une culture prolongée au tiède 18-35° C en jours longs. Mais un abaissement de température au-dessous de 7° C perturbe sa croissance. Il faut donc la cultiver toujours dans les limites de température ci-dessus.

3. Elle est indifférente au photopériodisme, fleurit en toutes photopériodes et peut former également ses capitules à l'obscurité. Les jours longs ne font que retarder de quelques mois la mise à fleur, mais ne l'inhibent pas lorsque les plantes ont atteint leur maturité de floraison (25 à 30 cm et 15 à 20 feuilles). On peut la maintenir végétative à l'aide de bouturages répétés en jours longs, de manière à ce que les tiges n'atteignent jamais cette limite et conservent toujours une croissance active.

4. L'acide gibbérellique ne fait que provoquer un allongement de la tige principale. Il n'a aucune influence sur la floraison et peu sur l'allongement des pédoncules.

5. La méthode, mise au point d'après ces données, permet d'obtenir des plantes très florifères qui peuvent être mises à fleur avec 15 à 22 jours courts (9 h) et qui donnent à l'aisselle des trois dernières feuilles, trois boutons arrondis, à pédoncule simple, susceptibles d'être prélevés et faciles à désinfecter. Il a été vérifié que la taille et l'état d'évolution de ces trois boutons n'étaient pas significativement différents.

L'état d'évolution des boutons au moment du prélèvement correspond à la différenciation de l'ovaire chez les fleurons femelles les plus extérieurs. A ce stade, il existe sur le réceptacle toutes les étapes de la formation des fleurons car ceux du centre sont encore à l'état de primordia.

Seule la variation de l'intensité et de la composition de la lumière pendant les mois d'hiver est susceptible de retarder la mise à fleur de la variété choisie. Mais on peut y remédier par un éclairage d'appoint avec des lampes à vapeur d'iode.

Le deuxième problème à résoudre était la mise au point d'une méthode de culture "in vitro" adaptée aux boutons floraux de chrysanthème, ce qui paraissait d'autant plus difficile au départ que les premiers essais de culture sur des milieux classiques pour les tissus végétaux s'étaient traduits par des échecs (contamination, brunissement et mort rapide des boutons).

#### b. La méthode de culture "in vitro".

La pratique m'a montré que le succès de la méthode dépendait non seulement de la composition du milieu nutritif, mais également de la technique de prélèvement, de désinfection et d'ensemencement. Ainsi, au fur et à mesure des recherches, le matériel a été modifié et adapté à la culture des boutons floraux. Grâce à ce matériel nouveau, la proportion des contaminations et brunissements est passée des 83/100 à 1/120 environ (soit moins de 1 %).

Mais la méthode aurait perdu de son intérêt si après avoir été ensemencés sur un milieu nutritif, les boutons étaient restés pendant longtemps sans évoluer (cas du bouton de la Planche VI, fig. 1). Il fallait que le milieu de culture de base puisse permettre non seulement la survie mais l'expression des dernières "potentialités" inscrites dans le bouton par la plante. (Allongement de pédoncule et poursuite du développement des fleurons les plus différenciés au moment du prélèvement). (Voir ci-après valeur du test).

Les boutons de chrysanthème s'accommodent mal des milieux de culture pour tissus végétatifs constitués de solutions minérales riches en azote, en calcium, parfois en chlorure (Knop, Nitsch  $N_2$ , Heller, White, etc.) et pauvres en sucre (20 à 30 % g/l de saccharose). Je ne peux affirmer que le milieu de base mis au point et adopté ici soit parfait, mais il donne des résultats conformes au but recherché (développement d'un maximum de fleurons différenciés sans addition de substances de croissance ou excitoformatrices. Deux points particuliers ont été abordés ici, ils concernent les éléments macrotrophiques du milieu de base : les éléments minéraux et les carbohydrates.

#### - Eléments minéraux.

Nous avons vu dans la littérature que, au moment de la floraison, des quantités importantes de composés azotés migraient vers les fleurs (COMBES, 313, 314 - ULRICH, 375 - MARGARA et RANCILLAC, 112). C'était une première indication de l'utilité de l'azote en général. Ce que nous savons d'après les travaux déjà nombreux sur la nutrition minérale du chrysanthème, c'est que cette plante a besoin pour fleurir de quantités importantes, non seulement d'azote minéral, mais aussi de potassium. Des analyses m'ont permis de reconnaître que la variété Souvenir de GEORGES PECHOU ne constituait pas un cas particulier.

La solution minérale F a été calculée en fonction des rapports observés entre les ions et en particulier entre les différents cations. En ce qui concerne l'azote, une amélioration pourra être apportée lorsque des recherches ultérieures permettront de définir les proportions des différentes formes sous lesquelles il doit être fourni. Dans la formule F, l'azote se trouve sous forme nitrique; une certaine proportion d'ion  $\text{NH}_4$  aurait peut-être été bénéfique. MOREL (294) en effet, a montré que cet ion stimulait l'histogénèse d'apex en culture "in vitro", mais il est vrai que cette stimulation peut être provoquée ici par le potassium qui, selon cet auteur, a des propriétés identiques. D'autre part, il est certain que la nutrition d'une plante entière et celle d'un bouton excisé sont différentes; ainsi, ce dernier a sans doute surtout besoin d'azote sous une forme organique, c'est-à-dire sous la forme de composés qui sont habituellement biosynthétisés par la plante. Des recherches ultérieures permettront, sous ce rapport, de modifier la formule F en raison des substances qui seront déterminées par l'analyse soit de la sève arrivant au bouton, soit du bouton lui-même. L'addition de potassium en grande quantité a posé des problèmes qui ont été résolus pour l'instant par l'addition d'une contrepartie d'ions  $\text{SO}_4^{--}$  pour des raisons qui ont été expliquées précédemment. Le chrysanthème est très sensible à l'ion chlore, mais il l'est peu à l'ion  $\text{SO}_4^{--}$ ; ce n'est peut-être pas l'idéal, il est possible qu'une certaine partie puisse être ajoutée sous la forme d'un sel organique lorsque des analyses m'auront permis de mieux connaître la proportion des acides organiques chez le Chrysanthème en fleurs.

Enfin, en ce qui concerne les oligo-éléments, j'ai tenu compte des indications parues dans la littérature. Le Fer, le Bore et le Cobalt sont ceux qui joueraient le plus grand rôle dans la floraison des végétaux. Les proportions choisies sont en principe nettement suffisantes pour les besoins du chrysanthème, mais il est certain ici encore que des analyses et des essais systématiques seront utiles ultérieurement pour déterminer les quantités et les formes exactes sous lesquelles ces ions sont les plus efficaces.

#### - Les sucres et autres substances.

Nous verrons plus loin, lorsque nous discuterons de l'effet des sucres, que de grandes quantités sont nécessaires à la formation et au développement des fleurs. Des analyses ont permis de déterminer la présence de nombreux osides et polyosides dans le bouton de chrysanthème et en particulier de glucose, de fructose et de saccharose. Les expériences sur les effets de ces sucres m'ont permis de déterminer que le saccharose était le mieux toléré par les boutons. Ainsi, c'est ce dernier que j'ai adopté pour le milieu de base à raison de 80 %, proportion située légèrement au-dessous de l'optimum (100 à 120 %).

Ici encore, de nouvelles recherches permettront peut-être de déterminer les effets bénéfiques d'autres glucides ou polyosides et en particulier des pentoses dont il n'a pas été tenu compte.

Enfin, il faut considérer aussi les autres substances microtrophiques du milieu; il n'a été utilisé que le pantothénate de calcium, la thiamine (vit.  $\text{B}_1$ ) et l'acide glutamique. Plusieurs auteurs ont fait appel à d'autres vitamines, acides aminés ou substances diverses (acide nicotinique, pyridoxine, méso-inositol, acide ascorbique, vitamine A, etc), mais ce choix n'était guidé que sur l'intuition et non par des résultats expérimentaux. Le milieu de base F renferme le minimum indispensable afin qu'il soit possible d'apprécier plus facilement ensuite les effets de l'adjonction d'autres substances oligo-dynamiques (vitamines, acides aminés, substances stimulatrices ou excitoformatrices, acides nucléiques, etc).

Le milieu idéal à la connaissance duquel cette contribution et des recherches ultérieures doivent me conduire sera certainement très complexe. Au fur et à mesure de l'acquisition de nouveaux résultats, la formule de base F sera donc modifiée. Pour l'instant, cette étude a permis déjà de mieux connaître les effets des sucres (glucose, fructose et saccharose et de substances hormonales stimulatrices ou inhibitrices de la croissance et de la kinétine, substance excitoformatrice).

### c. Effets des sucres.

Nous savions déjà que des sucres migrent vers les apex au moment de leur floraison (COMBES, 386 - ULRICH, 375 - PAULIN et ULRICH, 132 - STEINBERG, 396) et que des quantités très importantes sont nécessaires pour que le développement des fleurs se déroule ensuite convenablement (LONA, 392). Ainsi, la chute des fleurs chez le Lupin, selon AARTS (378) et le flétrissement des fleurs chez la Tulipe selon BELYNSKAYA (379), sont empêchés par 60 à 80 ‰ de saccharose.

Ces dernières années, plusieurs auteurs ont trouvé en outre que la néoformation des fleurs, la floraison de plantules ou le développement des fleurs "in vitro" ne pouvaient avoir lieu aussi qu'en présence de beaucoup de sucre, et en particulier de saccharose à 60 à 120 mg/l (STEINBERG, 396 - RABECHAUULT, 135, 136 - CHOUARD et AGHION, 75 - PAULET, 129 - MARGARA et RANCILLAC, 111). Par contre, la floraison d'apex végétatifs de Cuscuta (LOO, 103, 104 - ELDEV, 65), de Perilla (TCHAILAKIAN et BUTENKO, 158 - RAGHAVAN et JACOBS, 138), de plantules d'Arabidopsis Thaliana (LANGRIDGE, 95) et le développement "in vitro" de fleurs diverses (LA RUE, 101 - NITSCH, 118, 119, 120 - TEPFER et Coll., 160, 161, 162 - GALUN et coll. 84, 85) ont pu être obtenus avec des concentrations que je qualifierai de "végétatives" (20 à 50 mg/l).

En ce qui concerne les boutons de chrysanthème en culture "in vitro", les résultats de l'expérience sur la comparaison de l'efficacité de la solution F par rapport à la solution de Knop, avaient déjà permis de tirer des conclusions intéressantes sur les effets du saccharose; les traitements de cette expérience combinant chacune des solutions à 30 ou 80 ‰ de sucre. Pour les deux solutions, les faibles concentrations en saccharose ont permis un allongement plus important des pédoncules, tandis que les solutions F 30 et 80 ‰ de saccharose provoquaient un plus grand développement du cal et une floraison plus importante. Y-a-t-il un lien entre cette faculté de prolifération cellulaire et l'augmentation du diamètre du capitule et la floraison ? Toujours est-il que, même si la floraison n'était que partielle sur ces milieux, les fortes concentrations en sucre ont entraîné l'épanouissement du plus grand nombre de boutons (50 % pour le K 80 et 60 % pour le F 80). Par contre, dans le milieu F 30, il est apparu un nombre très important de "réversions florales". Dans ce cas, le milieu F riche en azote et en potassium a pu provoquer le développement des fleurs ligulées extérieures les plus différenciées, mais la quantité de sucre : 30 ‰, était ensuite probablement insuffisante pour que leur évolution ait lieu dans le sens "floral".

Ces résultats ont été confirmés par les expériences réservées plus particulièrement aux effets des sucres; je les rappelle brièvement :

- Les échecs des essais préliminaires (brunissement et mort des boutons) étaient dus surtout aux faibles concentrations en sucre utilisées. Seul le saccharose a pu empêcher totalement ce brunissement qui apparaissait pour des concentrations inférieures à 30 ‰.

- Des trois sucres étudiés, c'est le glucose qui est le plus mal supporté par les boutons, le fructose donne des résultats presque identiques au saccharose, mais les deux sucres réducteurs provoquent un verdissement des pétales et des "réversions végétatives".

Les doses optima pour le glucose et le fructose, en ce qui concerne le développement du capitule et la floraison, sont inférieures (20 à 60 ‰) à celles du saccharose (80 à 160 ‰, maximum à 100 et 120 ‰). Les réversions florales en présence de saccharose sont apparues d'autant plus vite que le milieu était plus pauvre en sucre et pour les milieux les plus concentrés, les réversions ont eu lieu à la suite d'un appauvrissement (vieillessement des milieux). On peut donc considérer que les basses concentrations en saccharose (20 à 30 ‰) sont nécessaires au développement végétatif et entraînent un retour des fleurons vers l'état végétatif, tandis que les hautes concentrations sont utiles au développement floral. En fait, avec les plus faibles concentrations, le développement de quelques fleurons ligulés (les plus différenciés au moment du prélèvement) est souvent suivi par la mort des fleurons au centre du capitule. Avec le fructose, j'ai observé même une cicatrization du centre du réceptacle à la place occupée par les primordia disparus.

Comment agissent les sucres ?

On peut penser en premier lieu que, non seulement les sucres agissent comme source de carbone et servent de substrat aux processus respiratoires qui, nous le savons, sont très actifs chez les fleurs isolées, ou comme précurseurs pour la formation des matériaux nécessaires à la différenciation des ébauches florales. Mais, ce qui retient l'attention surtout, ce sont les énormes quantités de sucre que peuvent supporter les boutons (le saccharose ne devient inhibiteur qu'à partir de 180 ‰). L'optimum pour le saccharose égale cinq et six fois les quantités utilisées pour les cultures de tissus végétaux. Il est peu probable qu'une telle quantité de sucre soit utilisée comme précurseur de métabolites, ou comme substrat pour la respiration. Il est possible que les sucres agissent surtout sur les propriétés physico-chimiques du milieu, soit en modifiant la pression osmotique ou, si on les considère comme des substances inertes, en diminuant proportionnellement la teneur en eau.

- Modification de la pression osmotique : une première indication concernant l'effet des sucres comme agents hypertonisants peut être reconnue dans le fait que les concentrations optima pour la floraison des boutons de chrysanthème sont moitié plus faibles pour le glucose et le fructose (P.M. 180, 16) que pour le saccharose (P.M. 342, 3). Or, la pression osmotique étant inversement proportionnelle au poids moléculaire de la substance dissoute, nous voyons qu'il faut en effet une quantité moitié moins importante de glucose ou de fructose que de saccharose pour obtenir une même pression osmotique.

En tenant compte de ce que les milieux sont constitués selon la méthode gravimétrique, le calcul de la pression osmotique des milieux des expériences sur les effets des sucres (un kilogramme de chaque milieu a été volumétré) révèle que les pressions osmotiques qui favorisent la floraison "in vitro" sont trois à six fois supérieures à celles qui provoquent le meilleur développement des tissus végétatifs. Ainsi, dans le milieu avec 20 ‰ de saccharose, la pression osmotique serait de 2,59 atm. et nous avons avec 80 ‰ = 6,48 atm., 120 ‰ = 9,08, 160 ‰ = 11,66 atm. et pour les concentrations inhibitrices de la croissance, de la rhizogénèse et de la floraison, 180 ‰ = 12,97 atm. et 200 ‰ = 13,20 atm.

- Pourcentage de sucre et teneur en eau : il y a un autre aspect qu'il est bon de signaler, mais cela ne s'applique qu'aux milieux avec le saccharose et à condition de le

considérer comme une substance inerte par la seule propriété qu'il a alors "d'occuper la place de l'eau". Les auteurs (CHOUARD et AGHION, 75 - PAULET, 129 - MARGARA et RANCILLAC, 112 - STEINBERG, 398) qui ont reconnu comme moi l'effet bénéfique de fortes concentrations en saccharose n'ont pas envisagé cet aspect possible de l'action du sucre. WIGGANS et GARDNER (399) ont utilisé ainsi des solutions plus ou moins concentrées de sucre pour étudier la germination en fonction de la teneur en eau du milieu.

Nous pouvons facilement déterminer que la teneur en eau des milieux, utilisés pour étudier l'effet du saccharose, diminue rapidement au fur et à mesure de l'augmentation de la proportion du sucre (TABLEAU XXVI).

T A B L E A U   X X V I

TENEUR EN EAU EN FONCTION DE LA TENEUR DES MILIEUX EN SACCHAROSE

	Concentrations en saccharose										
	0	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200
Eau %	98,9	96,9	94,9	92,9	90,9	88,9	86,9	84,9	82,9	80,9	78,9

Or, n'est-il pas étonnant de trouver dans les boutons floraux 84 à 85 % d'eau, ce qui équivaut à un milieu avec 120 à 140 ‰ de saccharose, concentrations qui donnent le maximum de floraison en l'absence d'hormones ?

Au cours de la vie du chrysanthème, il y a une diminution de la teneur en eau au moment de la floraison. MAYER et PLANTEFOL (394), puis PLANTEFOL (395) ont trouvé qu'il existait une relation entre les phases du développement des mousses et la teneur en eau. Plus récemment, M. et R. BOUILLENNE (380 à 384) et leurs élèves, BRONCHARD (385) et JAVAUUX (390) ont trouvé des relations similaires chez les plantes supérieures et notamment chez le Navet, la Bryone, la Mercuriale pérenne, le Geophila renaris. Au moment de la floraison chez ces plantes, il y a un appauvrissement en eau des parties végétatives et notamment des tubercules.

Chez le Geophila renaris, un dessèchement du sol peut amener la floraison de 100 % des plantes. Aussi, lors d'une récente mise au point, BOUILLENNE (380), a émis l'hypothèse de l'existence d'une hydrophase chez les végétaux, l'abaissement de la teneur en eau serait lié aux rapports protéines-enzymes et à des modifications de métabolites divers, à une forte consommation de glucides, et à une intensification des oxydations cellulaires. Signalons en effet que les auteurs précités ont déterminé qu'au cours de l'appauvrissement en eau, il y avait une augmentation de la respiration et des oxydations cellulaires qui arrivaient à doubler ou tripler; l'eau agirait aussi comme facteur de dilution des métabolites et comme métabolite participant aux oxydations. On ne manquera pas de trouver ces faits évidents puisque les trois facteurs : ‰ saccharose, % d'eau et pression osmotique sont liés; plus il y a de saccharose et moins il y a d'eau, et plus la pression osmotique est forte. Mais cela n'est vrai peut-être que pour les milieux nutritifs plus simples que les sucs cellulaires, où les sucres n'interviennent pas seuls pour maintenir la pression osmotique.

Cependant, on connaît plusieurs exemples d'une relation physiologique entre le métabolisme des sucres et la teneur en eau. Ainsi, EATON et ERGLE (389) ont nettement établi que la déshydratation qui se produit au moment de la floraison chez le Cotonnier correspond à une augmentation notable des carbohydrates. On voit donc que dans ce cas, il n'y a pas une relation de proportion, mais que la perte d'eau stimule la biosynthèse des sucres, ce qui a sans doute pour effet l'établissement d'un certain rapport favorable au déroulement des processus de la floraison (\*).

En est-il de même chez le cotonnier et chez le chrysanthème ? On l'ignore. Pour évaluer le rôle exact de l'eau à l'échelle du bouton, il faudrait remplacer une certaine proportion de sucre par une substance inerte n'ayant pas d'action sur la pression osmotique et de même, le rôle du sucre comme hypertonisant pourrait être étudié à l'aide de la méthode bien connue de la substitution par un sucre inutilisable par les végétaux comme le Mannitol.

Enfin, on peut émettre l'hypothèse que les sucres à fortes doses stimulent la floraison parce qu'ils inhibent la croissance "végétative"; l'utilisation de Mannitol permettrait sans doute de le démontrer.

#### d. Effets des stimulateurs de la croissance.

Les auxines : AIA, ANA, 2,4 D ont eu surtout un effet stimulant sur la prolifération cellulaire du cal à l'extrémité du pédoncule et la rhizogénèse du pédoncule et même des bractées. Leur action sur l'allongement du pédoncule a été faible si on la compare à celle de la gibbérelline. Cependant, ce qui nous intéresse surtout est l'inhibition qu'elles exercent sur la floraison, et notamment sur le développement des fleurons ligulés. Les auxines ont rarement provoqué des réversions florales, quelquefois avec l'AIA et le 2,4 D j'ai constaté un développement important des ovaires chez les fleurons les plus différenciés, ce qui confirme les résultats obtenus par GALUN et ses collaborateurs sur les fleurs de concombre (84, 85). Enfin, l'évolution des primordia floraux au centre du capitule a été arrêtée dès les plus faibles concentrations ( $10^{-8}$  à  $10^{-7}$ ). Ceci confirme les observations de RAGHAVAN (123) sur les apex de *Perilla frutescens* cultivés "in vitro" selon lesquelles l'auxine est un inhibiteur de la floraison chez cette plante et qui agirait de façon spécifique mais non parce qu'elle favorise la croissance végétative.

Comme nous l'avons vu, les auteurs sont unanimes, à part quelques exceptions (comme dans le cas de l'ananas et le *Streptocarpus*), sur le fait que l'auxine favorise la croissance végétative (rhizogénèse, tumorigénèse) et inhibe la floraison chez les plantes entières (AUDUS, 401 - BONNER et THURLOW, 402 - BONNER et BANDURSKI, 403 - HAMNER et NANDA, 408 - HESLOP-HARRISON, 409) et chez les organes et les tissus cultivés "in vitro" (AGHION-PRAT, 62 - PAULET, 129). Plusieurs auteurs ont rapporté aussi les effets bénéfiques de

---

(\*) Je ne saurais dire cependant s'il s'agit du fameux rapport C/N auquel KLEBS (19) accordait un rôle capital dans le déclenchement de la floraison des végétaux supérieurs au début de ce siècle et qui fut mis en vogue par la suite par KRAUSS et KRAYBILL (22).



l'auxine sur le développement des ovaires isolés ou sur l'ovaire de fleurs cultivées "in vitro" (ovaire de Linaria SACHAR et BALDEV, 143 - ovaire de tomate NITSCH, 118, 119 - ovaire dans la fleur de concombre GALUN, JUNG et LANG, 84, 85); j'ai observé le même phénomène avec l'AIA et le 2,4 D chez les boutons de chrysanthème.

De nombreux auteurs (BRIAN, 264, 265, 266 - KATO, 279, 280, etc.) ont montré que la gibbérelline avait des propriétés différentes des auxines, bien qu'elle stimule aussi la croissance.

En ce qui concerne les boutons de chrysanthème, la gibbérelline, contrairement aux auxines, a inhibé la prolifération cellulaire du cal et la rhizogénèse. D'autres auteurs et en particulier HENRICKSON (90) sur des cultures de tissus de Tournesol ont constaté également que la gibbérelline empêchait la tumorigénèse. Comme les milieux ne renfermaient pas d'auxine dans ces expériences, je pense que l'origine de cet effet dépressif sur la tumorigénèse est dû peut-être à la mobilisation de l'auxine endogène dans les processus de stimulation dans lesquels la gibbérelline est engagée, cette dernière ne pouvant agir seule sur la croissance avec autant d'efficacité.

A l'inverse des auxines aussi, la gibbérelline stimule la croissance du pédoncule de façon spectaculaire (300 à 500 % de leur longueur initiale). Cette stimulation était proportionnelle à la concentration dans la gamme des doses utilisées  $10^{-8}$  à  $10^{-3}$ ; la plus forte concentration marquant un maximum d'activité. Les auxines ont eu une faible action stimulante aux basses concentrations  $10^{-8}$  à  $10^{-7}$  et nous avons vu apparaître un effet inhibiteur très important pour les concentrations supérieures. Tout se passe pour la gibbérelline comme si le site principal d'action se trouvait être dans le pédoncule. Enfin, l'acide gibbérellique stimule légèrement la floraison (augmentation de la longueur et du nombre de fleurons ligulés épanouis).

Parmi les stimulateurs qui apparaissent au moment de la floraison chez le chrysanthème, HARADA et NITSCH (276, 277) ont découvert une substance de montagne qui agit sur l'élongation des tiges et provoque la floraison de variétés qui ont besoin de vernalisation. Grâce à des greffages, HARADA (277) a montré que cette "substance E" remplaçait le traitement par le froid, se comportait comme une gibbérelline; il pense qu'elle participerait à la biosynthèse de l'hormone hypothétique de la floraison (ou florigène). Dans le cas des boutons floraux, la gibbérelline n'a pas, semble-t-il, été impliquée dans un tel processus, car il manquait peut-être l'élément complémentaire.

L'acide gibbérellique n'a pas provoqué, dans les conditions expérimentales (en présence du milieu de base à 80 % de saccharose) de réversions des fleurons, tout au moins de façon aussi spectaculaire que dans le cas de l'*Anagallis arvensis* (BRULFERT, 71) ou de modification dans l'expression des sexes comme chez le Concombre (SAITO et ITO, 434) ou chez le Chanvre (ATAL, 262). D'autres expériences seraient nécessaires pour apporter des informations complémentaires sur ce point.

#### e. Effets de l'Acide triiodobenzoïque.

L'effet inhibiteur des auxines sur la floraison donnait à penser que les inhibiteurs de la biosynthèse ou du transport de l'auxine stimuleraient la floraison. Parmi ces inhibiteurs de l'auxine, le ATIB provoque bien la formation de fleurs chez de jeunes tomates



(ZIMMERMAN et HITCHCOCK, 423), mais c'est là un fait presque isolé, et dans ce domaine, il est toujours difficile d'extrapoler. Comme toujours, on n'a pas manqué d'élaborer une théorie basée sur cette idée selon laquelle la floraison des plantes serait due au rapport stimulateur/inhibiteur (RESENDE, 35).

