

TEST DE REPRODUCTION ORCHIDÉES *IN VITRO*

Techniques

État de l'art & références

Tests

*

les techniques mises en œuvre

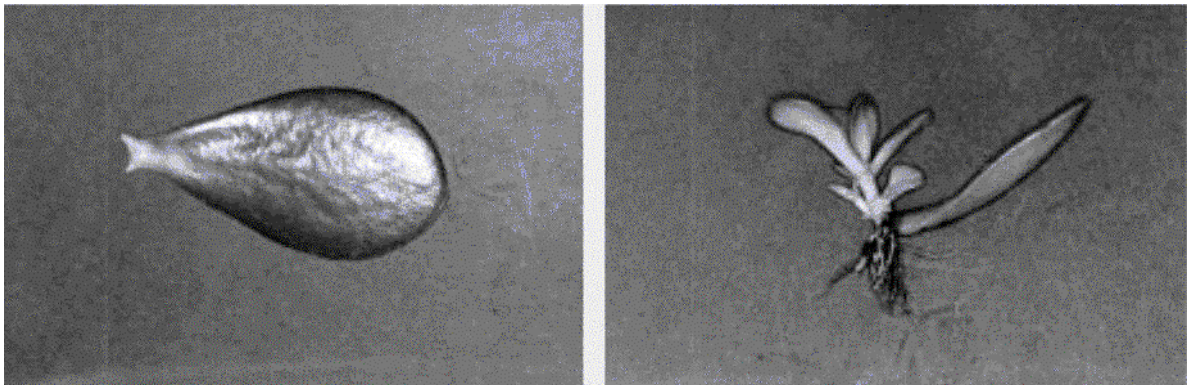
Le plus rapide, hors achat des plants en fleurs et leur intégration directe est l'application de techniques éprouvées et simples de cultures *in vitro*.

Cela, toutefois implique l'organisation d'une structure « matérielle », capable de mettre en œuvre, d'organiser et de gérer, dans l'optique de la création de décors vivants, ces techniques qui ne nécessitent, en fait que peu d'équipement et de technicité.¹.

Pour la conception d'un décor tropical répondant aux caractéristiques précitées, afin d'obtenir la végétation spécifiquement recherchée, il est, donc, tout à fait possible d'avoir recours à ces différents modes de culture, qui ont été testés.

Nombres d'espèces peuvent être multipliées à partir des feuilles comme par exemple: les Sansevières; Bégonias; Kalanchoes ; Saintpaulias, etc.

crassulacée



¹ nous sommes là, bien loin des biotechnologies « de pointe » ou de la moindre manipulation génétique.

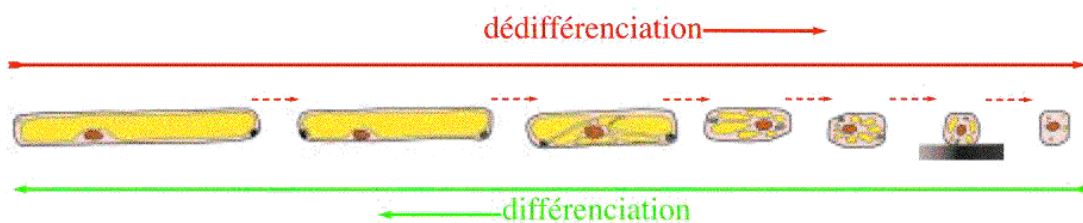
Avantages et inconvénients de la multiplication végétative par rapport à la végétation sexuée, par graines ou spores:

- Avantages : obtention de plantes présentant toutes les mêmes caractéristiques (clones),
- Inconvénients : beaucoup d'espèces sont réfractaires à la multiplication végétative.

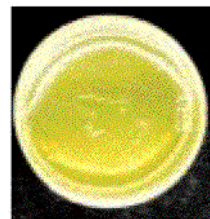
Tous les végétaux ne peuvent donc pas être multipliés par voie végétative, cependant, il est apparu que de nombreuses espèces sont réfractaires aux techniques traditionnelles de multiplication végétative et si on arrive à bouturer des tiges, par exemple, on n'arrive pas à faire la même chose avec les racines.