Nous avons vu qu'en ce qui concerne l'ATIB, son action n'est pas toujours très nette et certains auteurs, avec le même matériel (par ex. : Néoformation des fleurs sur les racines d'endives vernalisées) ont observé une action tout à fait différente.

Chez les boutons de chrysanthème, l'ATIB a inhibé l'allongement des pédoncules proportionnellement à la concentration, la formation du cal, la tumorigénèse et la rhizogénèse, il a donc empêché, semble-t-il, l'action de l'auxine endogène. Il a inhibé également le développement des fleurons femelles; ce n'est pas étonnant, si l'on se souvient que l'auxine, chez d'autres espèces (Aquilegia, Concombre) inhibe les étamines et stimule la croissance de l'ovaire. Mais, bien qu'il s'agisse d'une antiauxine, l'ATIB n'a pas provoqué la néoformation de fleurons nouveaux au sein du capitule et la floraison généralisée.

Il faut considérer dans tout cela, que l'ATIB n'est pas un inhibiteur naturel, on ne le trouve pas chez les végétaux, et pour les boutons de chrysanthème, la limite de toxicité est rapidement atteinte, ce qui ne permet pas une étude précise des effets de cette substance. D'ailleurs, il y a eu dans les expériences sur l'ATIB, une grande hétérogénéité dans les réponses (variation du diamètre des boutons, de l'allongement des pédoncules et de l'état des fleurons pour un même traitement). Peut-être que la faible solubilité de cette substance était à l'origine d'une absorption et d'une répartition inégales dans les boutons floraux, ce qui s'est traduit en particulier par une courbure des pédoncules. Le chrysanthème a ses propres inhibiteurs et ces substances là qu'il faudra étudier plus précisément.

HARADA et NITSCH (272 à 277), dans leurs tentatives d'isolement d'hormones au cours de la floraison du chrysanthème, ont été très gênés par la présence d'un inhibiteur qui se trouvait en grande quantité dans les extraits et qui avait un Rf identique à certains stimulateurs empêchant l'isolement de ces derniers.

BALLANTYNE (417) a isolé un inhibiteur puissant dans les racines du chrysanthème qui réduit l'allongement des entre-nœuds et le nombre de boutons floraux; cette inhibition pourrait être levée par la gibbérelline.

De mon côté, j'ai, dès 1959, mis en évidence un inhibiteur de croissance chez la variété Souvenir de GEORGES PECHOU, en partant d'une idée toute différente. J'ai déjà signalé que les échecs de mes premiers essais de cultures de boutons floraux "in vitro" étaient dus non seulement à un brunissement, mais à des contaminations. Or, les boutons sur les plantes entières sont rarement la proie des champignons, comme en culture "in vitro"; j'ai donc pensé que les boutons "in vivo" étaient protégés par une substance antifongique sécrétée par les parties végétatives de la plante. Pour le montrer, j'ai isolé la souche de champignon (*Dema-ti-cée*) qui me causait le plus d'ennuis, et j'ai effectué des extraits à partir de feuilles de chrysanthème, à l'aide d'éther sulfurique déperoxydé. Dans des boîtes de Pétri, renfermant un milieu gélosé à la pomme de terre (milieu de Sabouraud), j'ai ensemencé aseptiquement des spores du champignon en suspension dans une solution isotonique de saccharose. Puis, après évacuation de l'excès du liquide d'ensemencement (suspension de spores), les boîtes ont été placées 2 heures à l'étuve à 27° C. Pendant ce temps, j'ai évaporé sur de petits ronds de papier Whatman 3 M stérilisés : respectivement un centimètre cube de l'extrait de 15 gr. de

feuilles fraîches de chrysanthème (a), un centimètre cube de l'extrait de 5 gr. de feuilles séchées à l'air pendant 18 jours à la température du laboratoire (b), un centimètre cube de l'extrait effectué à partir d'un broyat de feuilles autoclavé pendant 20 minutes à 120° C (c), et enfin un centimètre cube d'éther pur déperoxydé (d). Chaque rondelle a été ensuite placée sur la culture dans la boîte de Pétri (Méthode Heatley). On voit, Planche XV, fig. 1 et 2, que l'éther pur n'a produit aucune inhibition (papier d), tandis que les extraits de feuilles (papiers a et b) ont formé des auréoles d'inhibition de 20 à 25 mm. L'autoclavage n'a pas réduit sensiblement l'activité de la substance active (papier c). Le chrysanthème Souvenir de GEORGES PECHOU renferme donc dans ses feuilles un antifongique puissant qui est sans doute aussi un inhibiteur de croissance. Cet inhibiteur joue un rôle dans la protection de la plante, mais il joue peut-être un rôle également dans la mise à fleur. Je ne puis affirmer qu'il s'agit de la même substance que celle découverte par BALLANTYNE (417) et par HARADA et NITSCH (272 à 277), mais je pense que son étude ultérieure serait intéressante, car les boutons floraux en renferment une quantité importante, surtout dans les bractées.

L'existence de cet inhibiteur et son rôle possible sur le déroulement de la floraison est confirmée, semble-t-il, par l'expérience suivante non encore publiée.

J'ai bouturé des boutons "couronnes" avec leur hampe florale, **Après enracinement**, les Témoins n'ont pas évolué pendant plus d'un an (durée de l'expérience). Lorsque sur des boutons identiques j'ai enlevé les bractées libres le long de la hampe, il n'y a pas eu non plus d'évolution sensible. Mais d'autres boutons auxquels j'avais supprimé les bractées de la hampe et les larges bractées foliacées vertes horizontales situées immédiatement sous le capitule, ont augmenté légèrement de diamètre après quelques mois.

Dans un troisième traitement, j'ai enlevé non seulement les bractées de la hampe florale et les larges bractées foliacées sous le capitule, mais aussi les premières bractées extérieures du capitule lui-même (2 rangées). Alors, les plus extérieures des bractées restant dans le capitule, ont doublé ou triplé de longueur, tandis que parfois quelques fleurons réussissaient à se dégager. Mais la croissance et le développement se sont bientôt arrêtés.

Enfin, chez un quatrième lot de boutons couronnes enracinés, j'ai répété le troisième traitement ci-dessus. J'ai obtenu un développement et une croissance des bractées et des fleurons les plus externes du capitule. J'ai alors supprimé les bractées les plus externes, lorsqu'il me semblait que leur croissance tendait à s'arrêter et j'ai alors obtenu une floraison spectaculaire des fleurons du centre du capitule qui normalement, n'auraient pu s'épanouir que si l'inflorescence était demeurée sur la plante. On peut donc en conclure que les bractées vertes du capitule exercent une action inhibitrice sur le développement des pièces florales situées au centre du bouton, et renferment sans doute de grandes quantités d'inhibiteur.

#### f. Effets de la kinétine seule ou en présence de stimulateurs de croissance.

La kinétine seule inhibe la croissance et la floraison à partir de la concentration  $10^{-6}$ , mais pour interpréter ses effets, il faut tenir compte comme pour les autres substances, de ce que le bouton floral renferme peut-être déjà une certaine quantité de kinétines naturelles ou Phytokinines et d'auxines. Aussi, le taux de ces substances est rapidement élevé par un apport extérieur. Ainsi, dès  $10^{-7}$  de kinétine, j'ai obtenu sans auxine la néo-

formation de fleurs sur le cal du pédoncule, comme CHOUARD et AGHION (75), puis AGHION (58, 59) et AGHION-PRAT (62), l'ont observé sur des fragments de hampe florale de tabac et MOTAMED (117) sur des fragments de hampe florale de *Datura*, avec de faibles quantités de kinétine et d'AIA.

Ici par conséquent, la quantité d'auxine endogène a suffi pour stimuler cette néoformation. En élevant la quantité d'AIA par un apport dans le milieu, la propriété de néoformation a disparu dès les plus faibles concentrations. Dans l'expérience kinétine + AIA, le phénomène n'a été observé qu'une seule fois chez un bouton kinétine  $10^{-6}$  + AIA  $10^{-8}$ , c'est que déjà, à cette concentration, les niveaux d'auxine et de kinétine favorables étaient dépassés.

Quand les doses d'AIA ont été augmentées en présence de kinétine, le développement du pédoncule et des fleurons ligulés ont été rapidement inhibés; l'AIA a renforcé l'action inhibitrice de la kinétine. Mais pour les deux plus fortes concentrations en AIA, le réceptacle a augmenté de diamètre et de volume; cet effet n'était malheureusement pas en corrélation avec la formation d'un plus grand nombre de primordia floraux. L'un des caractères du développement du capitule a été reproduit ici, mais il manquait "quelque chose" encore dans le milieu pour que la floraison se passe comme sur la plante entière.

On peut rapprocher l'augmentation de volume du réceptacle des effets de la kinétine sur la multiplication cellulaire de la moelle de Tabac, obtenus par SKOOG et ses collaborateurs (451, 452), effet intensifié par l'auxine. Seule la kinétine permet la division des cellules du parenchyme interne. Or, dans le capitule du chrysanthème, la plus grande partie (au centre des tissus) est occupée par un parenchyme qui prolonge la moelle de la tige; l'augmentation de volume du réceptacle est due surtout à la prolifération des cellules de ce tissu. Il faut donc que le bouton reçoive une quantité supplémentaire de Phytokinines et d'auxines (fournis par la plante) pour poursuivre l'augmentation de diamètre de son réceptacle. Nous avons vu qu'il renferme vraisemblablement déjà une certaine quantité de ces substances et c'est sans doute aussi la raison de la formation de cals volumineux à croissance rapide à la base du pédoncule. On peut expliquer aussi peut-être de cette manière l'augmentation du diamètre des boutons floraux sous l'influence de l'ATIB à fortes concentrations. L'ATIB empêcherait la migration de l'auxine endogène vers la base du pédoncule et l'auxine resterait ainsi disponible au niveau du réceptacle où elle pourrait favoriser l'action des Phytokinines.

La kinétine ajoutée à l'acide gibbérellique annule les effets de ce dernier; la kinétine inhibe l'allongement du pédoncule dès les plus faibles concentrations ( $10^{-8}$ ) et le développement des fleurons femelles ligulés à partir de  $10^{-6}$ .

Le pédoncule serait l'un des sites principaux d'action de la gibbérelline. Une action synergique sur le développement des fleurons a été observée pour le mélange gibbérelline  $10^{-6}$  + kinétine  $10^{-8}$  à  $10^{-7}$ ; le nombre de fleurons femelles épanouis a été augmenté mais les primordia floraux du centre du capitule n'ont pas évolué et il ne s'en est pas formé de nouveaux. Dans ce cas, comme dans celui de la kinétine + AIA, tous les facteurs favorisant la floraison n'étaient donc pas dans le milieu.

L'effet de l'apport d'une substance au milieu n'est pas, comme on le pense habituellement, toujours proportionnel et tout à fait spécifique, mais il traduit le nouveau rapport, le nouvel équilibre obtenu avec les substances naturelles qui sont déjà dans le

tissu ou l'organe. Des facteurs comme la spécificité, la faculté d'absorption ou la solubilité (cas de l'ATIB), la possibilité de transfert, d'utilisation ou de détoxification (cas de l'ATIB et du 2,4 D) interviennent pour empêcher ou intensifier les réponses.

Dans les inflorescences et dans les fleurs, des corrélations interviennent qui modifient ou répartissent les sites d'action des diverses substances : par exemple, la destruction de l'ovaire qui mobilise l'AIA, favorise le développement des étamines dans la fleur d'Aquilegia, et quand ZANONI (172) castré les fleurons femelles du capitule de chrysanthème "in vivo", la corolle devient hypertrophiée (auxine devenue disponible). Les sites d'action sont donc souvent très localisés.

Tous les raisonnements relatifs au développement des fleurs reposent sur l'idée finaliste que la floraison et la fructification constituent les dernières étapes de la vie d'un végétal ou du bourgeon terminal d'un rameau. Il est, semble-t-il, nécessaire de réviser cette opinion, car les cellules florales du chrysanthème (comme de nombreuses autres espèces) ne sont pas un indice de sénilité. Il s'agit d'un stade transitoire reproductif; la propriété "florale" peut être perdue et dans ce cas, il y a un retour en arrière qui représente ce que les botanistes ont désigné, à tort peut-être, sous le nom de "réversions florales ou de fleurs prolifères".

#### g. Réversions florales "in vitro".

J'ai indiqué à plusieurs reprises l'apparition de "réversions" florales sous l'influence de divers traitements. Il ne me paraît pas utile de parler longuement ici de ce phénomène, car pour en avoir une parfaite connaissance, il faudrait lui réserver une étude particulière comme l'a fait BRULFERT (462 à 466) avec le Mouron rouge.

Chez le Chrysanthème, la première mention des réversions florales a été faite en 1889 dans un article anonyme du Gardener's Chronicle (481, 483). En France, CHIFFLOT selon PENZIG (479), BOIS (461) puis CHOUARD (468, 469) ont donné tour à tour des descriptions de capitules de chrysanthèmes réversés. En Allemagne, HELM en 1959 (476) en a fait également une description morphologique détaillée. CHOUARD et VAIDIE (189) pensaient qu'une photopériode défavorable à la floraison pouvait être à l'origine d'un retour des fleurs vers l'état végétatif. Ce retour en arrière a été en effet obtenu chez d'autres espèces, notamment par BIDDULPH (461) avec le Cosmos sulfureus et SCHWABE (234) a signalé en 1951 qu'il a augmenté le nombre des réversions florales chez le chrysanthème par les jours longs, des applications d'auxine (500 ppm) sous forme de pâte de lanoline et par l'ombrage. Il a attribué l'effet de l'ombrage à une réduction de la biosynthèse des carbohydrates et à une augmentation du taux d'auxine.

De mon côté, j'ai vérifié l'hypothèse de CHOUARD à l'aide de boutures de boutons couronnes (\*). Cependant, HELM (476) est d'un avis tout à fait contraire. Il a trouvé que les chrysanthèmes réversent davantage lorsque l'intensité de la lumière augmente.

Les boutons de jours courts cultivés "in vitro" étaient indifférents au photopériodisme dans les conditions expérimentales utilisées ici, c'est-à-dire pour une intensité

---

(\*) Les résultats n'entrant pas dans le cadre de cette étude seront publiés ultérieurement.

de la lumière de 3.500 lux; la faible lumière n'a pas provoqué de réversion florale sur le milieu de base à 80 ‰ de saccharose.

On peut donc en conclure, d'une part que le bouton de chrysanthème en culture "in vitro" vit en hétérotrophie utilisant seulement les substances stockées au départ et celle du milieu nutritif et qu'il n'a pas la possibilité de biosynthétiser les sucres nécessaires à son évolution. C'est donc de ce point de vue un excellent matériel pour l'étude de la physiologie de la floraison. D'autre part, selon l'hypothèse de SCHWABE (loc. cit.), les réversions sont bien en relation avec une diminution du taux de carbohydrates ou plutôt avec des "facteurs végétatifs", la faible concentration en sucre représentant l'un de ces facteurs. En effet, TRINKLER (480) a signalé que la réversion des fleurs chez la Pomme de terre n'avait lieu que lorsque la teneur en glucides était faible et le rH élevé; voici donc un facteur, le rH, dont on n'avait pas parlé jusqu'ici. Est-ce que les sucres sous leur forme réductrice participent au déclenchement de la réversion ? En présence de glucose et de fructose, les réversions produites donnaient des rameaux qui demeuraient végétatifs.

L'effet des jours longs ne peut s'expliquer par une diminution de la biosynthèse des sucres, mais par une augmentation du taux d'auxine. Or, ni l'AIA ni l'acide gibbérellique n'ont provoqué une augmentation significative des réversions sur le milieu de base à 80 ‰ de saccharose; dans ce cas, le milieu était trop riche en sucre.

Des recherches actuellement en cours montrent que la concentration en sucre conditionne le retour à l'état végétatif, davantage que l'effet des hormones. La photographie 3, Planche XIV, représente un résultat qui confirme ce point de vue. Sur un milieu à 30 ‰ de saccharose, des boutons floraux sans pédoncule ont présenté des réversions et différents rapports entre l'AIA, la gibbérelline et la kinétine ont pu influencer ensuite l'organogénèse propre de la réversion qui a donné des feuilles ou la croissance de la base d'un fleuron suivi d'une réversion végétative, ou la réapparition de l'état floral, ce que je désignerai par le terme de "surfloraison".

Le moment est venu de nous demander si le test choisi pour l'étude de la physiologie de la floraison du chrysanthème convient à ce genre de recherches et s'il a joué le rôle que nous en attendions.

#### h. Valeur du Test.

Je puis répondre immédiatement par l'affirmative. Sur le milieu de base, le capitule du chrysanthème isolé de la plante ne peut se développer complètement. La nature indubitablement inflorescentielle de ses tissus, tout au moins du réceptacle, en font un matériel de choix qui peut évoluer soit dans le sens floral, soit dans le sens végétatif, mais seulement en fonction des substances actives du milieu nutritif. Il n'est en effet pas sensible aux variations des facteurs physiques (lumière, température) dans les limites vitales. Il vit en hétérotrophie se comportant comme un récepteur réagissant aux impulsions ou aux substances biosynthétisées habituellement dans la plante.

Cependant, nous avons vu que les boutons sans pédoncule ont réagi plus rapidement que les boutons avec pédoncule. Le bouton floral entier ne satisfait donc pas tout à fait à la règle de la proximité des sites d'absorption et d'utilisation. Les parties vertes du capitule : bractées et pédoncules, ont réagi surtout aux facteurs qui stimulent les organes

végétatifs (formation d'un cal, tumorigénèse, rhizogénèse), c'est dire que, comme la hampe florale du tabac, sans être tout à fait végétatives, ces portions ne sont pas non plus de nature tout à fait florale. Le réceptacle est la seule partie à potentialité vraiment inflorescentielle. C'est sur ce tissu que se forment les fleurs dont l'évolution est ensuite centrifuge. Au centre, les primordia les plus jeunes, petites masses globulaires indifférenciées au départ, seront amenés à évoluer s'ils reçoivent le stimulus indispensable. L'expérience m'a montré qu'en l'absence de ce stimulus, seuls les fleurons parvenus au stade de formation de l'ovaire sont capables de poursuivre leur développement.

Dans des conditions idéales, les tissus inflorescentiels du réceptacle doivent se régénérer par le centre comme sur la plante entière, de sorte que théoriquement, la floraison du capitule serait infinie ....

En conclusion, dans les recherches futures, il sera intéressant d'éliminer le plus possible les tissus intermédiaires (pédoncule et bractées) qui risquent d'interférer ou de ralentir le transfert des substances actives et de les métaboliser, pour ne cultiver que le seul réceptacle du capitule.

## CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Une méthode d'étude de la Physiologie de la floraison, basée sur l'examen du déroulement des étapes de l'évolution de boutons floraux en culture "in vitro", est proposée. Elle repose sur le principe qu'un bouton floral excisé et maintenu en survie grâce à une technique de culture "in vitro" pourra poursuivre son développement normal s'il reçoit du milieu de culture les éléments qui lui étaient auparavant dispensés par la plante.

Le capitule du chrysanthème se prête bien à ce genre de recherches parce qu'il comporte un réceptacle constitué d'un tissu inflorescentiel dont il est possible de déterminer à coup sûr l'état de différenciation. Ce matériel nettement défini permettrait d'étudier la physiologie de la mise à fleur, et de la floraison, mais aussi les problèmes relatifs à l'organogénèse, à la sexualisation et à la physiologie de la formation des inflorescences qui depuis quelques années, a fait l'objet de nombreuses observations morphologiques (EMBERGER, 348 - MARESQUELLE, 360 à 363 - PLANTEFOL, 368, 369).

Pour que cette méthode puisse présenter un maximum d'efficacité, il fallait un matériel stable et homogène et une méthode de culture spécialement adaptée.

Plusieurs années de recherches ont été nécessaires pour le choix d'une variété stable pour déterminer avec précision ses exigences écophysiologiques, et pour élaborer une méthode de production de boutons standards. La variété Souvenir de GEORGES PECHOU (clône de serre tiède) a été choisie pour ses nombreuses qualités. Elle se reproduit facilement par boutures (culture monoclonale) et fleurit rapidement en jours courts 9 h. (15 à 22 jours). Elle présente le minimum de "barrières" physiologiques à la mise à fleur : ses drageons non dormants n'exigent donc pas de vernalisation, elle peut être cultivée dans une large gamme de températures 18 à 35° C, elle est indifférente au photopériodisme, sa floraison n'est pas influencée par la gibbérelline, enfin elle peut former ses capitules même à l'obscurité.

Préparée selon une méthode standard, elle donne, par plante (une trentaine de jours après le début du traitement par les jours courts), 3 à 4 boutons floraux de jours courts, arrondis (boutons axillaires au-dessous du capitule principal) de 7 à 8 mm de diamètre, à pédoncule sans bractées libres, susceptibles d'être prélevés pour la mise en culture "in vitro". Les boutons ont été cultivés avec ou sans leur pédoncule; ils sont, comme la plante entière, insensibles au photopériodisme et très peu sensibles à l'intensité de la lumière.

Une méthode de culture "in vitro" a été mise au point : elle nécessite un matériel nouveau : boîte à gants, aiguilles à ensemercer, tubes à capuchons de verre, etc. La composition du milieu de base a été déterminée d'après la composition chimique (éléments macro-trophiques) de chrysanthèmes en cours de floraison. La solution d'éléments minéraux (solution F) est riche en azote et en potassium.

Les sucres sont nombreux aux moments de la floraison (une dizaine), mais seuls, le glucose, le fructose et le saccharose semblent jouer un rôle important, car on les rencontre dans tous les organes; le milieu de base renferme 80 ‰ de saccharose, soit une quantité quatre fois supérieure à celle des milieux pour tissus végétatifs.

Les tissus floraux n'ont pas les mêmes besoins nutritifs que les tissus végétatifs. D'ailleurs, les premiers essais de culture "in vitro" sur des milieux utilisés habituellement pour les cultures de tissus, par exemple Milieux de Gautheret, de Heller, de Knop, etc. ne renfermant que 20 à 30 g/l de saccharose, n'ont pas permis un bon développement des boutons floraux qui brunissaient et mouraient pour la plupart. Cet échec était dû surtout aux quantités trop faibles de potassium et de sucre de ces milieux.

En l'absence de substances stimulatrices ou inhibitrices de la croissance et de substances excitoformatrices, les boutons floraux prélevés au début de leur développement, peuvent continuer leur évolution pendant une quinzaine de jours : sur le milieu de base F avec 80 ‰ de saccharose. On observe d'abord un allongement du pédoncule, puis une prolifération cellulaire à l'extrémité de celui-ci, il se forme un cal arrondi au niveau duquel apparaissent des racines, tandis que les bractées s'écartent, libérant les premiers fleurons. Mais seuls les fleurons femelles ligulés les plus extérieurs se développent parce qu'ils sont parvenus au stade de formation de l'ovaire au moment du prélèvement. Vers l'intérieur du capitule, les fleurons hermaphrodites sont restés à leur état de départ, et les primordia floraux non différenciés sont morts.

Le bouton floral renferme donc à l'origine des substances régulatrices de la croissance qui lui permettent cette courte évolution "in vitro" (croissance, cal, rhizogénèse et épanouissement partiel).

Une forte teneur du milieu en azote et en potassium a un effet bénéfique sur la floraison, mais c'est surtout la quantité de sucre qui semble jouer le rôle le plus important sur la prolongation du développement des boutons excisés en culture "in vitro".

Le glucose est mal supporté par les boutons, tandis que le fructose donne pour de plus faibles concentrations (40 à 60 ‰) que le saccharose, des résultats presque identiques à ce dernier. Cependant, ces deux sucres réducteurs n'empêchent pas totalement le brunissement des boutons et stimulent surtout le développement végétatif (verdissement des pétales, réversions florales). Le saccharose stimule la floraison entre 80 et 160 ‰; la dose optimale est de 100 à 120 ‰, mais c'est une concentration légèrement inférieure 80 ‰, qui a été adoptée pour le milieu de base. Le brunissement des boutons a lieu surtout pour des concentrations inférieures à 30 ‰. De 30 à 40 ‰, on observe surtout un développement végétatif des boutons, peu d'épanouissement de fleurons, une rhizogénèse importante et des réversions florales. Le saccharose ne devient inhibiteur de la croissance et de la floraison qu'au-dessus de 180 ‰.

Les auxines (acide indolyl-acétique, acide naphthyl-acétique, acide 2,4 dichlorophénoxy-acétique) inhibent la floraison dès les plus faibles concentrations utilisées ( $10^{-7}$  pour le 2,4 D et  $10^{-6}$  pour l'AIA et l'ANA). Ces résultats confirment les observations qui avaient été faites par d'autres auteurs sur des plantes entières et sur la néoformation des fleurs ou sur des fleurs cultivées "in vitro". Elles stimulent la formation du cal à l'extrémité des pédoncules et généralisent la prolifération cellulaire (tumorigénèse) jusque dans le bouton floral, pour des concentrations de l'ordre de  $10^{-6}$  à  $10^{-4}$ . Elles stimulent égale-



ment la rhizogénèse comme sur les organes végétatifs et provoquent la parthénocarpie des ovaires non fécondés.

L'acide gibbérellique exerce une action stimulante spécifique sur l'allongement des pédoncules proportionnellement à la concentration dès  $10^{-7}$  (300 à 500 % de la taille initiale) et n'empêche pas la floraison comme les auxines. Par contre, il inhibe la formation du cal à l'extrémité des pédoncules et la rhizogénèse dès  $10^{-6}$ .

L'acide 2, 3, 5 triiodobenzoïque empêche l'allongement du pédoncule et surtout la tumorigénése, la rhizogénèse et l'allongement de la ligule des fleurons femelles, que l'on attribue habituellement à l'action des auxines. Il provoque pour des concentrations proches de la toxicité  $7,5 \cdot 10^{-5}$ , une augmentation importante du diamètre du capitule (43 %).

La kinétine à elle seule stimule la croissance du pédoncule aux faibles concentrations, (puis l'inhibe à partir de  $10^{-6}$ ), ainsi que la formation d'un cal, la rhizogénèse et la floraison. A la plus faible teneur utilisée,  $10^{-7}$ , des fleurs se sont néoformées sur le cal du pédoncule.

La kinétine en présence d'acide gibbérellique ( $10^{-6}$ ) empêche l'allongement du pédoncule provoqué par ce dernier, et la floraison; elle rétablit la tumorigénése de l'extrémité du pédoncule, empêchée par l'acide gibbérellique mais non la rhizogénèse.

Enfin, l'acide  $\beta$ -indolyl-acétique ajouté à la kinétine ( $10^{-6}$ ) rétablit l'épanouissement des fleurons extérieurs ligulés, inhibés par la kinétine ( $K \cdot 10^{-6} + AIA \cdot 10^{-6}$ ). Mais au-dessus de  $10^{-6}$  d'AIA, le développement des fleurons ligulés est annulé, tandis que le réceptacle augmente de diamètre et de volume. Ce phénomène est à rapprocher avec le résultat d'une expérience non encore publiée, au cours de laquelle la suppression des bractées et des fleurons extérieurs de boutons couronnés (bouturés) a permis aux fleurons du centre du capitule de se développer et de s'épanouir. C'est l'inhibition du développement des bractées et des fleurons extérieurs, par la kinétine et l'AIA, qui aurait ici pour résultat la prolifération cellulaire du centre du réceptacle.

Le milieu de culture idéal serait celui qui non seulement pourrait permettre l'expression des organes floraux différenciés au moment de l'épanouissement des fleurons ligulés extérieurs, mais aussi la différenciation florale des primordia, la formation de primordia nouveaux et, peut-être, la régénération de nouveaux tissus inflorescentiels au centre du capitule. Ainsi, en allant vers la périphérie, les tissus ~~du réceptacle~~ renouvelés au milieu du réceptacle formeraient ensuite plus loin des primordia qui peu à peu se différencieraient en allant vers la périphérie, puis s'épanouiraient; on aurait une floraison continue. Cependant, il n'est pas sûr encore que la formation des tissus du réceptacle et la formation des fleurons à partir de ses tissus n'appartiennent pas à deux stades successifs du développement du capitule, le premier devant être terminé avant que l'autre ne commence; dans ce cas, seules les cellules en place du tissu inflorescentiel pourraient former des fleurs.

Les milieux les plus favorables, gibbérelline  $10^{-6}$  + kinétine  $10^{-6}$  et kinétine  $10^{-6}$  + AIA  $10^{-7}$  n'ont permis au mieux que le développement (épanouissement) des fleurons les plus différenciés au moment du prélèvement; il s'agissait en général des fleurons femelles ligulés parvenus au stade de la formation de l'ovaire.

Avec le fructose, les primordia du centre du capitule sont morts et ont été remplacés parfois par une cicatrice. L'ATIB et la kinétine  $10^{-6}$  associée à l'AIA  $10^{-5}$  ont seuls permis une augmentation notable du diamètre du capitule, sans toutefois provoquer la formation de nouveaux primordia. Le milieu idéal n'a donc pas été réalisé. De nouvelles recherches seront nécessaires, en particulier pour préciser le meilleur équilibre Gibbérel-line-Kinétine-AIA, qui doivent agir en compétition avec l'inhibiteur naturel du chrysanthème et étudier les effets d'autres substances comme les acides nucléiques, les acides aminés, les stérols, etc.

L'un des faits les plus importants est la grande quantité de sucre indispensable à la survie des boutons floraux jusqu'à huit fois celle utilisée pour les cultures des tissus végétatifs. Ceci confirme les observations effectuées par d'autres auteurs, soit sur des plantes entières (afflux de sucres vers les fleurs), soit sur des inflorescences ou des fleurs excisées en milieu naturel ou aseptique, soit sur le phénomène de la néoformation des fleurs "in vitro". Les sucres peuvent agir comme précurseurs de métabolites divers, comme substrats pour la respiration et pour modifier les propriétés physico-chimiques du milieu : le pH, la pression osmotique et la teneur en eau. Il est curieux de constater que la teneur en eau d'un milieu nutritif favorable à la floraison correspond à celle du bouton floral resté sur la plante.

Les faibles quantités de sucre (30 %) sont à l'origine des réversions florales, selon l'hypothèse de SCHWABE (240), tandis que l'acide gibbérelle et les auxines étaient pratiquement sans effet. Dans le bouton floral de chrysanthème tel qu'il a été utilisé dans cette étude, il existe une quantité trop importante de tissus intermédiaires entre le point d'absorption des éléments dans le milieu (le pédoncule) et le site d'action (le réceptacle). En effet, ces tissus intermédiaires ont des réactions propres qui interfèrent et peuvent modifier celles des tissus inflorescentiels vis-à-vis des divers traitements. Ils renferment déjà des auxines, des inhibiteurs, des substances excitoformatrices, etc. et sont capables de biosynthétiser, bien qu'insensibles à l'intensité de la lumière et au photopériodisme. Aussi, dans les recherches ultérieures, seul le réceptacle (site d'action) sera cultivé.

## B i b l i o g r a p h i e

### OUVRAGES GENERAUX SUR LA PHYSIOLOGIE DE LA FLORAISON.

1. BOITEAU, P.- Contribution à l'étude du rôle de la lumière dans l'écologie végétale à Madagascar - Thèse. Inst. nat. d'Agron. France d'Outre-Mer, Ministère Fr. d'Outre-Mer, Nogent-s-Marne, 138 p. multigr., 1939.
2. BORTHWICK, H.A., S.B. HENDRICKS, M.W. PARKER.- The reaction controlling floral initiation - Proc. nat. Acad. Sci., 38, 11, pp. 929-934, 1952.
3. BORTHWICK, H.A., S.B. HENDRICKS, M.W. PARKER, E.H. TOOLE, V.K. TOOLE.- A reversible photoreaction controlling seed germination - Proc. nat. Acad. Sci., 38, 8, pp. 662-666, 1954.
4. CHAMPAGNAT, P.- Les principes généraux de la ramification des végétaux ligneux - Rev. hort ., pp. 335-341, 1946.
5. CHAMPAGNAT, P.- Dominance apicale, Tropismes, Epinastie - in : Encyclopedia of Plant Physiology ed. by W. Ruhland. Springer Verl., Berlin, vol. XIV, pp. 872-908, 1961.
6. CHOUARD, P.- Sur le Photopériodisme chez les plantes vivaces - Bull. Soc. Bot. Fr., 93, pp. 373-377, 1946 et 94, 9, pp. 399-405, 1947.
7. CHOUARD, P.- Bull. Soc. Bot. Fr., 96, pp. 218-220 et pp. 235-238, 1949.
8. CHOUARD, P.- Pourquoi fleurissent les plantes - Les Conférences du Palais de la Découverte, Paris, 1949.

9. CHOUARD, P.- Débat sur la vernalisation. A. Exposé introductif : les phénomènes fondamentaux de la vernalisation - Bull. Soc. Bot. Fr., Mém. 1950-1951, pp. 67-72, 1951.
10. CHOUARD, P.- Dormances et inhibitions des graines et des bourgeons, préparation au forçage, thermopériodisme - Centre Document. Univ., Paris, 157 p., 1956.
11. CHOUARD, P.- Diversité des mécanismes des dormances, de la vernalisation et du photopériodisme, révélé notamment par l'action de l'acide gibbérellique - Bull. Soc. Bot. Fr., Mém. 1956-1957, pp. 51-64, 1957.
12. CHOUARD, P.- Vernalization and its relations to dormancy - Ann. Rev. Plant Physiol., 11, pp. 191-238, 1960.
13. DOOREMBOS, J., S.J. WELLENSIEK.- Photoperiodic control of floral induction - Ann. Rev. Plant Physiol., 10, pp. 147-184, 1959.
14. GARNER, W.W., H.A. ALLARD.- Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants - J. agric. Res., 18, pp. 553-606, 1920.
15. GARNER, W.W., H.A. ALLARD.- Further studies in photoperiodism, the response of the plant to relative length of day and night - J. agric. Res., 23, 11, pp. 871-920, 1923.
16. GASSNER, G.- Beiträge zur physiologischen charakteristik sommer und winterannueller gewächse insberondere der Getreidepflanzen - Z. Bot., 10, pp. 417-480, 1918.
17. HAMNER, K.C.- Correlative effects of environmental factors. Photoperiodism - Bot. Gaz., 99, pp. 615-629, 1938.
18. HELLER, R.- Cours de Physiologie végétale. IIème Partie. Croissance et développement - Centre Docum. Univ., 204 p., Paris, 1960.
19. KLEBS, G.- Physiologie der Fortpflanzung. Physiologie Handwörterbuch - Naturwissenschaften, 4, pp. 276-296, 1913.
20. KLEBS, G.- Über die Blütenbildung von sempervivum - Flora, 111/112, pp. 128-151, 1918.
21. KNOTT, J.E.- Effect of localized photoperiod on spinach - Proc. Amer. Soc. hort. Sci., 31, pp. 152-154, 1934.
22. KRAUSS, E.J., H.R. KRAYBILL.- Vegetation and reproduction with special reference to the tomato - Oregon agric. Coll. Exp. Stn. Bull., 149, pp. 1-90, 1918.

23. LANG, A.- Physiology of flowering - Ann. Rev. Plant Physiol., 3, pp. 265-306, 1952.
24. LANG, A., G. MELCHERS.- Vernalisation und Devernalisation bei einer zweijährigen-Pflanze. Z. Naturw., 26, pp. 444-449, 1947.
25. LEOPOLD, A.C.- Photoperiodism in plants - Quart. Rev. Biol., 26, pp. 247-263, 1951.
26. LIVERMAN, J.L.- The physiology of flowering - Ann. Rev. Plant Physiol., 6, pp. 177-210, 1955.
27. LOCKHART, J.A.- Mechanism of the photoperiodic process in higher plants - in : Encyclopedia of Plant Physiology ed. by W. Ruhland. Springer Verl., Berlin, vol. XVI, pp. 390-438, 1961.
28. MATHON, C.-Ch., M. STROUN.- Temperature et floraison. - Que Sais-je ?, n° 1027, P.U.F., Paris, 124 p., 1962.
29. MATHON, C.-Ch., M. STROUN.- Lumière et floraison - Que Sais-je ?, n° 897, P.U.F., Paris, 128 p., 1960.
30. MELCHERS, G.- Versuche zur genetik und Entwicklungsphysiologie der Blühreife - Biol. Z., 56, pp. 567-570, 1936.
31. MELCHERS, G.- Die wirkung von Genen tiefen Temperaturen und blühenden Pfropfpartnern auf die Blühreife von Hyoscyamus niger L. - Biol. Zbl. 57, pp. 568-614, 1937.
32. MOSHKOV, B.S.- Le rôle des feuilles dans la réponse des plantes au photopériodisme - Trudy prikl. Bot. Genet. i Selekcii., Ser. A, 19, pp. 107-126, 1936.
33. PARKER, M.W., S.B. HENDRICKS, H.A. BORTHWICK, N.J. SCULLY.- Action spectrum for the periodic control of floral initiation of short day plants - Bot. Gaz., 108, pp. 1-25, 1946.
34. RABECHAULT, H.- La Ramie. Etudes morphologique et taxinomique en vue de sa sélection -Thèse Doct. Univ. Paris, J. Desseaux Impr., Paris, 136 p., 1951.
35. RESENDE, F.- Auxins and antiauxins the hormones responsible for the change of the vegetative into floral phenotypes - Bull. Soc. Portug. Cienc. nat., Sér. 2 a, 2, pp. 174-186, 1949.
36. ROBERTS, R.H., B.E. STRUCKMEYER.- J. agric. Res., 56, pp. 633-677. 1938.
37. SACHS, J.- Wirkung des Lichts auf die Blütenbildung unter Vermittlung der Laubblätter - Bot. Z., 23, pp. 117-121, 1865.

38. SALISBURY, F.E.- Photoperiodism and the flowering process. - Ann. Rev. Plant Physiol., 12, pp. 293-326, 1961.
39. TCHAILAKIAN, M. Th, T.V. NEKRASOVA, L.P. HOPENKOVA, V.N. LOJNIKOVA.- Rôle des gibbérellines dans les processus de photopériodisme, vernalisation et stratification des plantes - Fiziol. Rasten, 10, 4, pp. 465-476, 1963.
40. VINCE, D.- Photoperiodism and flowering, with special reference to the Chrysanthemum - Sci. Hort., 13, pp. 7-14, 1957-1958.
41. WELLENSIEK, S.J.- Les bases théoriques de la floraison - Ateneo par-mense, 29, suppl. 4, pp. 184-189, 1959.
42. WELLENSIEK, S.J., J. DOORENBOS, D. de ZEEUW.- The mechanism of photoperiodism. - Congr. Int. Bot. 8, 1954, Paris, Sect. XI et XII, pp. 307-315, 1954.

#### THEORIES HORMONALES DE LA FLORAISON.

43. BONNER, J., J. LIVERMAN.- Hormonal control of floral initiation - in : Growth and differentiation of plants ed. by W.E. Loomis, Iowa State College Press, Ames, Iowa, pp. 283-303, 1953.
44. CHOLODNY, N.G.- Herb. Rev., 7, pp. 223-247, 1939.
45. HESLOP-HARRISON, J.- J. Linn. Soc. Lond., Bot., 56, 316, pp. 269-281, 1959
46. LINCOLN, R.G., D.L. MAYFIELD, A. CUNNIGHAM.- Science, U.S.A., p. 756, 1961.
47. MELCHERS, G.- Die Blüthhormone - Ber. dtsh. bot. Ges., 57, pp. 29-48, 1939.
48. MELCHERS, G., A. LANG.- Weitere Untersuchungen zur Frage der Blüthhormone - Biol. Zbl., 61, pp. 16-39, 1941.
49. RABECHAULT, H.- Les théories hormonales de la floraison - Confér. Séminaire. Physiol. Plant Trop., Institut d'Enseignement et de Recherches Tropicales. O.R.S.T.O.M., Bondy (France). 16 p. multigr., 1962.
50. RESENDE, F.- Bull. Soc. Portug. Cienc. Nat., Ser. 2 a, 2, pp. 174-178, 1949.
51. ROBERTS, R.H.- Plant Physiol., Suppl. vol. 34, p. VII, 1959.

52. ROBERTS, R.H.- In : Régulateurs naturels de la croissance végétale. Coll. int. substances de croissance végétale. 5. 1963. Gif-s-Yvette - Coll. int. CNRS. n° 123. Paris, pp. 611-620, 1964.
53. SIRONVAL, C.- Congrès Int. Bot., 8. 1954. Paris, Sect. XI, pp. 328-329, 1954.
54. SIRONVAL, C.- La Photopériode et la sexualisation du Fraisier des quatre-saisons - Thèse Doct. Sci. Univ. Liège. 1956.
55. TCHAILAKIAN, M. Kh.- Fiziol. Rasten. 5, 6, pp. 541-560, 1958.
56. TCHAILAKIAN, M. Kh.- Florigen, gibberellins and anthesins - in : Régulateurs naturels de la croissance végétale - Colloque International. C.N.R.S. Gif-s-Yvette, C.N.R.S. Paris, pp. 589-595, 1964.
57. ZEEVAART, J.A.D.- Science, U.S.A., 137, 3532, pp. 723-731, 1962.

ETUDES SUR LA FLORAISON A L'AIDE D'ORGANES FLORAUX EN SURVIE ET NOTAMMENT PAR LA METHODE DES CULTURES "IN VITRO".

58. AGHION, D.- C.R. Acad. Sci., Paris, 255, pp. 993-995, 1962.
59. AGHION, D.- Bull. Soc. Bot. Fr., Mem., pp. 141-142, 1963 (paru 1964).
60. AGHION, D.- Rev. Cytol. Biol. vég., XXVII, fasc. 2-3-4, pp. 315-318, 1964.
61. AGHION-PRAT, D.- Nature, 207, 5002, p. 1211, 1965.
62. AGHION-PRAT, D.- Physiologie vég., 3, 3, pp. 229-305, 1965.
63. AGHION-PRAT, D.- Bull. Soc. fr. Physiol. vég., 11, 3, pp. 242-247, 1965.
64. ATSMON, D., E. GALUN.- Ann. Bot., 26, 102, pp. 137-146, 1962.
65. BALDEV, B.- Ann. Bot., 26, pp. 173-180, 1962.
66. BALL, E.- Amer. J. Bot., 33, pp. 301-318, 1946.
67. BALL, E.- Growth, 24, pp. 91-110, 1960.
68. BEALS, C.M.- Ann. Mo. Bot. Gard., 10, pp. 369-378, 1923.

69. BLAKE, J.- Nature, G.B., 211, 5052, pp. 990-991, 1966.
70. BONNETT, H.T., J.G. TORREY.- Plant Physiol., 40, 6, pp. 1228-1236, 1965.
71. BRULFERT, J.- Rev. gen. Bot., 72, 858, pp. 641-694, 1965.
72. BOUILLENNE, R.F., WENT.- Ann. Jardin bot. Buitenz., 43, p. 144, 1933.
73. BUTENKO, R.C.- Fiziol. Rasten., 7, pp. 715-723, 1960.
74. CHOUARD, P.- Bull. Soc. Bot. Fr., 109, 9, pp. 219-241, 1962.
75. CHOUARD, P., D. AGHION.- C.R. Acad. Sci., Paris, 252, pp. 3864-3866, 1961.
76. COLEMAN, R.E., L.G. NICKELL.- Nature, G.B., 201, pp. 941-942, 1964.
77. COMBES, R.- C.R. Soc. Biol., 127, p. 200, 1938.
78. CREASY, M.T., N.F. SOMMER.- Plant Physiol., 39, 3, pp. 710-716, 1964.
79. DEBRAUX, G., P. GAVAUDAN.- C.R. Acad. Sci., Paris, 229, pp. 137-138, 1949.
80. DEBRAUX, G., P. GAVAUDAN.- Proceed. 7th International Bot. Congr. Stockholm 1950. Stockholm, Almqvist 16-135035 och Wicksell, p. 370, 1953.
81. DOSTAL, R.- Über die wachstumsvegetative Wirkung des Laubblattes, p. 198 (cf. Goebel). 1926.
82. GALUN, E.- Phytol., 13, p. 1, 1959.
83. GALUN, E.- Genetica, 32, pp. 134-163, 1961.
84. GALUN, E., Y. JUNG, A. LANG.- Nature, G.B., 194, 4828, pp. 596-598, 1962.
85. GALUN, E., Y. JUNG, A. LANG.- Developmental Biology, 6, pp. 370-387, 1963.
86. GOEBEL, K.E.- Biol. Zbl., XXII, 22, pp. 481-505, 1902.
87. GOEBEL, K.E.- Flora, 95, pp. 384-411, 1905.
88. GREGORY, W.C.- Amer. J. Bot., 27, p. 687, 1940.
89. GRIESEL, W.O., S.M. CAPLIN.- Plant Physiol., 39, Supplement p. XXXVI, 1964.



90. HENRICKSON, C.E.- Plant Physiol., 29, n° 2, pp. 536-538, 1954.
91. JAMES, W.O., H. BEEVERS.- New Phytol., 49, p. 353, 1950.
92. JANSEN, L.L., J. BONNER.- Amer. J. Bot., 36, p. 826 (Abstracts), 1949.
93. KONAR, R.N., K. NATARAJA.- Naturwissenschaften, 52, 6, pp. 140-141, 1965.
94. KOSAN, J.H.D.- Dissert. Abstr. U.S.A., 20, 2, p. 468, 1959.
95. KUPFER, E.- Mem. Torrey Club, 12, pp. 195-241, 1907.
96. LAIBACH, F.- Bot. Arch., 44, pp. 439-455, 1943.
97. LAIBACH, F., F.J. KRIBBEN.- Ber. Dtsch. Bot. Ges., 62, p. 53, 1950.
98. LAIBACH, F., F.J. KRIBBEN.- Beitr. Biol. Pflanz., 28, p. 131, 1951.
99. LANGRIDGE, J.- Austr. J. Biol. Sci., 10, pp. 243-252, 1957.
100. LA RUE, C.D.- Science, U.S.A., 87, p. 240, 1938.
101. LA RUE, C.D.- Bull. Torrey Bot. Cl., 69, 5, pp. 332-341, 1942.
102. LEE, A.L.- Amer. J. Bot., 37, pp. 312-318, April 1950.
103. LOO, S.W.- Amer. J. Bot., 33, pp. 295-300, 1946.
104. LOO, S.W.- Amer. J. Bot., 33, pp. 382-389, 1946.
105. MAHESHWARI, N., M. LAL.- Nature, G.B., 181, pp. 631-632, 1958.
106. MAHESHWARI, N., M. LAL.- Phytomorphology, 11, pp. 307-314, 1961.
107. MARGARA, J.- C.R. Acad. Sci., Paris, 259, 25, pp. 4787-4790, 1964.
108. MARGARA, J.- C.R. Acad. Sci., Paris, 260, 1, pp. 278-281, 1965.
109. MARGARA, J.- Bull. Soc. Bot. Fr., 112, 3-4, pp. 113-118, 1965.
110. MARGARA, J., M. RANCILLAC, D. BECK.- Ann. Physiol. vég., 7, 3, pp. 157-170, 1965.
111. MARGARA, J., M. RANCILLAC.- Ann. Physiol. vég., 8, 1, pp. 39-47, 1966.
112. MARGARA, J., M. RANCILLAC.- C.R. Acad. Sci., Paris, 263, 20, pp. 1455-1458, 1966.

113. HIGINIAC, E., P. CHOUARD.- C.R. Acad. Sci., 263, 9, pp. 721-724, 1966.
114. MOTAMED-GHORBANLI, M.- Contribution à l'étude des propriétés organogènes de quelques plantes en culture aseptique. Thèse Doc. 3ème cycle, Spec. Physiol. vég., Paris, 84 p. multigr., Fac. Sci., Paris 1964.
115. MURASHIGE, T.- Plant Physiol., 39, 3, pp. 636-643, 1964.
116. NYSTERAKIS, F.- C.R. Acad. Sci., Paris, 250, 13, pp. 2456-2438, 1960.
117. NITSCH, C., J.P. NITSCH.- Bull. Soc. Fr. Physiol. vég., 1966 (sous presse) et Planta, 72, pp. 355-370 et pp. 371-384, 1967.
118. NITSCH, J.P.- C.R. Acad. Sci., Paris, 229, pp. 445-446, 1949.
119. NITSCH, J.P.- Amer. J. Bot., 38, pp. 566-576, 1951.
120. NITSCH, J.P.- Proc. of Campbell Soup Company., Plant Sci. Symp., pp. 5-21, 1962.
121. NITSCH, J.P.- The "in vitro" culture of flowers and fruits - in : Plant tissue and organ culture - A Symposium, ed. by P. Maheshwami, pp. 198-214, 1963.
122. NITSCH, J.P., C. NITSCH.- Bull. Soc. Bot. Fr., 111, pp. 299-304, 1964 et Bull. Soc. Bot. Fr., Mém., 113, 1966 (sous presse).
123. OEHLKERS, F.- Z. Nat. Fortsch., 10 B, n° 3, pp. 158-160, 1955.
124. OKONKWO, S.N.C.- Nature, G.B., 204, 4963, pp. 1108-1109, 1964.
125. OKONKWO, S.N.C.- Studies on Striga senegalensis Benth. - Ph. D. thesis, London 1964.
126. OKONKWO, S.N.C.- Amer. J. Bot., 53, 2, pp. 142-147, 1966.
127. OKONKWO, S.N.C.- Amer. J. Bot., 53, 7, pp. 679-687, 1966.
128. OKONKWO, S.N.C.- Amer. J. Bot., 53, 7, pp. 687-693, 1966.
129. PAULET, P.- Rev. gén. Bot., 72, 859, pp. 697-788, 1965.
130. PAULET, P., J.P. NITSCH.- C.R. Acad. Sci., Paris, 258, 24, pp. 5952-5955, 1964.
131. PAULET, P., J.P. NITSCH.- Ann. Physiol. vég., INRA, 6, pp. 333-345, 1964.

132. PAULIN, A., R. ULRICH.- Rev. gén. Bot., 73, 871, pp. 749-764, 1966.
133. PONTOVICH, V.E.- Fiziol. Rasten., 6, 3, pp. 303-311, 1959.
134. PURI, P.- Phytomorphology, 14, 4, pp. 564-573, 1964.
135. RABECHAULT, H.- Recherches sur la floraison des chrysanthèmes - Application de la méthode de culture des boutons isolés - Causerie de Physiologie Végétale - Le Phytotron (CNRS), Gif-s-Yvette, 3 avril 1960.
136. RABECHAULT, H.- Chrysanthème, Lyon, 68ème ann., 369, pp. 21-26, 1965.
137. RAGHAVAN, V.- Amer. J. Bot., 48, pp. 870-876, 1961.
138. RAGHAVAN, V., W.P. JACOBS.- Amer. J. Bot., 48, pp. 751-760, 1961.
139. RANGA SWAMY, H.S.- Experientia, 14, 3, pp. 111-112, 1958.
140. RAU, ANATASWAMY, M.- Phytomorphology, 6, p. 90, 1956.
141. RODRIGUES PEREIRA, A.S.- Science, U.S.A., 134, pp. 2044-2045, 1961.
142. ROSSINI, L.M.E., J.P. NITSCH.- C.R. Acad. Sci., Paris, 263, pp. 1379-1382, 1966.
143. SACHAR, R.C., B. BALDEV.- Current Sci., 27, 3, pp. 104-105, 1958.
144. SACHAR, R.C., KUSUM KANTA.- Phytomorphology, 8, 1-2, pp. 202-218, 1958.
145. SACHAR, R.C., MANJU KAPOOR.- Naturwissenschaften, 45, 22, pp. 552-553, 1958.
146. SACHAR, R.C., C.D. IYER.- Phytomorphology, 9, 1, pp. 1-3, 1959.
147. SALED, Ahmed Siddiqui.- Naturwissenschaften, 51, 21, p. 517, 1964.
148. SCHAEVERBEKE, J.- C.R. Acad. Sci., Paris, 249, 3, pp. 444-446, 1959.
149. SCHAEVERBEKE, J.- C.R. Acad. Sci., Paris, 260, 17, pp. 4580-4582, 1965.
150. SCHAEVERBEKE, J.- C.R. Acad. Sci., Paris, 261, 4, pp. 1081-1084, 1965.
151. PHUEL, R.W.- Canad. J. Bot., 37, 6, pp. 1167-1180, 1959.

152. SIEGELMAN, H.W.- Proc. Amer. Soc. hort. Sci., 59, pp. 496-500, 1952.
153. SINNOT, E.W.- Plant morphogenesis, Mc Graw Hill, New-York, 1960.
154. SIPRA GUHA, S.C. MAHESHWARI.- Nature, G.B., 204, 4957, p. 497, 1964.
155. SKOOG, F.- Année biol., 31, pp. 201-213, 1955.
156. SKOOG, F., C. TSUI.- Amer. J. Bot., 35, pp. 782-787, 1948.
157. SPARROW, A.H., V. POND, S. KOJANS.- Amer. J. Bot., 42, p. 384, 1955.
158. TCHAILAKIAN, M. Kh., R.G. BUTENKO.- Dokl. Akad. Nauk S.S.S.R., 129, 1, pp. 224-227, 1959.
159. TEPFER, S.S.- Proc. int. Conf. Plant Tissue Cult., Penn. State Univ., U.S.A. 1963, pp. 287-295, 1965.
160. TEPFER, S.S., R.I., GREYSON, J.L. HINDMAN.- Amer. J. Bot., 49, p. 657, 1962.
161. TEPFER, S.S., R.I. GREYSON, W.R. CRAIG, J.L. HINDMAN.- Amer. J. Bot., 50, 10, pp. 1035-1045, 1963.
162. TEPFER, M.S.S., M.A.S. KARPOFF.- Effets des substances de croissance sur le développement d'ébauches florales d'Aquilegia cultivées in vitro.-Bull. Soc. Fr. Physiol. vég., 11, 3, pp. 226-232, 1965.
163. TOPONI, M.- C.R. Acad. Sci., Paris, 250, 13, pp. 2439-2441, 1960.
164. ULRICH, R., A. PAULIN.- Rev. gén. Bot., 64, 757, pp. 93-105, 1957.
165. VASIL, I.K.- Phytomorphology, 7, p. 136, 1957.
166. VASIL, I.K.- J. exper. Bot., 30, pp. 399-408, 1959.
167. VASIL, I.K.- Science, U.S.A., 129, 3361, pp. 1487-1488, 1959.
168. VASIL, I.K., A.C. HILDEBRANDT, A.J. RIKER.- Science, U.S.A., 146, 3640, pp. 76-77, 1964.
169. WHITE, P.R.- Protoplasma, 19, pp. 97-116, 1933.
170. WOLTZ, S.S.- Proc. Fla. State hort. Soc., 78, pp. 415-417, 1966.
171. YAMADA, T.- Kromosomo, 55/56, pp. 1856-1859, 1963.

172. ZANONI, G.- Atti Accad. ligure Sci. Lett., 13, 1, 1956.

FLORAIISON DU CHRYSANTHEME.

173. ANDREWS, P.S., D.P. WATSON.- Proc. Amer. Soc. hort. Sci., 59, pp. 516-522, 1952.

174. BEACH, R.G., A.C. LEOPOLD.- Proc. Amer. Soc. hort. Sci., 61, pp. 543-547, 1953.

175. BORTHWICK, H.A., H.M. CATHEY.- Bot. Gaz., 123, pp. 155-162, 1962.

176. CARBONNEAU, M.L.- Diss. Abstr., U.S.A., 24, 11, p. 4336, 1964.

177. CATHEY, H.M.- Proc. Amer. Soc. hort. Sci., 64, pp. 483-491, 1954.

178. CATHEY, H.M.- Proc. Amer. Soc. hort. Sci., 64, pp. 492-498, 1954.

179. CATHEY, H.M.- Proc. Amer. Soc. hort. Sci., 64, pp. 499-502, 1954.

180. CATHEY, H.M.- Diss. Abstr., U.S.A., 15, pp. 2375-2376, 1955.

181. CATHEY, H.M.- N.Y. St Flower Grs, n° 119, pp. 1-4, 1955.

182. CATHEY, H.M.- Proc. Amer. Soc. hort. Sci., 69, pp. 485-491, 1957.

183. CATHEY, H.M., H.A. BORTHWICK.- Bot. Gaz., 119, pp. 71-76, 1957.

184. CATHEY, H.M., H.A. BORTHWICK.- Proc. Amer. Soc. hort. Sci., 78, pp. 545-552, 1961.

185. CATHEY, H.M., H.A. BORTHWICK.- Bot. Gaz., 125, 4, pp. 232-236, 1964.

186. CHAN, A.P.- Proc. Amer. Soc. hort. Sci., 55, pp. 461-466, 1950.

187. CHOUARD, P.- C.R. Acad. Agric. Fr., 124, pp. 312-317, 1938.

188. CHOUARD, P.- C.R. Soc. Biol., 127, pp. 66-67, 1938.

189. CHOUARD, P., P. VAIDIE.- C.R. Acad. Sci., Paris, 207, pp. 1444-1446, 1938.

190. CHOUARD, P.- Chrysanthème, Lyon, 51, pp. 11-13, 1947.

191. CHOUARD, P.- Bull. Soc. bot. Fr., Mém., 96, pp. 106-146, 1949.

192. CHOUARD, P.- Bull. Soc. bot. Fr., 102, 3-4, pp. 128-129, 1955.

193. CHOUARD, P.- Bull. Soc. bot. Fr., 105, 3-4, pp. 135-136, 1958.
194. CHOUARD, P.- Bull. Soc. bot. Fr., 109, 9, pp. 219-241, 1962.
195. COCHIS, Th., W.D. KIMBROUGH.- Proc. Amer. Soc. hort. Sci., 82, pp. 485-489, 1963.
196. DOOREMBOS, J., A.M. KOFRANEK.- Proc. Amer. Soc. hort. Sci., 61, pp. 555-558, 1953.
197. DOOREMBOS, J.- Meded. Dir. Tuinb., 22, pp. 19-27, 1959.
198. DUFFETT, W.E.- Flor. Exch., 128, 17, p. 49, 51, 1957.
199. EMSWELLER, S.L., N.W. STUART, J.W. BYRNES.- Bull. Chrysanth. Soc., 9, pp. 19-20, 1941.
200. FLINT, L.H., E.O. Mc ALISTER.- Smithson misc. Coll., 94, 5, pp. 1-11, 1935.
201. FURUTA, T.- Proc. Amer. hort. Soc. Sci., 63, pp. 457-461, 1954.
202. FURUTA, T., C. KIPLINGER.- Proc. Amer. Soc. hort. Sci., 66, pp. 383-385, 1955.
203. HARADA, H.- Etude des substances naturelles de croissance en relation avec la floraison. Isolement d'une substance de montaison - Thèse Doc. es. sci., Fac. Sci., 106 p., Paris, 1962.
204. HOLLEY, W.D.- Plants and Gard., 1, pp. 163-164, 1945.
205. KIPLINGER, D.C., J. ALGER.- Proc. Amer. Soc. hort. Sci., 52, pp. 478-480, 1948.
206. LACEY, D.B.- Thesis, Cornell University, 1951.
207. LAURIE, A.- Proc. Amer. Soc. hort. Sci., 27, pp. 319-322, 1930.
208. LOVE, J.W.- Diss. Abstr., U.S.A., 24, 1, pp. 17-18, 1963.
209. MASON, D.T., D. VINCE.- Int. hort. Congr. 15. 1958. Nice. Adv. hort. Sci. II, pp. 374-383, 1962.
210. MASTALERZ, J.W., F.G. CAMPBELL.- Proc. Amer. Soc. hort. Sci., 68, pp. 511-517, 1956.
211. MILLER, R.O., D.C. KIPLINGER.- Ohio Agric. Expt. Stat. Res. C. 109, 18 p., aug. 1962.
212. MOSKOV, B.S.- Bull. appl. Bot., Genet. and Plant Breed. URSS, 17, pp. 25-30, 1935.

213. MOSKOV, B.S.- Trudy prikl. Bot. Genet. i Selekcii, ser. A, 19, pp. 107-126, 1956.
214. MOSKOV, B.S.- Trudy prikl. Bot. Genet. i Selekcii, ser. A, 21, pp. 145-156, 1937.
215. OKADA, M.- J. hort. Ass. Japan, 23, pp. 187-192, 1954.
216. POLSCH, G.H.- Proc. Amer. Soc. hort. Sci., 29, pp. 540-543, 1932.
217. POST, K.- Proc. Amer. Soc. hort. Sci., 28, pp. 382-388, 1931.
218. POST, K.- Cornell Univ. Agric. Expt. Stat. Bull. 594, 1934.
219. POST, K.- Proc. Amer. Soc. hort. Sci., 37, pp. 1003-1006, 1939.
220. POST, K.- Univ. Agric. Expt. Stat., Bull. 787, 1942.
221. POST, K.- Proc. Amer. Soc. hort. Sci., 49, pp. 417-419, 1947.
222. POST, K.- Proc. Amer. Soc. hort. Sci., 55, pp. 475-476, 1950.
223. POST, K., H. KAMEMOTO.- Proc. Amer. Soc. hort. Sci., 55, pp. 477-482, 1950.
224. POST, K., H. KAMEMOTO.- Proc. Amer. Soc. hort. Sci., 55, pp. 473-474, 1950.
225. POST, K., D.B. LACEY.- New-York State Flower Grower's Bull., 70, pp. 2-4, 1951.
226. POWEL, D.N., R.C. ANDREASEN.- Proc. Amer. Soc. hort. Sci., 70, pp. 482-489, 1957.
227. RABECHAULT, H.- Compte-rendus d'activité au Laboratoire du Phytotron. C.R. au Comité de Direction du Phytotron C.N.R.S., Gif-s-Yvette, Paris, 1959, 1960, 1961, 1962.
228. RABECHAULT, H., P. CHOUARD.- Bull. Soc. bot. Fr. (sous presse).
229. REISH, K.W., D.C. KIPLINGER.- Proc. Amer. Soc. hort. Sci., 72, pp. 498-502, 1958.
230. SACHS, R.M., A.M. KOFRANEK.- Amer. J. Bot., 50, 8, pp. 772-779, 1963.
231. SAMMAN, Y.- Bull. N.Y. St. Flower Grs., 152, pp. 2-3, 1958.
232. SAMMAN, Y., R.W. LANGHANS.- Int. hort. Congr. 15. 1958. Nice, Adv. hort. Sci., II, p. 400, 1962.

233. SCHWABE, W.W.- J. exp. Bot., 1, pp. 329-343, 1950.
234. SCHWABE, W.W.- J. exp. Bot., 2, pp. 223-237, 1951.
235. SCHWABE, W.W.- J. exp. Bot., 3, 9, pp. 430-436, 1952.
236. SCHWABE, W.W.- J. exp. Bot., 5, pp. 389-400, 1954.
237. SCHWABE, W.W.- Nature, G.B., 174, 4439, p. 1022, 1954.
238. SCHWABE, W.W.- J. exp. Bot., 6, 18, pp. 435-450, 1955.
239. SCHWABE, W.W.- The study of plant environment in controlled environment - in "Hudson J.P. - Control of the plant environment, Butterworths sci. publ. London, pp. 16-35, 1957.
240. SCHWABE, W.W.- J. exp. Bot., 8, pp. 220-234, 1957.
241. SCHWABE, W.W.- J. linn. Soc. Lond., Bot., 56, 566, pp. 254-265, 1959.
242. STUART, N.W.- Proc. Amer. Soc. hort. Sci., 42, pp. 605-606, 1943.
243. TCHAILAKIAN, M.H.- Dokl. Akad. Nauk S.S.S.R., 1, pp. 89-93, 1936.
244. TCHAILAKIAN, M.H.- Publ. Acad. Sci. U.R.S.S., Moscow, 1937.
245. VINCE, D., D.T. MASON.- Nature, G.B., 174, 4435, pp. 842-843, 1954.
246. VINCE, D.- J. hort. Sci., 30, 1, pp. 34-42, 1955.
247. VINCE, D., D.T. MASON.- J. hort. Sci., 32, 3, pp. 186-194, 1957.
248. VINCE, D., D.T. MASON.- J. hort. Sci., 34, 4, pp. 199-209, 1959.
249. VINCE, D.- J. hort. Sci., 35, 3, pp. 161-175, 1960.
250. WATSON, D.P., P.S. ANDREWS.- Proc. Amer. Soc. hort. Sci., 61, pp. 551-554, 1953.
251. WAXMAN, S., W.H. FRIEND, E.L. METCALF.- Int. hort. Congr., 16, Bruxelles, 4, pp. 237-242, 1962.
252. WIDMER, R.E.- Proc. Amer. Soc. hort. Sci., 71, pp. 537-546, 1958.



#### FLORAIISON A L'OBSCURITE.

- 253. BALDEV, D.- Phytomorphology, 9, pp. 316-319, 1960.
- 254. LEOPOLD, A.C.- Plant Physiol., 24, pp. 530-533, 1949.
- 255. LONA, F.- Nuovo G. bot. ital., 56, pp. 559-562, 1948.
- 256. MELCHERS, G.- Der Züchter, 14, 8, pp. 177-182, 1942.
- 257. TASHIMA, Y.- Proc. Imp. Acad. Jap., 29, 6, pp. 271-273, 1953.
- 258. TASHIMA, Y., S. IMAMURA.- Proc. Imp. Acad. Jap., 29, pp. 581-585, 1953.
- 259. WELLENSIEK, S.J.- Kkl. Nederl. Akad. Wet., Proc., ser. C, 63, 2, pp. 155-158, 1960.

#### EFFETS DE LA GIBBERELLINE SUR LA FLORAIISON DU CHRYSANTHEME.

- 260. APPLEGATE, H.G.- Bot. Gaz., 119, 2, pp. 76-78, 1957.
- 261. APPLEGATE, H.G.- Bot. Gaz., 120, pp. 39-43, 1958.
- 262. ATAL, C.K.- Curr. Sci., 28, 10, pp. 408-409, 1959.
- 263. BARBAT, I., C. OCHESANU.- Naturwissenschaften, 51, 13, pp. 316-317, 1964.
- 264. BRIAN, P.W., H.G. HEMMING, M.A. RADLEY.- Physiol. Plant., 8, pp. 899-912, 1955.
- 265. BRIAN, P.W.- Effects of gibberellins on plant growth and development - Biol. Rev., 34, 1, pp. 37-84, 1959.
- 266. BRIAN, P.W.- Les gibberellines : un nouveau groupe d'hormones végétales - Bull. Soc. fr. Physiol. vég., 6, pp. 107-117, 1960.
- 267. BRULFERT, J.- C.R. Acad. Sci., Paris, 253, pp. 517-519, 1961.
- 268. CATHEY, H.M., N.W. STUART.- Proc. Amer. Soc. hort. Sci., 71, pp. 547-554, 1958.
- 269. CHOUARD, P.- Bull. Soc. bot. Fr., Mém. 1956-1957, pp. 51-64, 1958.
- 270. CHOUARD, P.- Les gibbérellines, nouveaux facteurs de croissance des plantes à fleurs - Rev. hort., 130, 2222, pp. 1792-1803, 1958.

271. GRAY, R.A.- Amer. J. Bot., 44, 8, pp. 674-682, 1957.
272. HARADA, H.- Changes in endogenous growth during flower development and effects of synthetic substances on flowering - Master's thesis, Cornell Univ., U.S.A., 119 p., 1958.
273. HARADA, H.- Ann. Physiol. vég., 2, pp. 249-254, 1960.
274. HARADA, H., J.P. NITSCH.- Science, U.S.A., 129, pp. 777-778, 1959.
275. HARADA, H., J.P. NITSCH.- Plant Physiol., 34, 4, pp. 409-415, 1959.
276. HARADA, H., J.P. NITSCH.- Ann. Physiol. vég., 3, pp. 193-208, 1961.
277. HARADA, H.- Etude des substances naturelles de croissance en relation avec la floraison. Isolement d'une substance de montaison - Thèse Doc. ès-Sci. Univ., Paris, 106 p., 1962.
278. KATO, J.- Mem. Coll. Sci., Kyoto, ser. B, 20, pp. 189-193, 1953.
279. KATO, J. Physiological action of gibberellin with special reference to auxin in "Plant growth regulation", The Iowa Univ. Press Ames, Iowa, pp. 601-609, 1961.
280. KOHL, H.C., A.M. KOFRANEK.- Calif. Agric., 11, 5, p. 8, 1957.
281. LANG, A.- Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A., 43, 8, pp. 709-717, 1957.
282. LANG, A.- The gibberellins and their role in plant growth and development - Colloque International sur le Photothermopériodisme. Action des diverses radiations, des gibbérellines et de quelques autres substances. Parma (Italia), U.I.S.B. Publ. n° 34, sér. B, pp. 55-73, 1957.
283. LERT, P.J.- Calif. Agric., 13, 4, p. 4, 1959.
284. NITSCH, J.P., C. NITSCH.- Bull. Soc. bot. Fr., 108, 9, pp. 349-362, 1962.
285. NJOKU, J.- Nature, G.B., 182, 4642, pp. 1097-1098, 1958.
286. SACHS, R.M., A.M. KOFRANEK.- Amer. J. Bot., 51, 6, part. 2, p. 663, 1964.
287. STUART, N.W., H.M. CATHEY.- Int. hort. Congr. 15. 1958. Nice. Adv. hort. Sci., II, pp. 391-399, 1962.
288. TCHAILAKIAN, M. Kh.- Bot. Zh., 43, 7, pp. 927-952, 1958.

289. TRONCHET, A., J. TRONCHET, J.P. PERNET.- C.R. Acad. Sci., Paris, 250, 7, pp. 1328-1330, 1960.

290. WEST, C.A., B.O. PHINNEY.- Plant Physiol., 31, 20, 1956.

OUVRAGES GENERAUX SUR LES METHODES DE CULTURE DES TISSUS.

291. GAUTHERET, R.J.- La culture des tissus végétaux. Techniques et réalisations. Masson, Paris, 829 p., 1959.

292. HELLER, R.- Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés "in vitro" - Ann. Sci. nat., 11e sér. Bot. et Biol. vég., XIV, pp. 1-219, 1953.

293. KOFLER, L.- Contribution à l'étude biologique des mousses cultivées "in vitro" : Germination des spores, croissance et développement du protonéma chez *Funaria hygrometrica* - Rev. bryol. et lichen, 28, fasc. 1-2, pp. 1-202, 1958.

294. MOREL, G.- La culture "in vitro" du méristème apical de la tige - Bull. Soc. Physiol. vég., 11, 3, pp. 213-224, 1965.

295. MOREL, G.- Nouvelles méthodes permettant de réaliser des cultures de tissus végétaux - Rev. gén. Bot., 63, pp. 314-325, 1956.

296. MOREL, G.- Rev. Cytol. Cyto-physiol. vég., 27, 2-3-4, pp. 307-314, 1964.

297. NARAYANASWAMI, S., K. NORSTOG.- Plant embryo culture - Bot. Rev., 30, 4, pp. 587-628, 1964.

298. NEKRASOVA, T.V.- Fiziol. Rasten, 11, 1, pp. 127-134, 1964.

299. PILET, P.E.- Les Phytohormones de croissance, Masson, Paris, 774 p., 1961.

300. RAPPAPORT, J.- Bot. Rev., 20, 4, pp. 201-205, 1954.

301. WETMORE, R.H.- Int. Bot. Congr. 7. 1950. pp. 369-370, 1950.

302. WETMORE, R.H., WARDLAW.- Rev. Plant Physiol., 2, pp. 269-292, 1951.

303. WHITE, P.R.- Cultivation of animal and plant cells, Ronald Press Co Ed., New-York, 239 p., 1954.

MILIEUX DE CULTURE : a. SUBSTANCES MINERALES.

304. ALLERTON, F.- Gardner's Chron., 141, p. 515, 1957.
305. ARNON, D.I.- Growth and function as criteria in determining the essential nature of inorganic nutrients in mineral nutrition of plants. Ed. by Truog. Univ. of Wisconsin Press., 1955.
306. ASEN, S., C.E. WILDON.- Quart. Bull. Michigan agric. Expt Stat., 36, 1, pp. 24-29, 1953.
307. ASEN, S., S.H. WITTWER, O.N. HINSVARK.- Proc. Amer. Soc. hort. Sci., 62, pp. 466-470, 1953.
308. ASEN, S., S.H. WITTWER, F.G. TEUDNER.- Proc. Amer. Soc. hort. Sci., 64, pp. 417-422, 1954.
309. BING, A.- Bull. N.Y. State Flower Grs., 127, pp. 2-4, 1956.
310. BUTTERFIELD, N.W.- Diss. Abstr., U.S.A., 16, p. 840, 1956.
311. CHKOLNIK, M.S., N.A. MAKAROVA, M.M. STECKLOVA, L.N. ESTAFIEVA.- Rev. gén. Bot., 64, p. 766, 1957.
312. CHOUARD, P.- Cultures sans sol - Maison Rustique, Paris, 200 p., 1952.
313. COMBES, R.- C.R. Acad. Sci., Paris, 200, p. 578, 1935.
314. COMBES, R.- C.R. Acad. Sci., Paris, 200, p.1970, 1935.
315. DUTTA, T.R., W.J. Mc ILRATH.- Bot. Gaz., 125, 2, pp. 89-96, 1964.
316. HARRISON, L.S., F.B. SALISBURY.- Plant Physiol., suppl. vol. 36, p.liii, 1961.
317. HEWITT, E.J.- Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Commonw. Bur. Hort., Techn. commun. 22, Maistone G.B., 241 p., 1952.
318. HICKMAN, D.D., J.R. KAMP.- Proc. Amer. Soc. hort. Sci., 58, pp. 333-342, 1951.
319. HILL, H., M.B. DAVIS, F.B. JOHNSON.- Sci. Agric., 15, pp. 110-124, 1934.
320. HOMES, M., ANSIAUX, J. VAN SCHOOR.- L'agriculture, Bruxelles, 1953.
321. KÖSTER, P.- Gartenwelt, 56, pp. 258-259, 1956.

322. LOERCHER, L., J.L. LIVERMAN.- Plant Physiol., 39, 5, pp. 720-725, 1964.
323. LUNT, O.R., B. KWATE.- Soil Sci ., 82, pp. 3-8, 1956.
324. LUNT, O.R., A.M. KOFRANEK.- Proc. Amer. Soc. hort. Sci., 72, pp. 487-497, 1958.
325. LUNT, O.R., J.J. OERTLI, H.C. KOHL.- Proc. Amer. Soc. hort. Sci., 75, pp. 676-687, 1960.
326. LUNT, O.R., A.M. KOFRANEK, J.J. OERTLI.- Flor. Exch. 140, 15, pp. 38-39, 66, 1963.
327. MAMELI-CALVINO, G.E.- Ann. Sper. agrar., 11, 3, Suppl. pp. CXCII - CCXXV, 1957.
328. MASTALERZ, J.W.- Proc. Amer. Soc. hort. Sci ., 65, pp. 483-492, 1955.
329. MESSING, J.H.L., O. OWEN.- Plant and Soil, 5, pp. 101-120, 1954.
330. PREVOT, P., J. BELEY, C. EGOUMENIDES, J. LEVY, A. LOUE, C. PINAZZI, M. PINTA, L. RICHARD, M. SERVANT.- Oléagineux, 16° ann., 4, pp. 241-245, 1961.
331. SALISBURY, F.B.- Plant Physiol., 34, 6, pp. 598-604, 1959.
332. TAYLOR, J.L.- Proc. Fla. St. hort. Soc., 71, pp. 425-429, 1958-1959.
333. TCHAIT, F.R.- Kultura rastitielnik tkanei - 11. 1949, 77, 6, 1958.
334. TEZUKA, Y.- I. Bot. Mag., Tokyo, 71, 839, pp. 181-186, 1958.
335. TEZUKA, Y.- II. Bot. Mag., Tokyo, 72, 849, pp. 101-107, 1959.
336. TRUOG, E. et al.- Mineral nutrition of plants. Univ. Wisconsin Press, 469 p., 1951.
337. TRUOG, E.- Soil as medium for plant growth in mineral nutrition of plants. Univ. Wisconsin Press, 1953.
338. WOLTZ, S.S.- Proc. Fla. St. hort. Soc ., 69, pp. 352-356, 1956-1957.

MILIEUX DE CULTURE : b. SUBSTANCES ORGANIQUES.

339. DUGGER, W.M., T.E. HUMPHREYS.- Plant Physiol., 35, 4, pp. 523-530, 1960.
340. DUTTA, T.R., W.J. Mc ILRATH.- Bot. Gaz., 125, 2, pp. 89-96, 1964.
341. FILIPPOV, V.V.- Bjull. Glavn. Bot. Sada, S.S.S.R., 33, pp. 94-101, 1959.
342. KASINATHAN, S., S. RAMAKRISHNAN, B. SRINIVASAN.- Curr. Sci., 34, 7, p. 211, 1965.
343. KAZARJAN, V.O., E.S. AVUNDZAJAN, K.A. KARAPETJAN.- Dokl. Akad. Nauk Armen. SSR., 30, pp. 125-128, 1960.
344. KOFLER, L.- Bull. Soc. fr. Physiol. vég., 5, 2, pp. 57-58, 1959.
345. RIETSEMA, J., S. SATINA, A.F. BLAKESLEE.- Amer. J. Bot., 40, 1953.
346. WEISER, C.J., L.T. BLANEY, P. LI.- Physiol. Plant., 39, 3, pp. 589-599, 1964.
347. WOLTZ, S.S.- Plant Physiol., 38, 1, pp. 93-99, 1963.

DISCUSSION : ORANOGENESE - PHYSIOLOGIE DE LA FLEUR.

348. EMBERGER, L.- Bull. Soc. bot. Fr., Mém., pp. 1-24, 1964.
349. ERICKSON, R.O.- Nature, G.B., 159, 4034, pp. 275-276, 1947.
350. FORMAN, M., W.A. JENSEN.- Plant Physiol., 40, 4, pp. 765-769, 1965.
351. FULLER, H.J., S.L. WILSON.- Science, U.S.A., 116, 3025, pp. 688-689, 1952.
352. GRIESEL, W.O., J.B. BIALE.- Amer. J. Bot., 45, 9, pp. 660-663, 1958.
353. HILDEBRAND, F.- Verh. Leop. Carol. Acad., XXXV, 1869.
354. HOLM, T.- Amer. Midl. Nat., 10, pp. 1-17, 1926.
355. KRUSHILIN, A.S.- Bot. Zh., 47, 3, pp. 301-316, 1962.
356. LANCE, A.- C.R. Acad. Sci., Paris, 239, pp. 80-82, 1954.

357. LANCE, A.- C.R. Acad. Sci., Paris, 239, p. 1238, 1954.
358. LANCE, A.- Ann. Sci. nat., 11<sup>e</sup> sér. Bot., XVIII, pp. 91-421, 1957.
359. LIORET, C.- La respiration des végétaux - In : Probl. Métabol. Resp. Oxyd. Cell. - Exposés actuels Biol. Cell., Masson, Paris, pp. 205-219, 1963.
360. MARESQUELLE, H.J.- Bull. Soc. Bot. Fr., Mém., p. 117, 1961.
361. MARESQUELLE, H.J.- Sur la filiation des inflorescences II - In : Travaux dédiés à L. Plantefol, Masson, Paris, pp. 437-446, 1965.
362. MARESQUELLE, H.J.- Bull. Soc. Bot. Fr., Mém., pp. 93-95, 1964.
363. MARESQUELLE, H.J.- Bull. Soc. Bot. Fr., Mém., pp. 96-100, 1964.
364. NOUGAREDE, A.- Organisation et fonctionnement du méristème apical des végétaux vasculaires - In : Travaux dédiés à L. Plantefol, Masson, Paris, pp. 171-340, 1965.
365. PECHOUTRE, F.- Biologie florale - Encyclopédie Scientifique, Doin, Paris, 369 p., 1909.
366. PLANTEFOL, L.- La théorie des hélices foliaires multiples. Fondement d'une théorie phyllotaxique nouvelle. Masson, Paris, 154 p., 1949.
367. PLANTEFOL, L.- L'ontogénie de la fleur. Fondements d'une théorie florale nouvelle. Masson, Paris, 186 p., 1949.
368. PLANTEFOL, L.- Bull. Soc. Bot. Fr., Mém., pp. 3-14, 1962.
369. POPHAM, R.A., A.P. CHAN.- Amer. J. Bot. 37, 6, pp. 476-484, 1950.
370. SIEGELMAN, H.W., C.T. CHOW, J.B. BIALE.- Plant Physiol., 33, 6, pp. 403-409, 1958.
371. SMALL, J.- New Phytol., 18, pp. 201-234, 1919.
372. TCHAILAKIAN, M. Kh., N.P. AKSENOVA.- Fiziol. Rasten., 6, 6, pp. 699-708, 1959.
373. TCHAILAKIAN, M. Kh.- Izv. Akad. Nauk S.S.S.R., sér. Biol., 2, pp. 206-229, 1960.
374. ULRICH, R.- La vie des fruits, Masson, Paris, 369 p., 1952.
375. ULRICH, R.- Données physiologiques sur les fleurs et les fruits - In : Travaux dédiés à L. Plantefol, Masson, Paris, pp. 457-464, 1965.

376. UEXKULL-GYLLENBRAND.- Bibliot. botan., LII, 1901.

377. ZANONI, G.- Atti Accad. ligure Sci. Lett., 13, 1, 1957.

EFFETS DES SUCRES, DE LA PRESSION OSMOTIQUE ET DE LA TENUEUR EN EAU.

378. AARTS, F.F.T.- Kkl. nederl. Akad. Wet., Proc., sér. C., 61, 3, pp. 325-333, 1958.

379. BELYNSKAJA, E.V.- Bjull. Glavn. Bot. Sada, S.S.S.R., 53, pp. 47-52, 1964.

380. BOUILLENNE, R.- Importance du facteur eau dans la mise à fleurs chez certaines espèces végétales - In : Travaux dédiés à L. Plantefol, Masson, Paris, pp. 125-146, 1965.

381. BOUILLENNE, M., R. BOUILLENNE.- Ann. Physiol. Physico chim. biol., 4, p. 426, 1926.

382. BOUILLENNE, R., F. DEMARET.- Ann. Physiol., 11, 5, Paris, 1935.

383. BOUILLENNE, R., M. BOUILLENNE.- Bull. Acad. r. Belg., Cl. Sci., 5ème sér., 17, n° 7, 1931.

384. BOUILLENNE, R., M. BOUILLENNE, L. GHENNE.- C.R. Séanc. Soc. Biol. Belge, 114, p. 183, 1933.

385. BRONCHART, R.- Mém. Soc. r. Sci. Liège, 5ème sér., 7, fasc. 2, 1963.

386. COMBES, R.- C.R. Acad. Sci., Paris, 203, p. 1282, 1936.

387. DICK, D.A.T.- Int. Rev. Cytol., 8, pp. 387-448, 1959.

388. DURANION, H., R. SHANTZ, J.G. KIENZ.- Bull. Soc. Fr. Physiol. vég., 10, 3, pp. 186-194, 1965.

389. EATON, F.M., D.R. ERGLE.- Plant Physiol., 23, 2, pp. 169-187, 1948.

390. JAVAUX, P.- Influence du facteur eau sur la croissance et le développement de *Salvia splendens* - Thèse licence - Univ. Liège, 1958.

391. JUHREN, M.C., F.V. WENT.- Amer. J. Bot., 36, pp. 552-559, 1949.

392. LONA, F.- Ist. Lombardo Sci. Lett. R.C., Cl. Sci. mat. nat., 83, pp. 95-116, 1950.

393. MATHUR, S.N.- Plant Physiol., 6, 2, pp. 123-128, 1963.



394. MAYER, A., L. PLANTÉPOL.- Ann. Physiol. Physico-chim. biol., 1, 1925.
395. PLANTÉPOL, L.- Ann. Sci. nat., 10ème sér., Bot., 9, p.1-269, 1927.
396. STEINBERG, R.A.- Amer. J. Bot., 37, pp. 547-551, 1950 .
397. TCHAILAKIAN, M.K.- Dokl. Akad. Nauk S.S.S.R., 100, 2, pp. 373-376, 1955.
398. WENT, F.W., M. CARTER.- Amer. J. Bot., 35, pp. 95-106, 1948.
399. WIGGANS, S.C., F.P. GARDNER.- Agron. J., 51, 6, pp. 315-318, 1959.

#### EFFETS DES AUXINES.

400. ASTIE, M.- C.R. Acad. Sci., Paris, 245, 26, pp. 2531-2533, 1957.
401. AUDUS, L.J.- Plant growth substances. - 2nd ed. Intersci. Publ., New-York, 553 p., 1963.
402. BONNER, J., J. THURLOW.- Bot. Gaz., 110, pp. 613-624, 1949.
403. BONNER, J., R.S. BANDURSKI.- Ann. Rev. Plant Physiol., 3, pp. 59-86, 1952.
404. CHOUARD, P.- Bull. Soc. bot. Fr., 85, pp. 546-555, 1938.
405. GALSTON, A.W., M.E. HAND.- Amer. J. Bot., 36, pp. 85-94, 1949.
406. GALUN, E.- Physiol. Plant., 12, p. 48, 1949.
407. GREEN, M., H.J. FULLER.- Science, U.S.A., 108, pp. 405-416, 1948.
408. HAMNER, K.C., K.K. NANDA.- Bot. Gaz., 118, pp. 13-18, 1956.
409. HESLOP-HARRISON, J.- J. linn. Soc. Lond., Bot., 56, 366, pp. 269-281, 1959.
410. HUMPHREYS, T.M., W.M. DUGGER.- Plant Physiol., 32, 6, pp. 530-536, 1957.
411. LEOPOLD, A.C., K.V. THIMANN.- Amer. J. Bot., 36, pp. 342-347, 1949.
412. LEOPOLD, A.C.- Auxin and plant growth - Univ. of California Press., Berkeley, 1955.

413. MARRE', E.- Atti Accad. ligure Sci. Lett., 8, pp. 337-345, 1952.
414. SKOOG, F., Ch. TSUI.- Amer. J. Bot., 35, pp. 782-787, 1948.
415. THURLOW, J., J. BONNER.- Amer. J. Bot., 34, p. 603, 1947.
416. TSUKAMOTO, Y., T. HARADA.- J. hort. Ass. Japan, 26, pp. 54-58, 1957.

#### INHIBITEURS DE CROISSANCE.

417. BALLANTYNE, D.J.- Canad. J. Bot., 40, 9, pp. 1229-1235, 1962.
418. BEDESEM, P. Jr.- Bull. Torrey Bot. Club., 85, 6, pp. 434-472, 1958.
419. GALSTON, A.W.- Amer. J. Bot., 34, pp. 356-360, 1947.
420. KIERMAYER, O.- Naturwissenschaften, 46, 14, p. 457, 1959.
421. LIBBERT, E.- Planta, 53, 6, pp. 612-627, 1959.
422. SACHS, R.M., M.A. WOHLERS.- Amer. J. Bot., 51, 1, pp. 44-48, 1964.
423. ZIMMERMAN, P.W., A.E. HITCHCOCK.- Contr. Boyce Thompson Inst., 12, pp. 491-496, 1942.

#### EFFETS DE LA GIBBERELLINE.

424. APPELEGATE, H.G.- Bot. Gaz., 119, 2, pp. 76-78, 1957.
425. DIGBY, J., R.H. THOMAS, P.F. WARDING.- Nature, G.B., 203, 4944, pp. 547-548, 1964.
426. HENDERSON, J.H.M.- Nature, G.B., 182, 4639, p. 880, 1958.
427. LANG, A., R.M. SACHS, C. BRETZ.- Bull. Soc. Fr. Physiol. vég. 5, pp. 1-19, 1959.
428. SACHS, R.M., A. LANG.- Science, U.S.A., 125, pp. 1144-1145, 1957.
429. SACHS, R.M., C.F. BRETZ, A. LANG.- Exper. Cell Res., 18, pp. 230-244, 1959.

430. SACHS, R.M., C.F. BRETZ, A. LANG.- Amer. J. Bot., 46, pp. 376-384, 1959.
431. SACHS, R.M., A. LANG, C.F. BRETZ, J. ROACH.- Amer. J. Bot., 47, pp. 260-266, 1960.
432. SACHS, R.M., A. LANG.- Plant Growth regulation - The Iowa Univ. Press. Ames, Iowa, U.S.A., pp. 567-578, 1961.
433. SACHS, R.M., M.A. WOHLERS.- Amer. J. Bot. 51, 1, pp. 44-48, 1964.
434. SAITO, T., H. ITO.- Jap . Soc. hort. Sci. J., 32, 4, pp. 32-44, 1963.
435. VASIL, I.K.- Science, U.S.A., 126, 3286, pp. 1294-1295, 1957.
436. VASIL, I.K.- Phytomorphology, 7, 2, pp . 138-149, 1957.
437. WOLTZ, S.S.- Plant Physiol., 38, 1, pp. 93-99, 1963.

#### EFFETS DE LA KINETINE.

438. BEAUCHESNE, G.- Bull. Soc. Fr. Physiol. vég., 6, 3, pp. 146-157, 1960.
439. CODACCIONI, M.- C.R. Acad. Sci., Paris, 258, 18, pp. 4603-4606, 1964.
440. ENGELBRECHT, L., K. CONRAD.- Ber. Dtsch. Bot . Ges., 74, pp. 42-46, 1961.
441. ENGELBRECHT, L., K. MOTHES.- Plant Cell Physiol., 2, pp. 271-276, 1961.
442. GAUTHERET, R.J.- C.R. Acad. Sci ., Paris, 253, p. 1381, 1961.
443. HENDERSON, T.R., C.G. SKINNER, R.E. EAKIN.- Plant Physiol., 37, 4, pp. 552-555, 1962.
444. MILLER, C., F. SKOOG.- Amer. J. Bot., 40, pp. 768-773, 1953.
445. MILLER, C.O.- Plant Physiol., 31, pp. 318-319, 1956.
446. MOTHES, K.- Naturwissenschaften, 47, 15, pp. 337-351, 1960.
447. PATAU, K., N.K. DAS, F. SKOOG.- Physiol. Plant., 10, pp. 949-966, 1957.

448. PILET, P.E.- Rev. gén. Bot., 68, 805, pp. 345-359, 1961.
449. PILET, P.E.- Bull. Soc. bot. Suisse, 71, p. L 89, 1961.
450. SKOOG, F., C. TSUI.- Amer. J. Bot., 35, pp. 782-787, 1948.
451. SKOOG, F.- Année biol., 26, pp. 545-562, 1950.
452. SKOOG, F.- Brookhaven Symposia in Biology, 6, pp. 1-21, 1954.
453. SYONO, K., T. YAMAKI.- Sci. Pap. Coll. Gen. Educ. Univ. Tokyo, Biol. P.T., 13, 2, pp. 203-211, 1963.
454. TCHAILAKIAN, M. Kh., R.G. BUTENKO.- Dokl. Akad. Nauk S.S.S.R., 129, 1, pp. 224-227, 1959.
455. UDVARDY, J., M. HORVATH, L. DEZSI, G.L. FARKAS.- Experientia, 20, 4, pp. 214-215, 1964.
456. WICKSON, M., K.V. THIMANN.- Physiol. Plant., 2, pp. 62-74, 1958.
457. WITTEVER, S.H., R.R. DEDOLPH.- Amer. J. Bot., 50, 4, pp. 332-336, 1963.

#### REVERSIONS FLORALES.

458. ASTIÉ, M.L.- Bull. Soc. bot. Fr., 109, pp. 5-6, 1962.
459. BAILLAUD, L., Y. COURTOT, B. MILLET, M. MANGE.- Bull. Soc. bot. Fr., Mém., pp. 25-37, 1964.
460. BOIS.- Rev. hort., 107, p. 513, 1907.
461. BIDDULPH, O.- Bot. Gaz., 97, pp. 139-155, 1935.
462. BRULFERT, J.- C.R. Acad. Sci., Paris, 253, pp. 517-519, 1961.
463. BRULFERT, J.- C.R. Acad. Sci., Paris, 254, pp. 1475-1477, 1962.
464. BRULFERT, J.- Bull. Soc. bot. Fr., 110, pp. 138-140, 1963.
465. BRULFERT, J., P. CHOUARD.- C.R. Acad. Sci., Paris, 253, pp. 179-181, 1961.
466. BRULFERT, J.- Rev. gén. Bot., 72, 858, pp. 641-694, 1965.
467. CATARINO, F.- Portugaliae Acta Biol., sér. A, 41, 1, pp. 65-74, 1959.

468. CHOUARD, P.- C.R. Acad. Sci., Paris, 230, pp. 119-121, 1950.
469. CHOUARD, P.- C.R. Acad. Sci., Paris, 231, pp. 1245-1247, 1950.
470. CHOUARD, P.- C.R. Acad. Sci., Paris, 233, pp. 86-88, 1951.
471. CHOUARD, P.- Année biol., 28, pp. 7-8, 1952.
472. CHOUARD, P.- C.R. Acad. Sci., Paris, 245, pp. 2351-2353, 1957.
473. CHOUARD, P.- Rev. Pathol. gén. Physiol. clin. Fr. 58, 695, pp. 289-295, 1958.
474. CHOUARD, P.- Bull. Soc. bot. Fr., 109, 9, pp. 219-241, 1962.
475. GREULACH, V.- Bot. Gaz., 103, pp. 698-709, 1942.
476. HELM, J.- Flora, 143, pp. 486-491, 1956.
477. NOUGAREDE, A., P. RONDET.- Rev. Cytol. Biol. vég. Fr., 25, 3-4, pp. 209-240, 1962.
478. PENZIG.- C.R. Acad. Sci., Paris, mars 1903.
479. PENZIG.- La Tératologie des plantes, 2ème éd., 11, p. 497, 1921.
480. TRINKLER, Ju.G.- Fiziol. Rasten, 6, 3, pp. 372-375, 1959.
481. Anonyme.- Gardener's Chronicle, 3ème sér., 6, p. 602, 1889.

P L A N C H E S

P l a n c h e   I   -

Matériel pour la préparation et la mise en culture des boutons  
floraux (explications dans le texte).

---

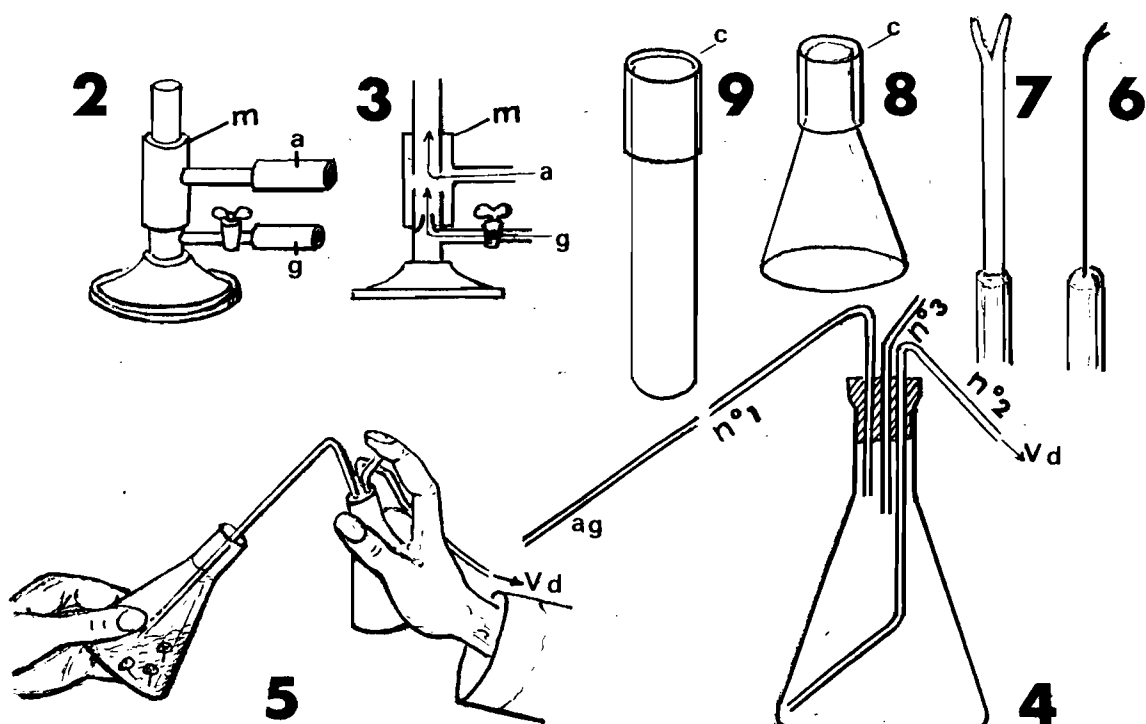
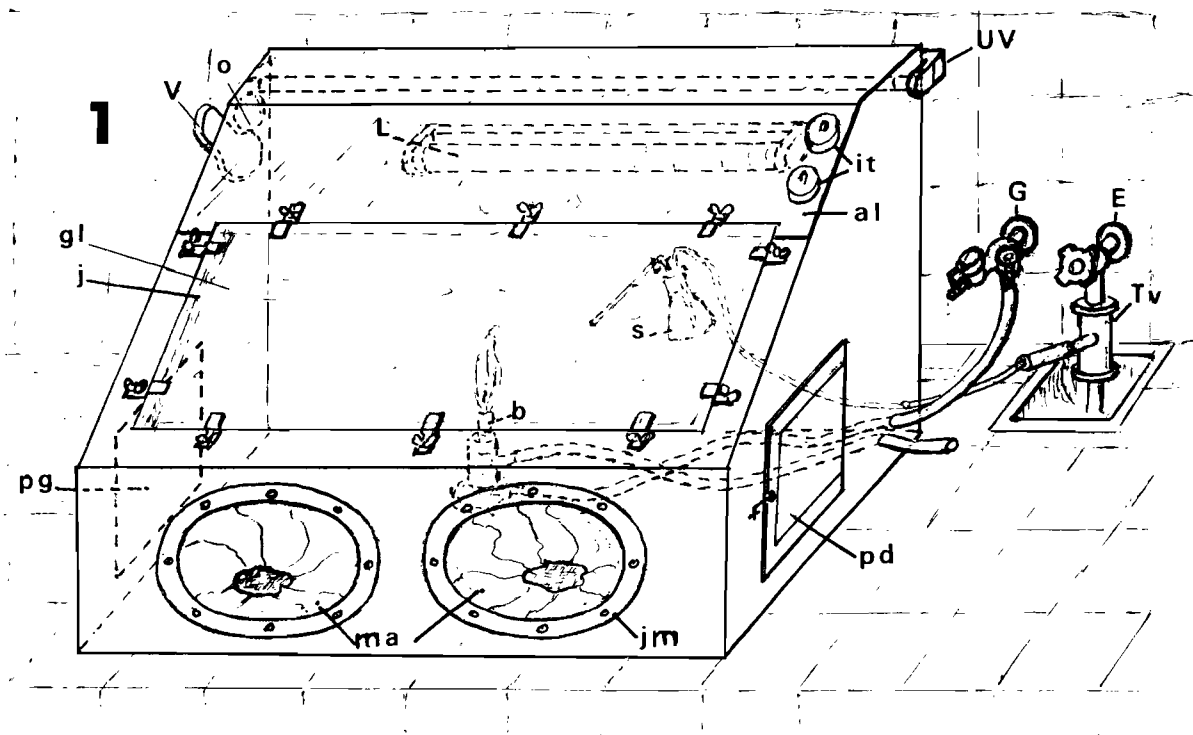


Planche I



Effets comparés de milieux à base de solution minérale de Knop  
et de solution minérale F après 55 jours de culture.

Fig. 1 à 3, exemples de boutons floraux développés sur milieu de Knop additionné de 30 % de saccharose, le cal à la base du pédoncule est très souvent digité, peu ou pas de floraison, fleurons anormaux ; Fig. 4 à 6, boutons floraux développés sur milieu de Knop + 80 % de saccharose ; Fig. 7, lorsqu'un bouton floral arrive à se développer sur Knop + 80 % de saccharose, il est en général anormal, quelques fleurons femelles ligulés ou épanouis ; Fig. 8 et 9, boutons floraux développés sur milieu F additionné de 30 % de saccharose, on observe un grand allongement du pédoncule et des réversions florales ; Fig. 10 à 12, boutons floraux développés sur milieu de Knop additionné de 80 % de saccharose, le cal est développé à la base du pédoncule, on obtient le maximum de floraison et encore beaucoup de fleurs sont anormales, les fleurons du centre (hermaphrodites) ne se développent pas.

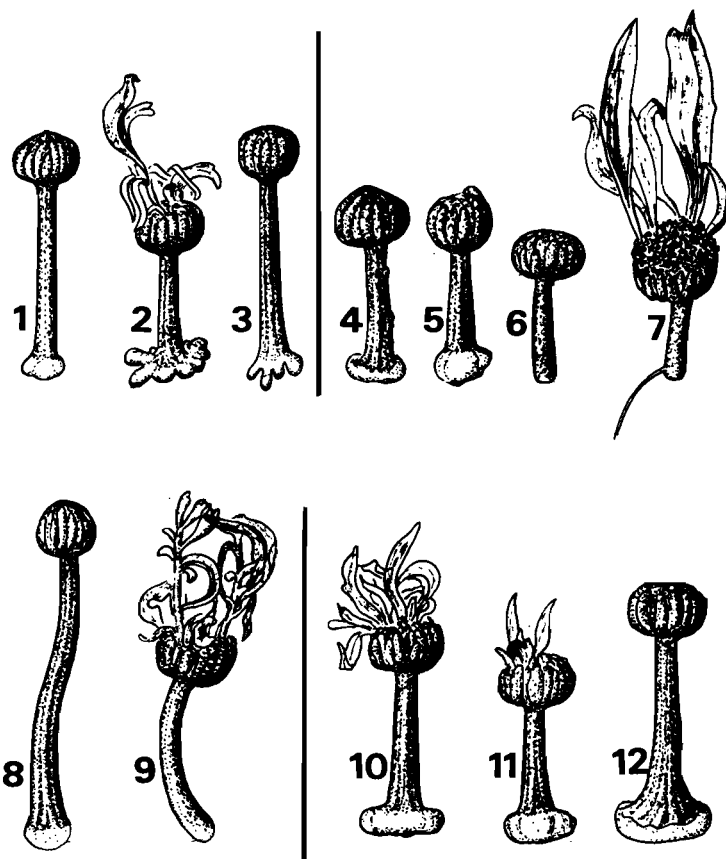


Planche II

P l a n c h e   I . I I -

Effets du saccharose.

Aspect des boutons floraux cultivés en lumière diffuse 3 500 lux (9 h) sur milieu de base (sol. F) renfermant : Fig. 1, 0 ‰ de saccharose ; Fig. 2, 20 ‰ de saccharose ; Fig. 3, 40 ‰ de saccharose ; Fig. 4, 60 ‰ de saccharose ; Fig. 5, 80 ‰ de saccharose ; Fig. 6, 100 ‰ de saccharose ; Fig. 7, 120 ‰ de saccharose ; Fig. 8, 140 ‰ de saccharose ; Fig. 9, 160 ‰ de saccharose ; Fig. 10, 180 ‰ de saccharose ; Fig. 11, 200 ‰ de saccharose ; Fig. 12, bouton de la concentration 60 ‰ avec réversions florales survenues après 75 jours de culture (appauvrissement du milieu) ; Fig. 13, 14 et 15, boutons de l'expérience "sans pédoncule" sur milieux F + 80, 160 et 180 ‰ de saccharose, la floraison est plus rapide, mais on observe beaucoup de fleurons anormaux (respectivement 8 fl. normaux ; 8 fl. normaux et 17 anormaux ; 28 normaux et 20 anormaux) ; Fig. 2a et 2b, forme de cal (6 jours et 15 jours) sur milieu additionné de 20 ‰ de saccharose ; Fig. 3a, 3b, forme du cal (6 jours et 15 jours) sur milieu additionné de 60 à 160 ‰ de saccharose.

---

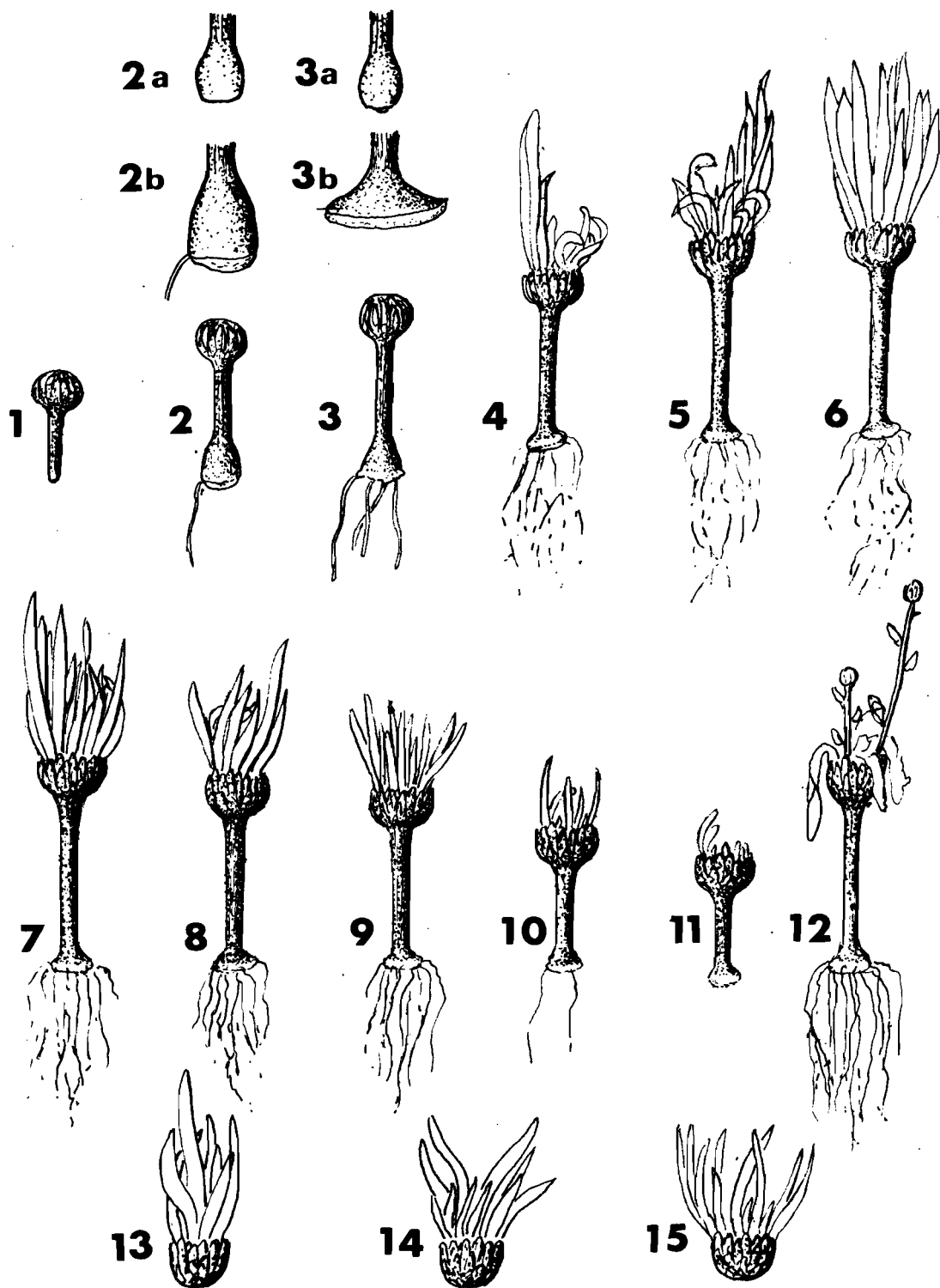


Planche III

P l a n c h e   I V   -

Effets du glucose.

Fig. 1g, milieu F, Témoin (à 14 jours) ; Fig. 2g, milieu F + 40 ‰ de glucose ; Fig. 3g, milieu F + 80 ‰ de glucose, épanouissement faible, fleurons anormaux, beaucoup de boutons meurent.

Effets du fructose.

Fig. 1 à 13, boutons floraux sur milieu F additionné de 0 à 120 ‰ de fructose après 23 jours de culture ; Fig. 1, Témoin (milieu F) ; Fig. 2 et 3, milieu F + 20 ‰ de fructose (à 9 et 23 jours) ; Fig. 4 et 5, milieu F + 40 ‰ de fructose : Fig. 6, 7 et 8, milieu F + 60 ‰ de fructose ; Fig. 9, milieu F + 80 ‰ de fructose ; Fig. 10 et 11, milieu F + 100 ‰ de fructose : Fig. 12 et 13, milieu F + 120 ‰ de fructose ; Fig. 14 à 24, même expérience sur l'effet du fructose, mais à 28 jours de culture ; Fig. 14, milieu F + 40 ‰ de fructose ; Fig. 15, milieu F + 60 ‰ de fructose ; Fig. 16, 17, 18 et 19, milieu F + 100 ‰ de fructose ; Fig. 20, 21 et 22, milieu F + 120 ‰ de fructose ; Fig. 23, milieu F + 180 ‰ de fructose ; Fig. 24, milieu F + 200 ‰ de fructose.

---

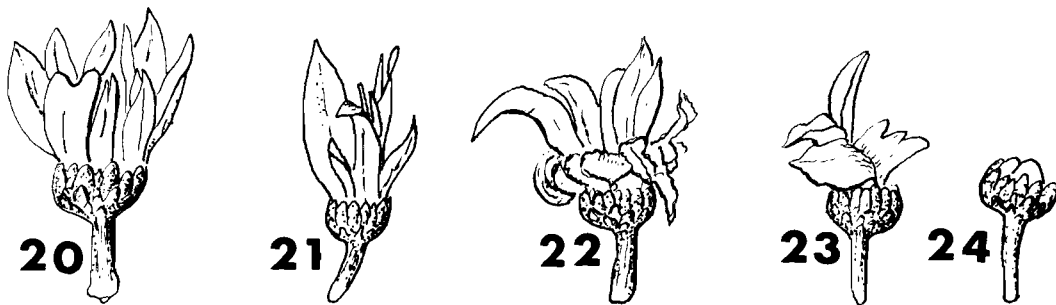
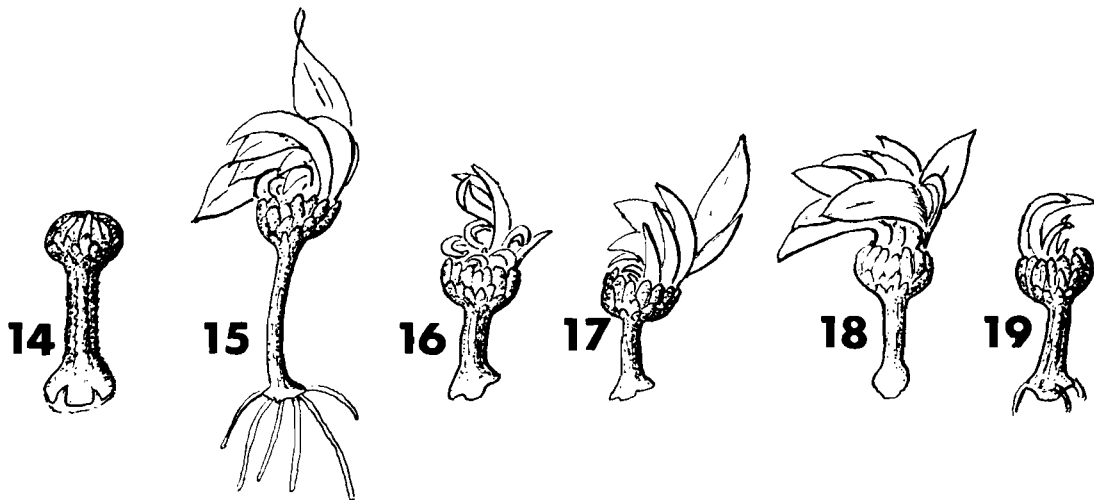
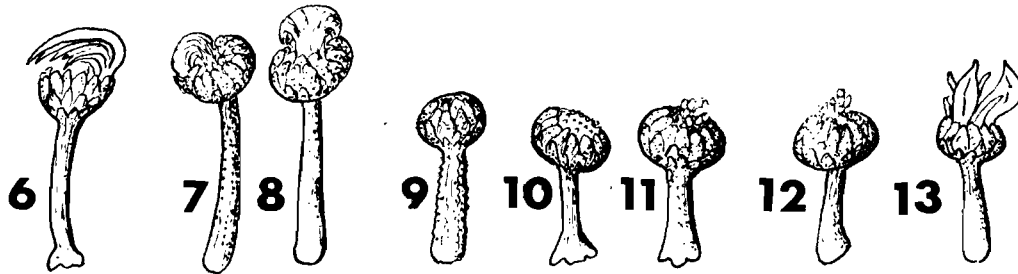
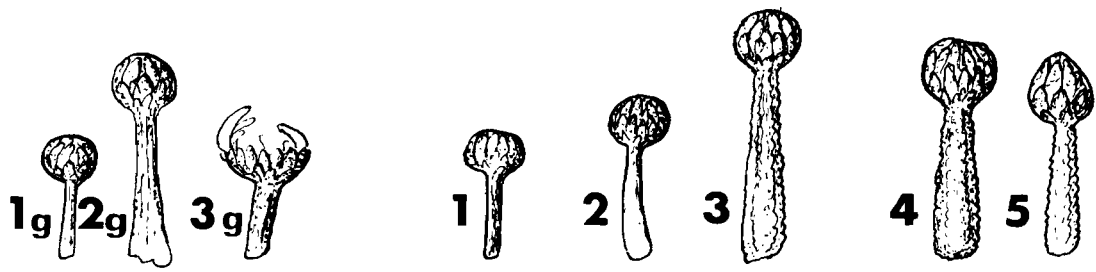


Planche IV

## Planche V -

### Effets de l'acide $\alpha$ -naphtyl acétique (Fig. 1a à 5a)

Fig. 1a, Témoin ; Fig. 2 et 3a, milieu de base + ANA  $10^{-7}$  à 6 jours ; Fig. 4a, + ANA  $10^{-5}$  (remarquer le plissement transversal de l'épiderme du pédoncule ; Fig. 5a, + ANA  $10^{-4}$  (remarquer la courbure du pédoncule).

### Effets de l'acide 2,4 dichlorophénoxyacétique (Fig. 1 à 15)

Fig. 1 et 2, Témoin (tumorisation à 7 jours) ; Fig. 3, 2,4-D  $2.10^{-6}$  (remarquer la tumorisation du pédoncule et l'apparition des racines déjà à 7 jours) ; Fig. 4, 2,4-D  $5.10^{-6}$  (à 7 jours, tumorisation dissymétrique) ; Fig. 5, Témoin à 11 jours (tumorisation) ; Fig. 6 à 11, tumorisation et rhizogenèse à la concentration  $2.10^{-6}$  au bout de 7 jours (6), 11 jours (7-8), 30 jours (9), 72 jours (10) et 98 jours (11) ; Fig. 12, boutons des fortes concentrations ( $10^{-5}$ ), le pédoncule est tuméfié et plissé, une racine descendue du bouton s'est tuméfiée à son tour à son extrémité ; Fig. 13 et 14, boutons aux concentrations  $5.10^{-6}$  à 65 jours et  $10^{-5}$  à 50 jours (remarquer les racines aériennes) ; Fig. 15, bouton de l'expérience "sans pédoncule" concentration 2,4 D  $5.10^{-6}$  (des racines se forment sur les bractées).

### Effets de l'acide 2,3,5 triiodobenzoïque (Fig. 16 à 22)

Fig. 16, Témoin sans TIB (à 14 jours) ; Fig. 17 et 18, TIB  $1,25.10^{-5}$  ; Fig. 19, TIB  $2,5.10^{-5}$  (remarquer la courbure du pédoncule) ; Fig. 20, TIB  $5.10^{-5}$  (peu d'épa nouissement, pas de cal) ; Fig. 21, TIB  $7,5.10^{-5}$  inhibition, développement fleurons femelles et de la formation du cal ; Fig. 22, + TIB  $1,25.10^{-4}$ , augmentation légère du diamètre du bouton.

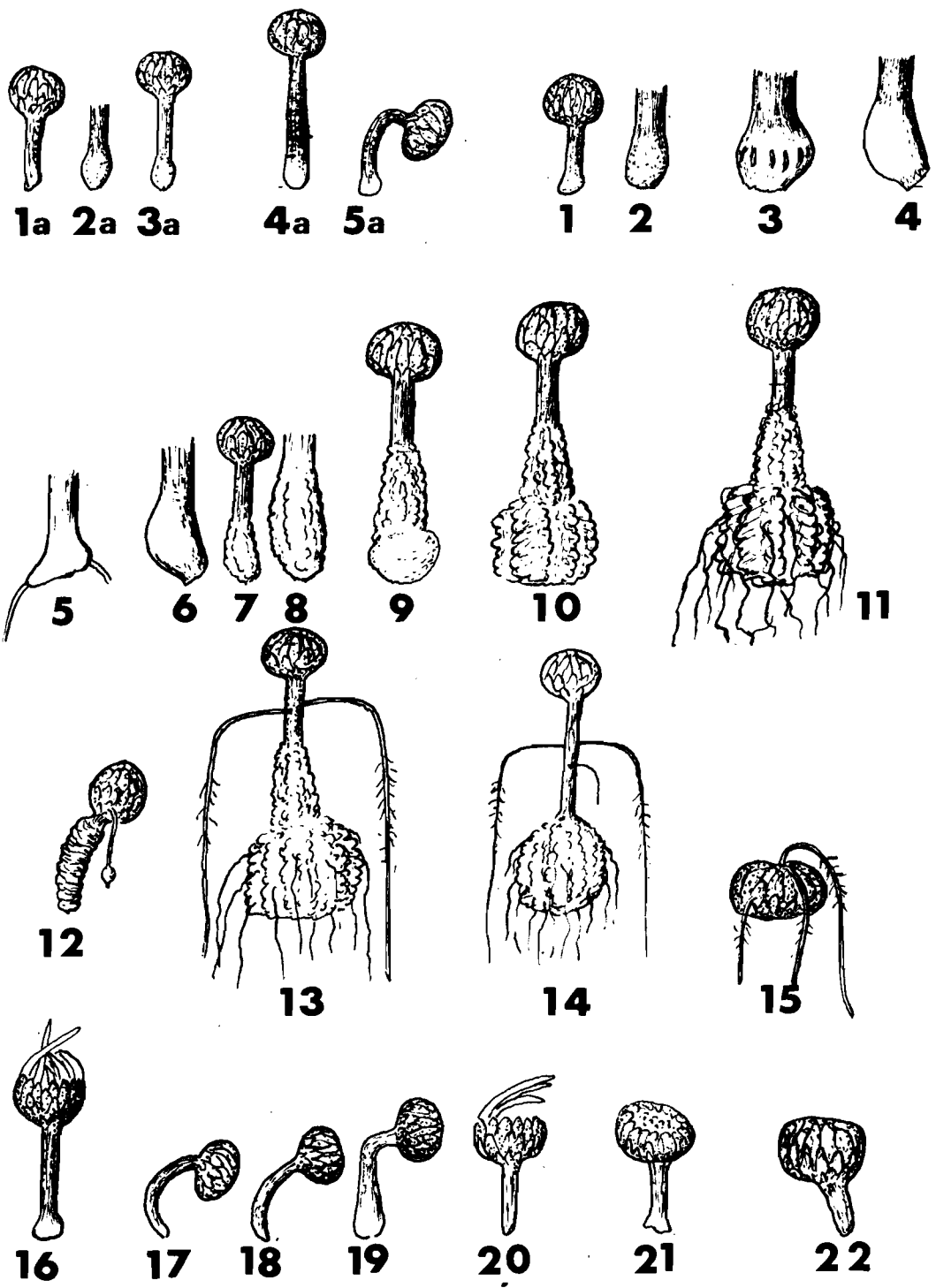


Planche V



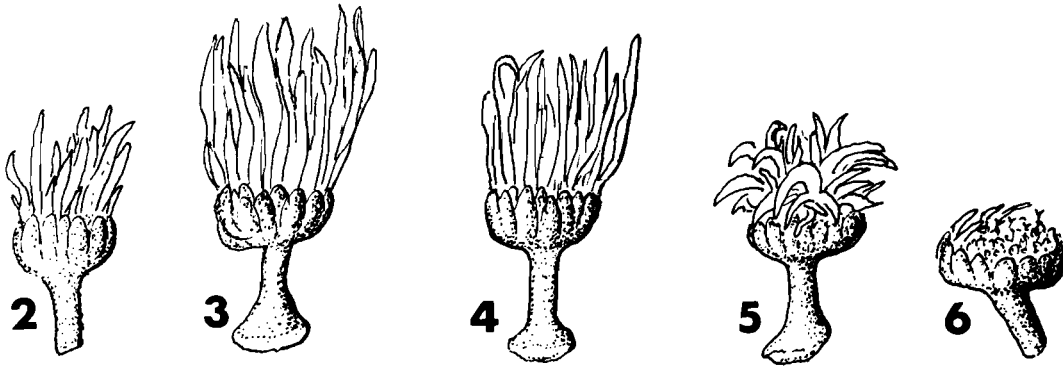
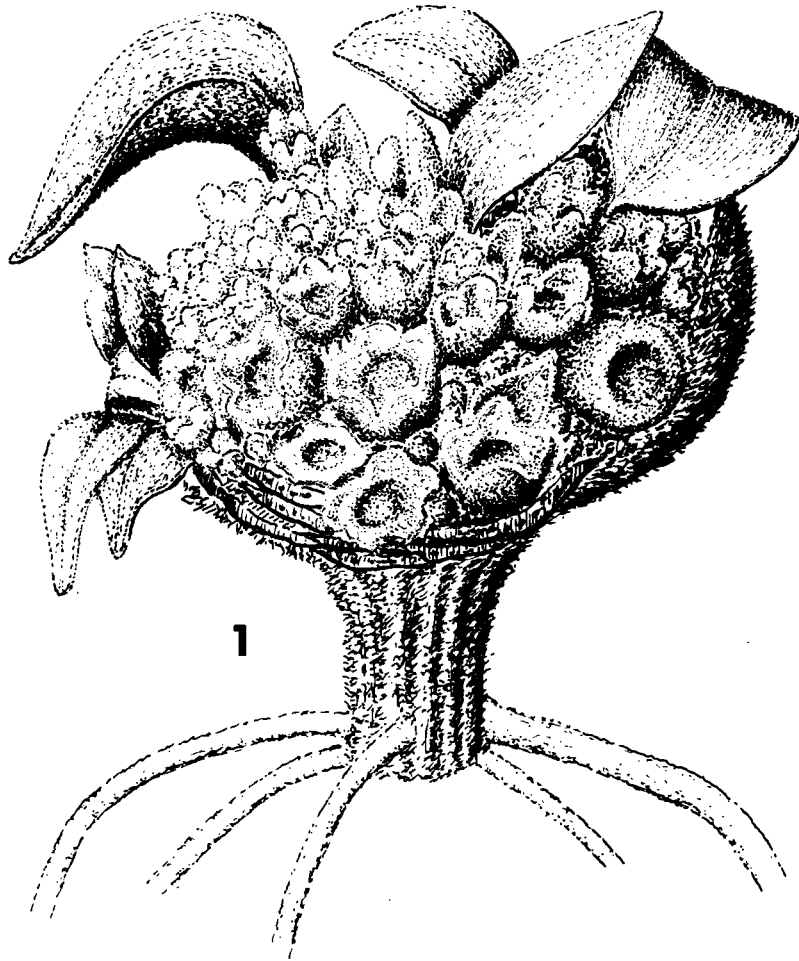
P l a n c h e   V I   -

Fig. 1, Primordia floraux d'un bouton en survie, sur un milieu de Nitsch N<sub>2</sub> additionné d'oligo-éléments selon Nitsch (119), d'acide glutamique, de pantothénate de calcium, de thiamine (mêmes proportions que dans le milieu F) et de 30 ‰ de saccharose après un an et demi de culture. Les ébauches florales (dessin du 30 avril 1959) n'ont pratiquement pas évolué, leur nombre est resté faible, une cinquantaine.

Effets des combinaisons kinétine + AIA.

Fig. 2, bouton sur milieu F additionné de kinétine  $10^{-6}$  ; Fig. 3, bouton, même expérience kinétine  $10^{-6}$  + AIA  $10^{-8}$  ; Fig. 4, kinétine  $10^{-6}$  + AIA  $10^{-7}$  ; Fig. 5, kinétine  $10^{-6}$  + AIA  $10^{-6}$  ; Fig. 6, kinétine  $10^{-6}$  + AIA  $10^{-5}$ . Aux concentrations  $10^{-8}$  à  $10^{-6}$ , l'AIA stimule la floraison, légèrement inhibée par la kinétine à  $10^{-6}$ , et rétablit la tumorigénèse de l'extrémité des pédoncules.

---

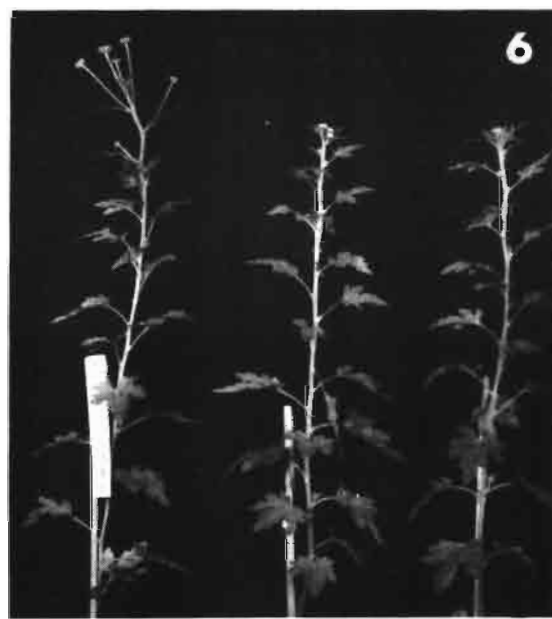
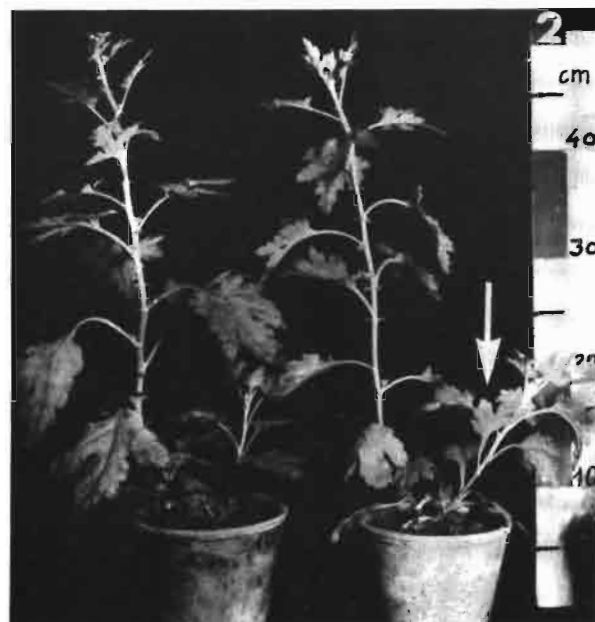


**Planche VI**

P l a n c h e   V I I   -

Chrysanthème var. Souvenir de Georges Péchou du commerce avec drageons dormants à la base (flèches) ; Fig. 2, même variété déshabituee du froid après culture pendant plusieurs années en jours longs à + 18°C, les drageons à la base se développent ; Fig. 3, capitule vu en section longitudinale et au-dessus, on voit l'implantation des fleurons sur le réceptacle ; Fig. 4, le bouton floral greffé (plante de droite) sur un sujet induit à fleurs s'est développé mais avec un léger retard par rapport au bouton d'une plante intacte (témoin à gauche) ; Fig. 5, plante chez laquelle le traitement par les jours longs a été trop prolongé, il s'est développé un bouton couronne, les boutons satellites sont accompagnés de bractées qui se développent jusque dans le capitule (voir planche IX) ; Fig. 6, à droite, 2 plantes traitées selon la méthode normale, il faut attendre quelques jours (plante de gauche) pour que les pédoncules allongés de 15 mm puissent permettre le prélèvement.

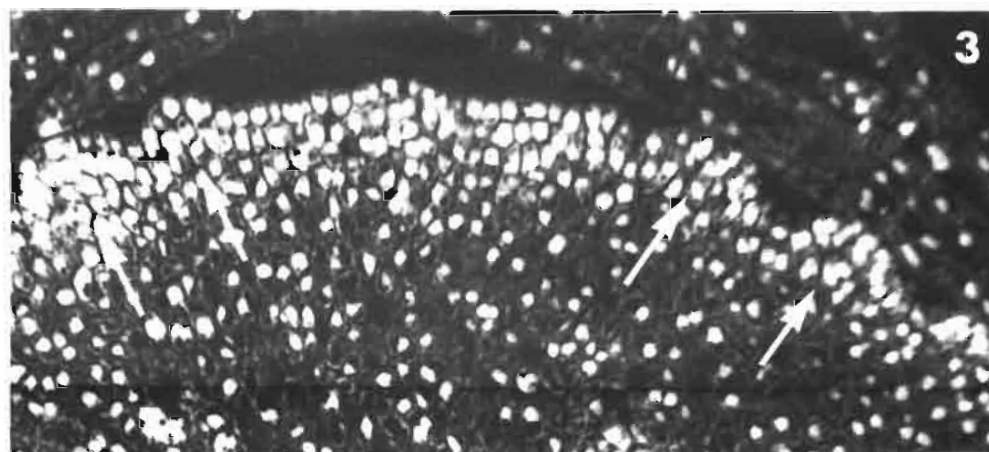
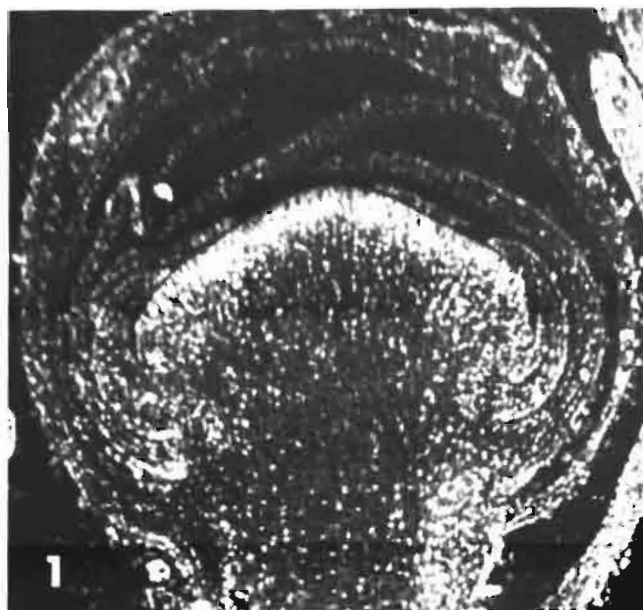
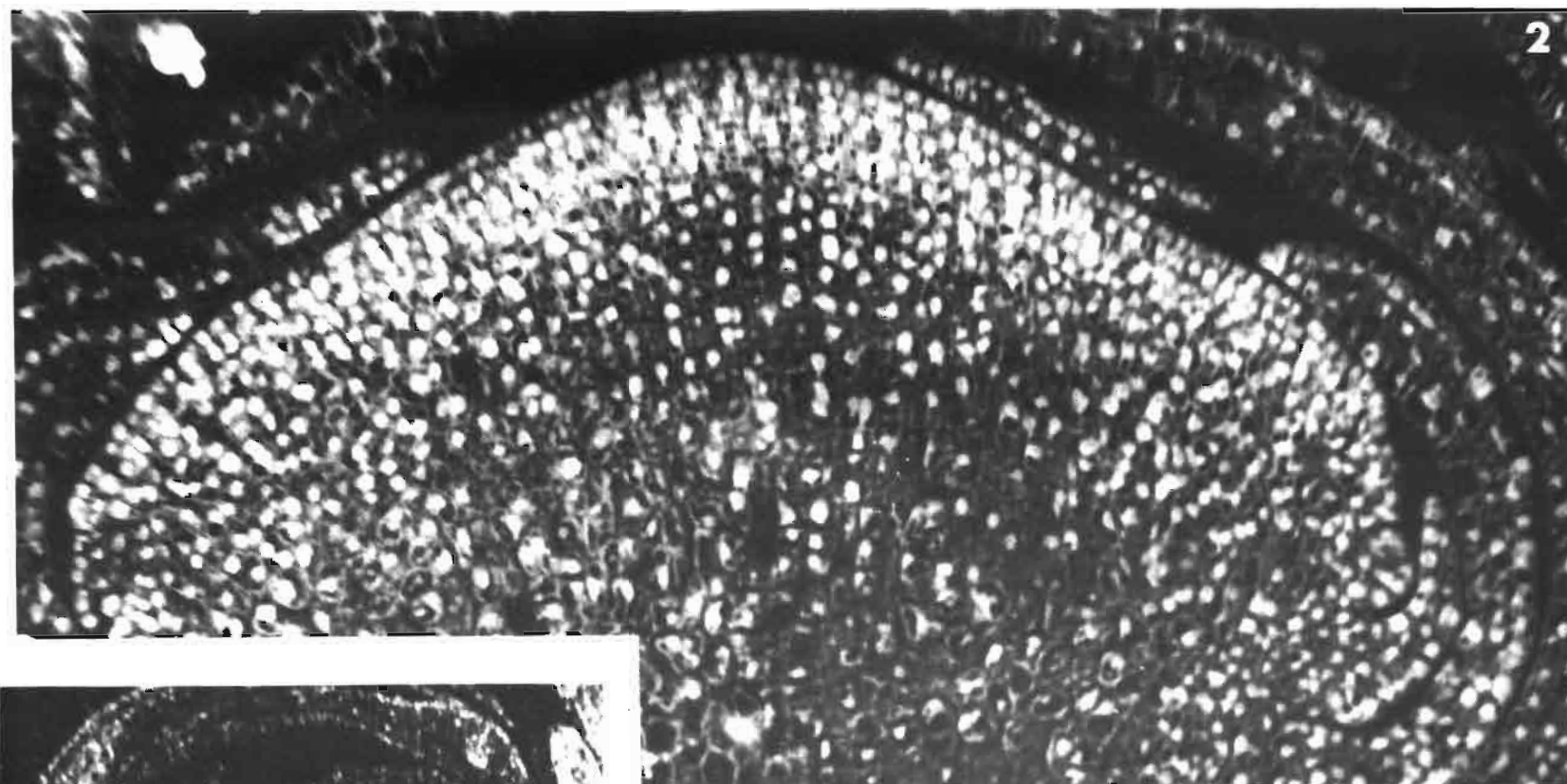
---



P l a n c h e   V I I I   -

Fig. 1, Section longitudinale dans un jeune bouton de chrysanthème, 5 jours après le début de l'action des jours courts, les bractées étroitement serrées entourent et protègent le réceptacle ; la surface du réceptacle a la forme d'un cône arrondi au sommet et à la base très évasée, on remarque la concentration en acides nucléiques (points blancs) des couches cellulaires les plus externes du réceptacle ; Fig. 2, section précédente grossie, la surface du réceptacle est lisse, il n'y a aucune fleur ; Fig. 3, quelques jours après, la surface du réceptacle est ondulée, chaque bosse représente le centre générateur d'une fleur (flèche), les premières ébauches commencent à apparaître à la périphérie et la formation des primordia gagne peu à peu le centre du réceptacle (sommet). Ici, des centres générateurs ont commencé à individualiser des mamelons, mais il subsiste encore une zone aplatie au centre.

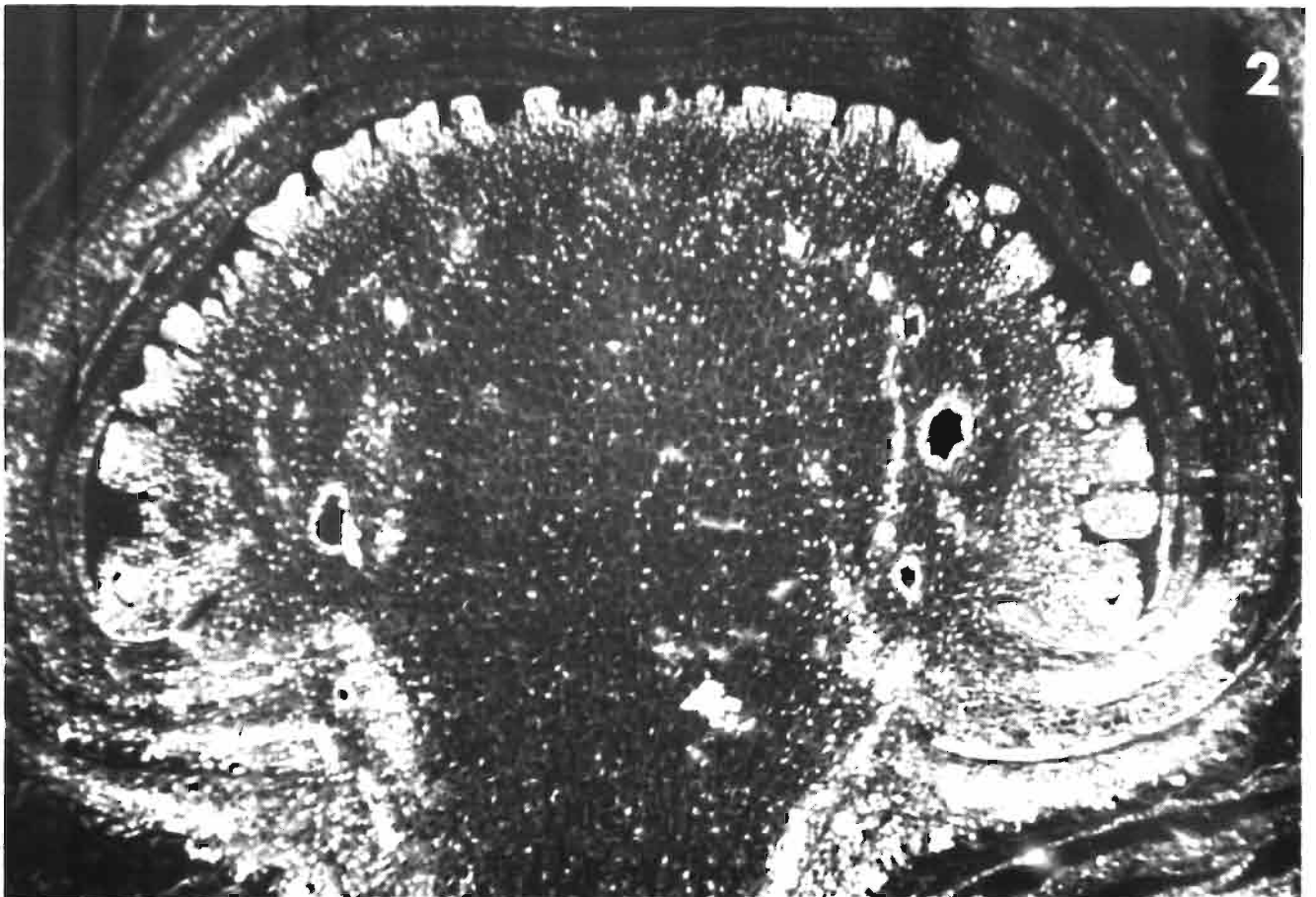
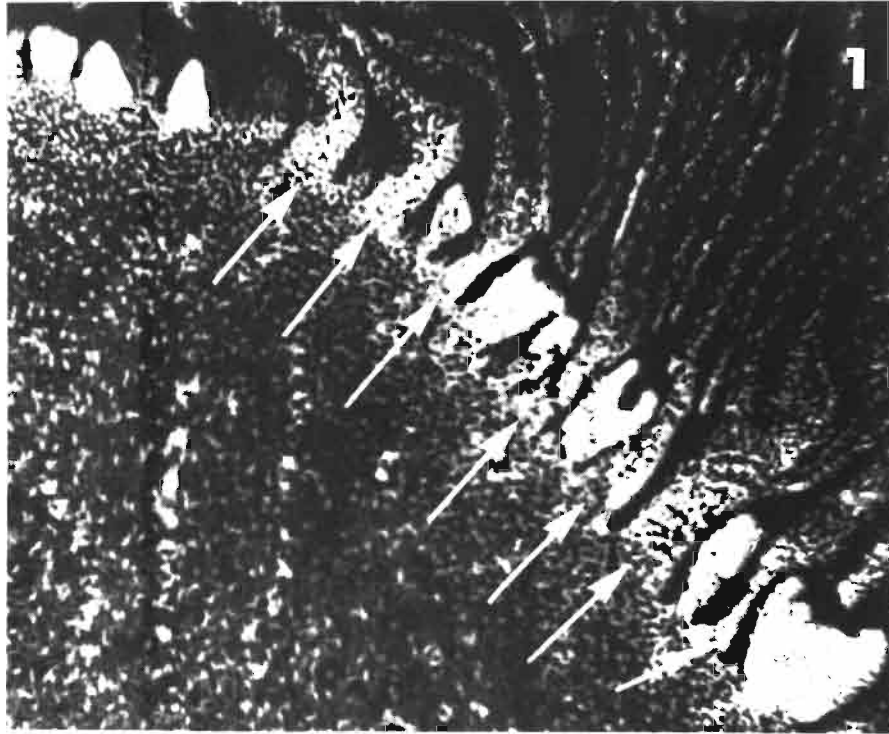
---



P l a n c h e   I X   -

Fig. 1, Section longitudinale dans un bouton floral (standard) 18 jours après la mise des plantes en jours courts. Le prélèvement a lieu **dix** jours après. On remarque les ébauches florales de moins en moins différenciées en allant vers le centre du réceptacle ; Fig. 2, partie de la section d'un réceptacle d'un bouton ayant reçu un traitement par les jours longs trop prolongés avant le traitement par les jours courts. Entre les ébauches florales f, se sont formées des bractées (flèches) (fixation Navashine, coloration Hématoxyline Heidenhain).

---

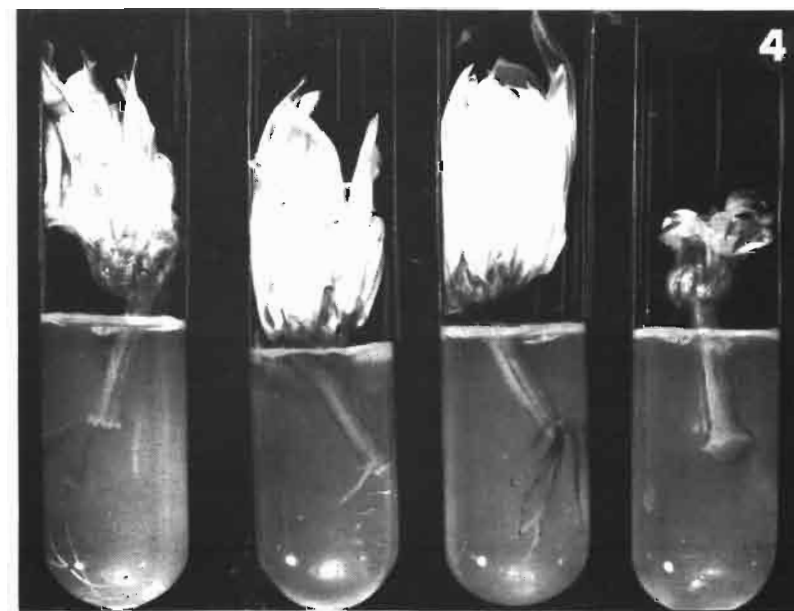
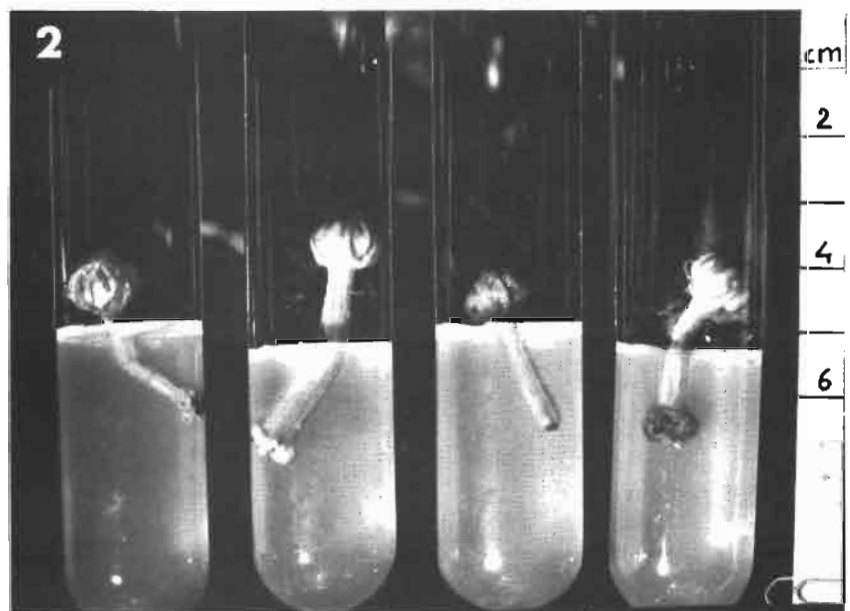
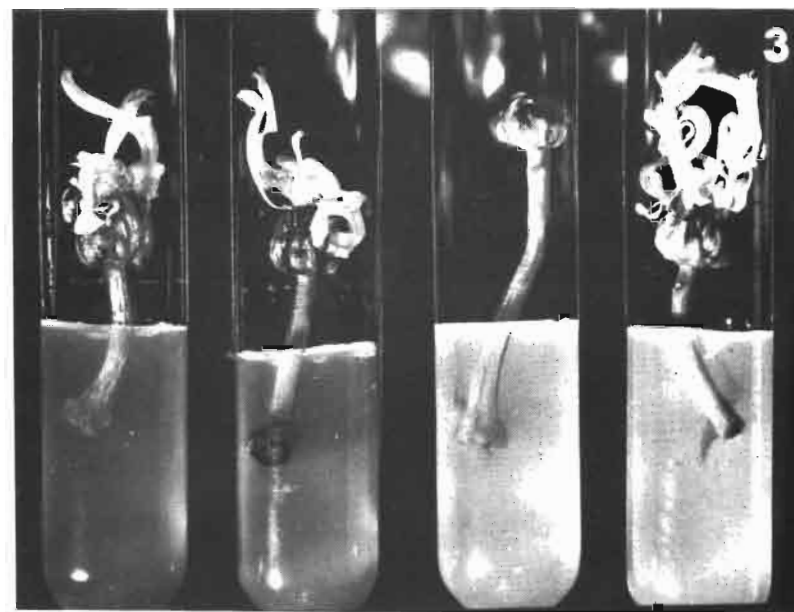
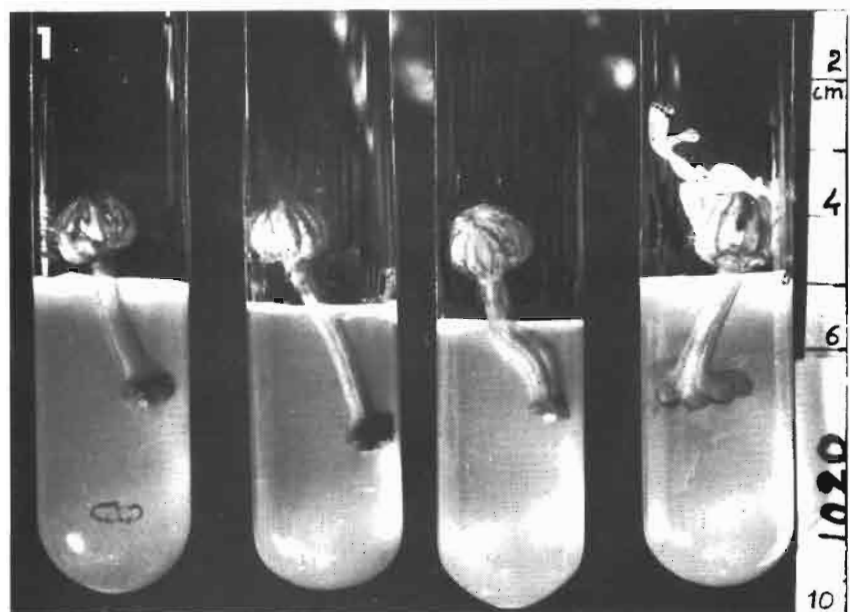




P l a n c h e   X   -

Fig. 1, Culture "in vitro" de boutons floraux sur un milieu nutritif renfermant une solution nutritive de Knop additionnée de 30 % de saccharose ; Fig. 2, boutons floraux cultivés sur solution de Knop additionnée de 80 % de saccharose ; Fig. 3, boutons floraux cultivés sur un milieu renfermant la solution F avec 30 % de saccharose, quelques fleurons arrivent à se dégager mais ils "réversent" ; Fig. 4, boutons cultivés également avec la solution F, mais avec 80 % de saccharose, les fleurons femelles s'épanouissent chez 35 à 55 % des boutons, mais les fleurons hermaphrodites meurent.

---

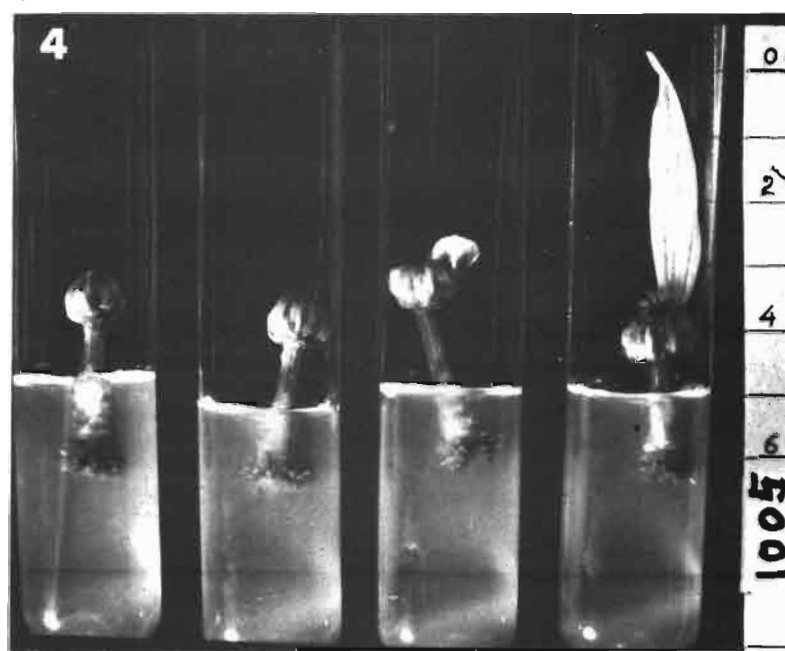
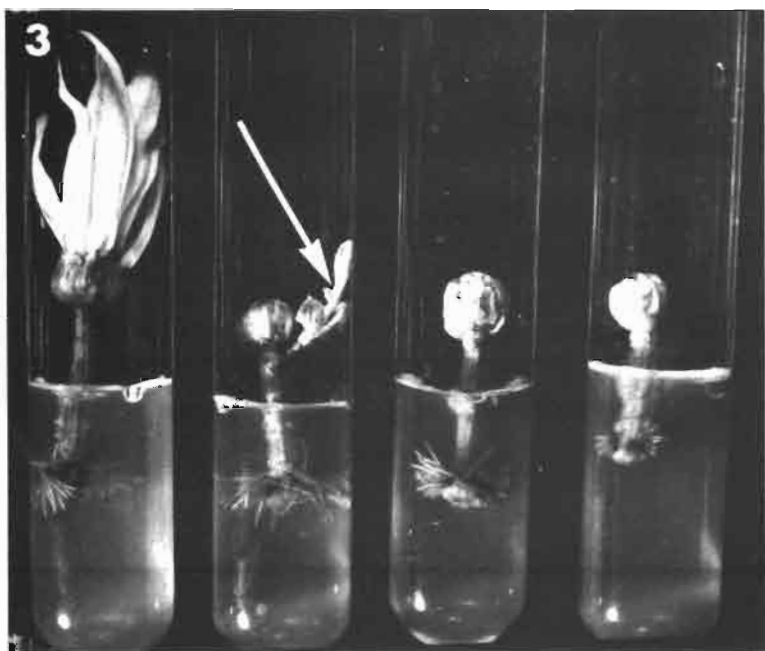
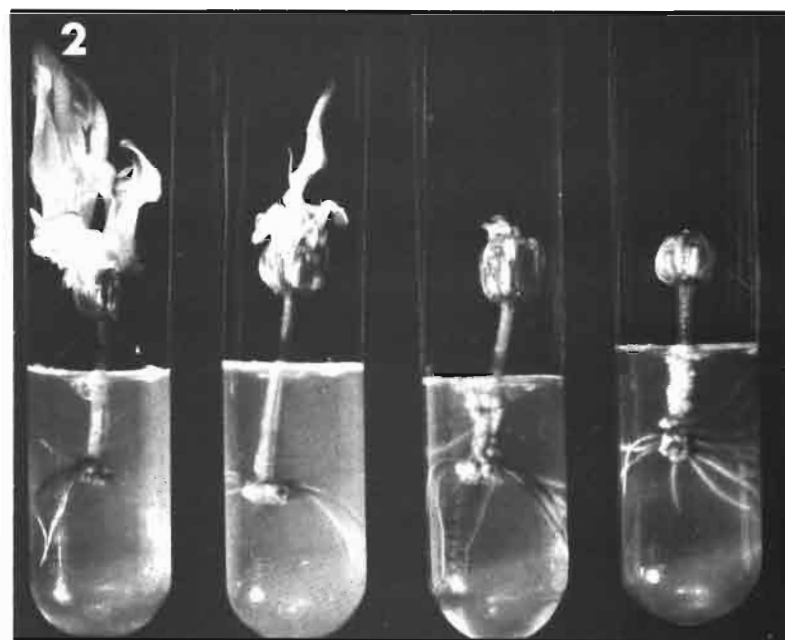
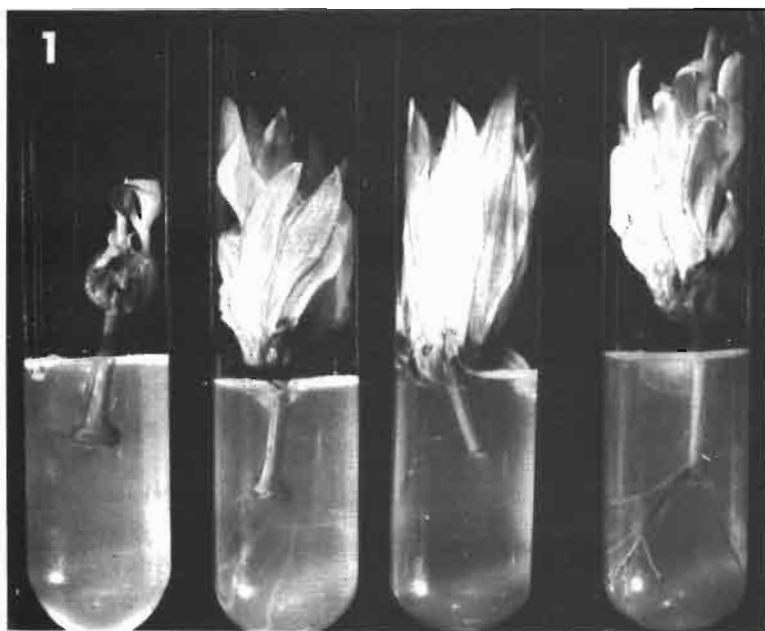


P l a n c h e   X I   -

Effet de l'acide indolyl-acétique.

Fig. 1, milieu de base + AIA  $10^{-8}$  (identique au Témoin sans AIA non représenté) ; Fig. 2, milieu de base + AIA  $10^{-7}$ , cal aplati à l'extrémité des pédoncules avec formation parfois le long du pédoncule plongeant dans la gélose de tumeurs noduleuses; Fig. 3, milieu de base + AIA  $10^{-6}$ , mêmes caractères de la tuméfaction que pour le traitement précédent, mais formation de nombreuses racines fines et courtes et néoformation de bourgeons végétatifs (flèche) sur le pédoncule ; Fig. 4, milieu de base + AIA  $10^{-5}$ , généralisation de la tuméfaction, la partie du pédoncule plongeant dans la gélose devient conique et rougeâtre. Remarquer l'inhibition de la floraison (Echantillonnage : les quatre boutons les mieux fleuris de chaque série-traitement).

---



Pl a n c h e   X I I   -

Effets de l'acide  $\beta$ -indolyl-acétique.

Fig. 1 (fin de l'expérience Planche XI), milieu de base + AIA  $10^{-4}$ . Pédoncule court entièrement tuméfié avec parfois production de nombreuses racines ; aucune floraison.

Effets de la kinétine seule (Expérience boutons sans pédoncule).

Fig. 2, à gauche deux témoins sur milieu de base sans kinétine, l'un avec racines, à droite, bouton de la concentration  $10^{-6}$ , la faible proportion de pédoncule laissée s'est tuméfiée.

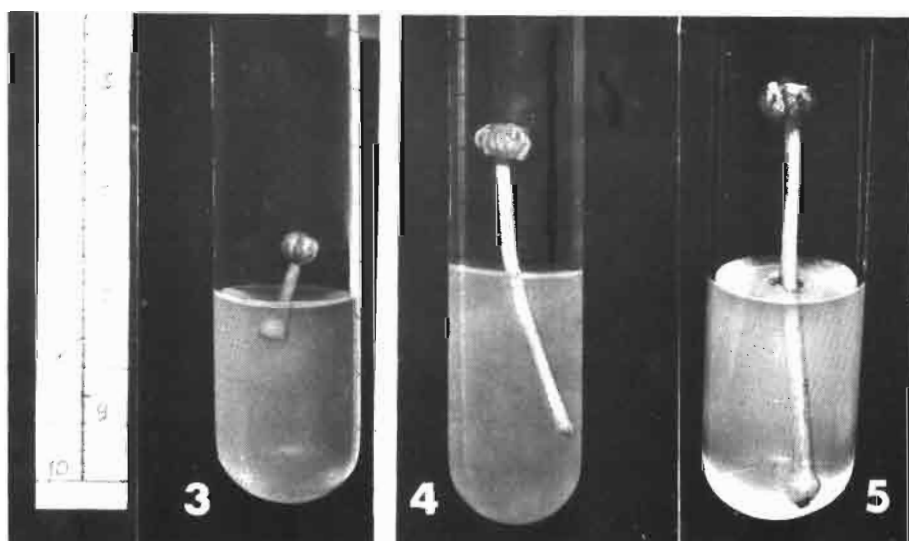
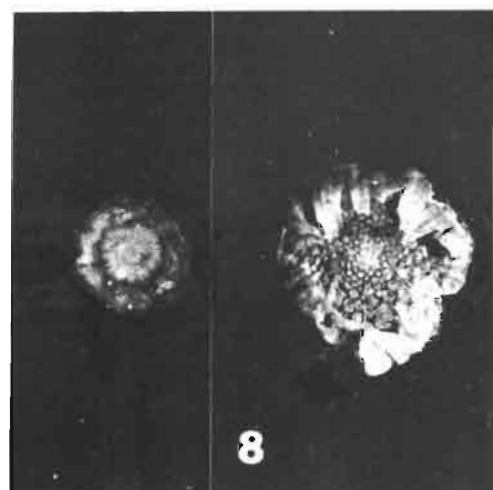
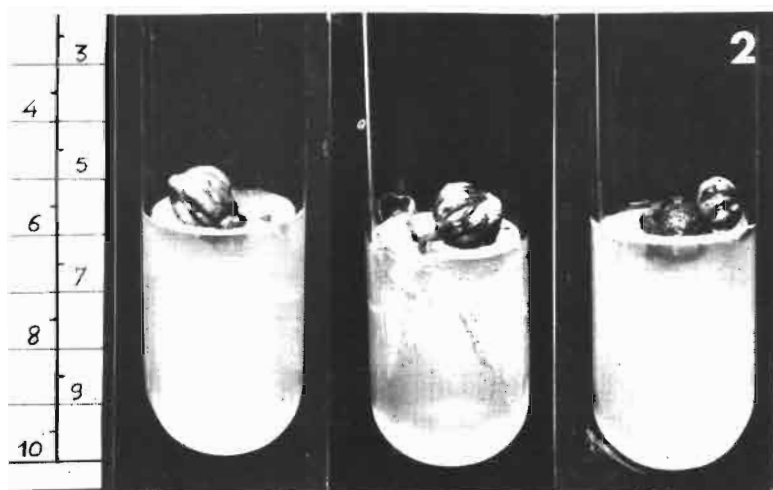
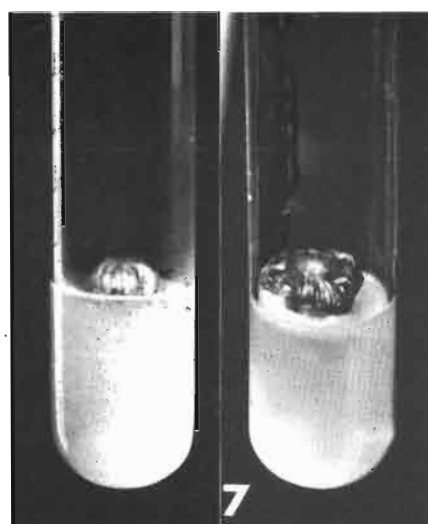
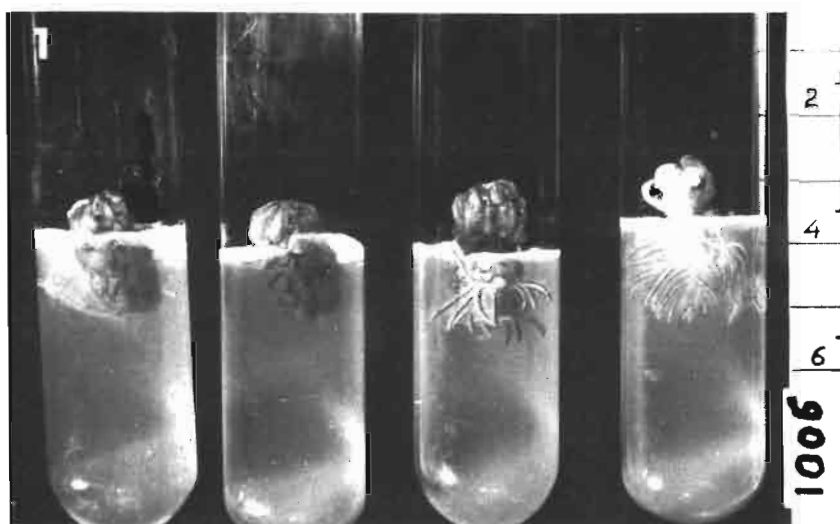
Effets de l'acide gibbérellique.

Fig. 3, Témoin, milieu de base sans gibbérelline ; Fig. 4, milieu de base + acide gibbérellique  $10^{-6}$  ; Fig. 5, milieu de base + acide gibbérellique  $10^{-5}$ , remarquer l'allongement du pédoncule jaunâtre quatre à huit fois supérieur au témoin et la forme particulière de la tuméfaction à l'extrémité des pédoncules ; Fig. 6, développement d'une tumeur à cellules foisonnantes sur un bouton mort en fin d'expérience acide gibbérellique  $10^{-6}$ .

Effets de la kinétine + AIA (Expérience sans pédoncule). A rapprocher des Fig. 2 à 6 - Planche VI.

Fig. 7, boutons sur milieu de base, kinétine  $10^{-6}$  + AIA  $10^{-5}$  à gauche au début de l'expérience, à droite en fin d'expérience vue de profil ; Fig. 8, boutons de la figure précédente grossis deux fois, les bractées ont été sectionnées pour montrer les fleurons à l'intérieur du bouton en début d'expérience (à gauche). Remarquer l'augmentation du diamètre du réceptacle et des fleurons en fin d'expérience (95 jours). Au centre du capitule, une zone claire indique un **groupe de fleurons** encore en évolution.

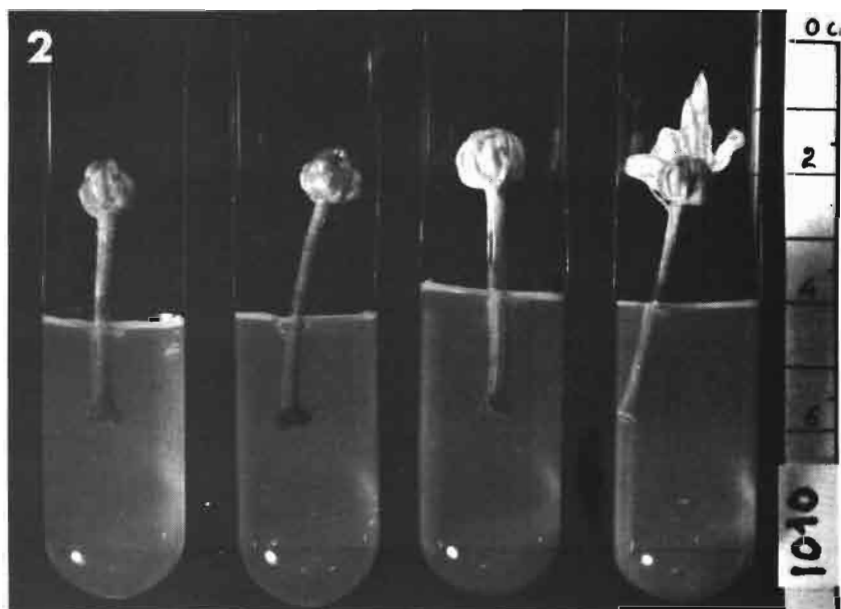
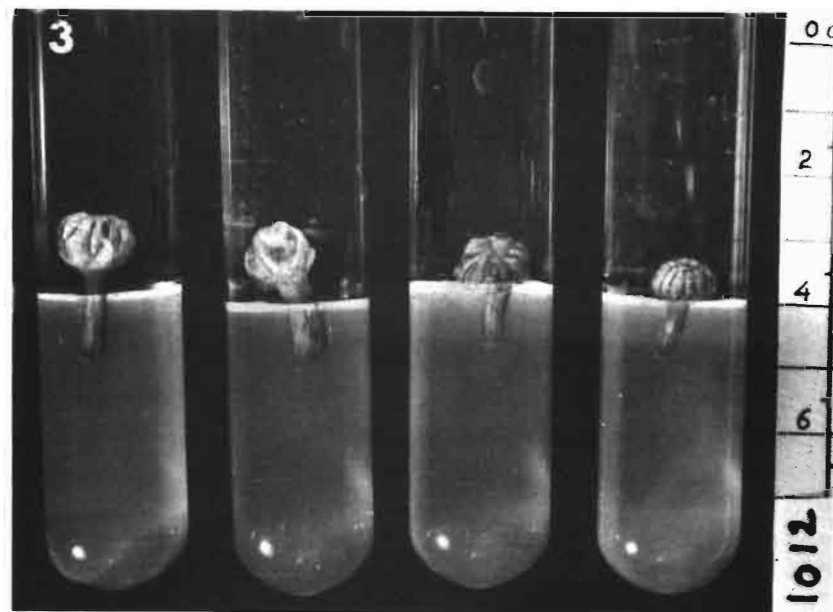
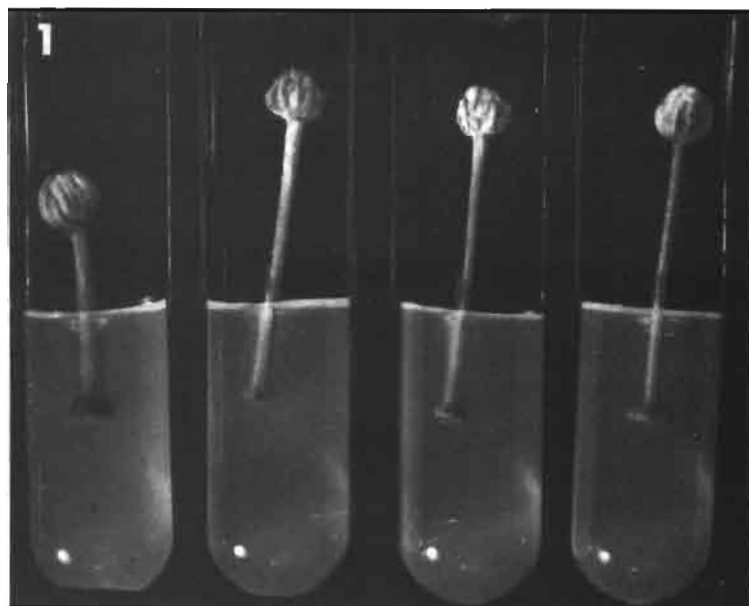
---



Pl a n c h e   X I I I   -

Combinaison gibbérelline-kinétine.

Fig. 1, acide gibbérellique  $10^{-6}$  + kinétine  $10^{-7}$  ; Fig. 2, acide gibbérellique  $10^{-6}$  + kinétine  $10^{-6}$  ; Fig. 3, acide gibbérellique  $10^{-6}$  + kinétine  $10^{-4}$  (remarquer la diminution de la **gros**seur du cal à l'extrémité du pédoncule, l'inhibition de la croissance du pédoncule et de la floraison ; Fig. 4, photographie de la série d'une autre expérience (répétition) de gauche à droite, Témoin (gibbérelline seule), GA  $10^{-6}$  + K  $10^{-8}$ , GA  $10^{-6}$  + K  $10^{-7}$ , GA  $10^{-6}$  + K  $10^{-6}$ , GA  $10^{-6}$  + K  $10^{-5}$ , GA  $10^{-6}$  + K  $10^{-4}$ . La photographie a été prise plus tardivement que les trois précédentes, de sorte que l'inhibition de la floraison par la kinétine a été progressivement levée, excepté chez le bouton GA  $10^{-6}$  + K  $10^{-4}$ .



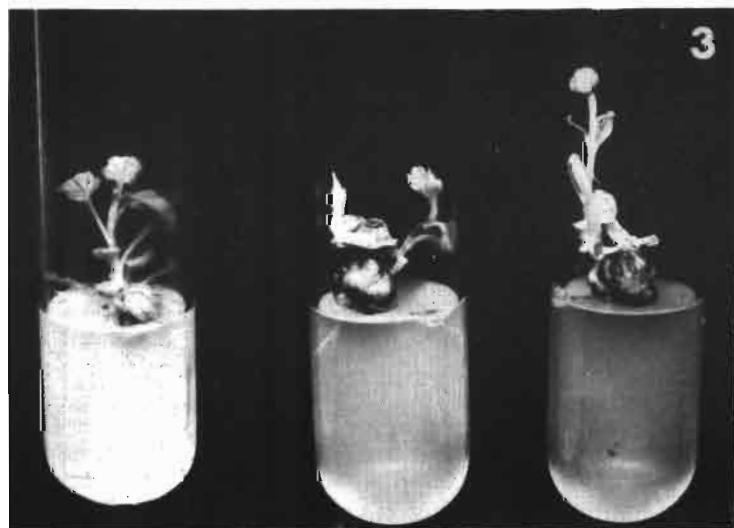
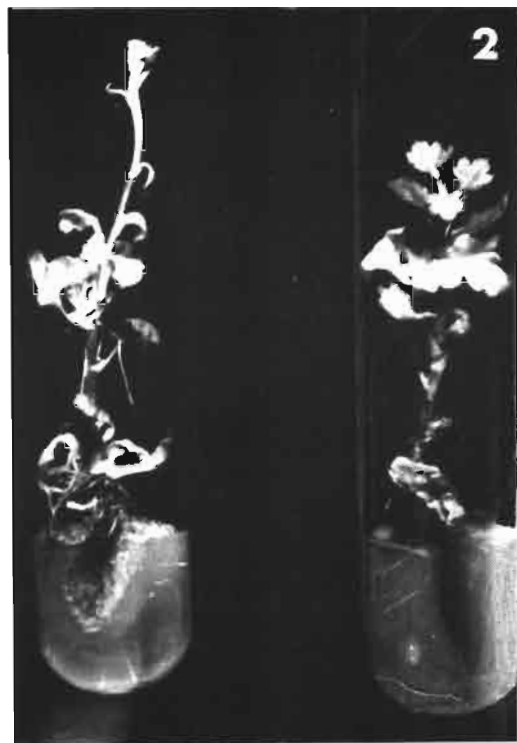
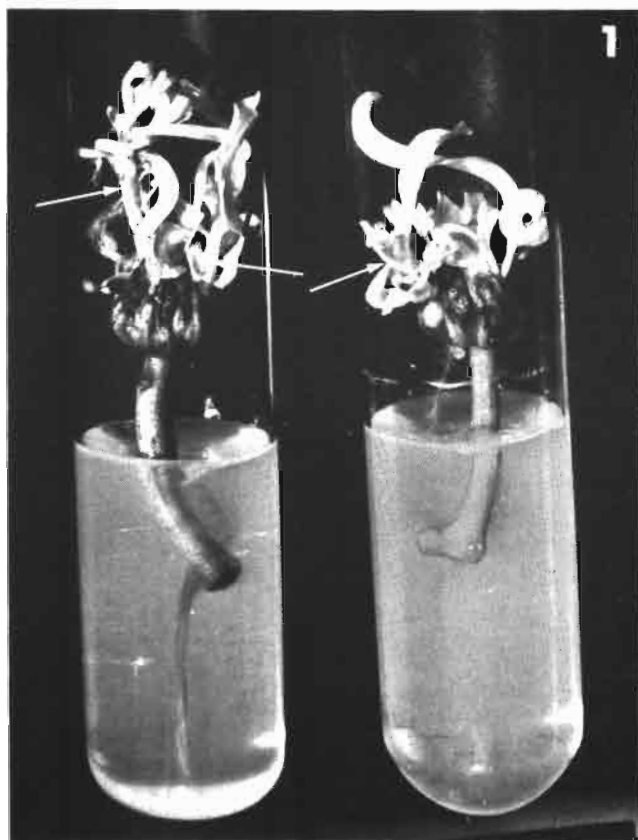


P l a n c h e   X I V   -

Réversions florales.

Fig. 1, réversions obtenues au bout de 81 jours sur milieu de base avec 30 % de saccharose au lieu de 80 ; Fig. 2, réversions de fleurs sur boutons sans pédoncule après vieillissement du milieu à gauche en jours courts 9 h, à droite en jours longs 24 h ; Fig. 3, réversions sur boutons sans pédoncules en jours courts, milieu F avec 30 % de saccharose, de gauche à droite AIA  $10^{-7}$  + gibbérelline  $10^{-7}$  ; AIA  $10^{-7}$  + gibbérelline  $10^{-7}$  + kinétine  $10^{-7}$  ; gibbérelline  $10^{-7}$  + kinétine  $10^{-6}$  ; Fig. 4, milieu F (80 % saccharose) + kinétine  $10^{-7}$ . Réversion surfloraison (bouton en dehors du champ de la photographie). Remarquer la néoformation de fleurs sur le cal du pédoncule (flèches).

---



P l a n c h e   X V   -

Présence d'un inhibiteur puissant chez les chrysanthèmes en voie de  
floraison (explications dans le texte).

---