D'autres voies ont dû être suivies, des voies déjà "anciennes et bien connues: ainsi dès 1870, les premières tentatives de culture d'organes vivants isolés furent organisées² et dès 1902, Haberlandt un biologiste allemand, put observer les potentialités naturelles de la multiplication végétative (bouturage) et suite à ces travaux, il énonça le premier grand principe qui allait ouvrir, plus tard la voie de la micropropagation des végétaux, le principe de la « totipotence cellulaire »

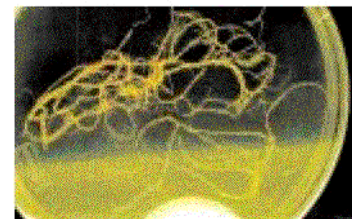
*"toute cellule végétale est capable de régénérer un autre individu identique à celui dont elle est issue"*³



En 1934, WHITE réussit la culture de racines de tomate sur un milieu contenant de l'eau, des sels minéraux un extrait de levure et du sucre et une hormone végétale la seule connue à l'époque l'auxine⁴

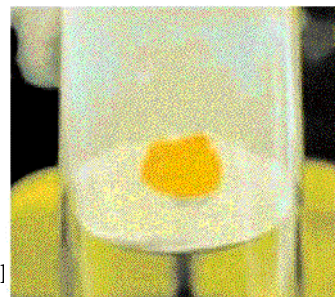


Mise en culture de racines de Tomate.

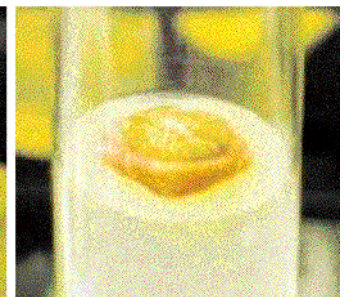


Au bout de quelques semaines on observe la croissance des racines.

En 1939, Gautheret obtient à partir de tissu carotte, un amas de cellules dédifférenciées : un cal.



Une rondelle de carotte est mise en culture sur un milieu approprié.



15 jours plus tard, on voit apparaître un amas plus ou moins vert : on a la formation d'un cal.

² La conservation de queues de têtards de grenouille

³ La dédifférenciation cellulaire : on voit les grandes cellules (pétales,...) perdre leurs vacuoles, leur noyau se diviser et des cellules méristématiques apparaître. Une cellule dédifférenciée perd sa direction.

⁴ En effet, en 1934, on découvre l'auxine (AIA) : il faut 100 kg de maïs immature pour obtenir 500 mg d'AIA. Cette substance naturelle est principalement synthétisée dans les parties apicales et agit sur l'élongation des cellules donc sur la croissance des plantes.

On peut cultiver ce cal indéfiniment dans le temps: avec celui-ci démarre véritablement la culture *in vitro* ("dans du verre").

En 1962, Murashige et Skoog étudient la multiplication végétative du tabac et mettent au point le premier milieu de base pour la culture *in vitro*. Ce milieu contient des sels minéraux, des sucres, des vitamines B, des auxines et des cytokinines⁵.

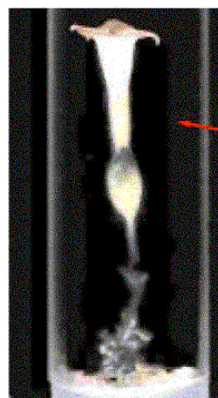
Ce milieu rend possible la culture et la prolifération de méristèmes⁶ de tiges jusqu'alors réfractaires à la multiplication végétative *in vitro*

EXPÉRIENCE SUR DES EXPLANTS DE TABAC :

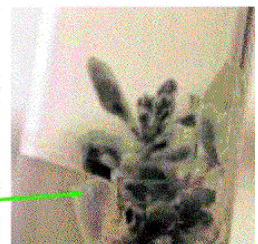
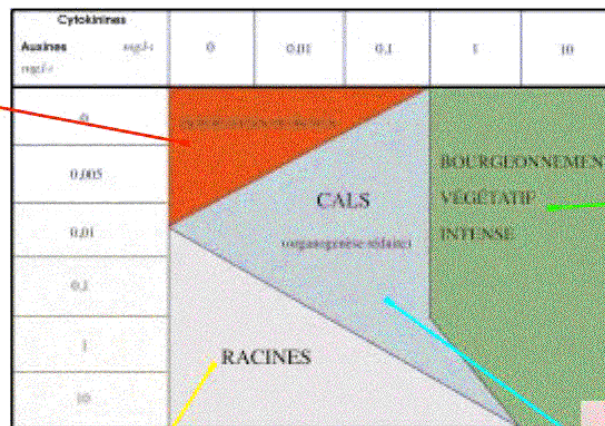
comment on "oriente" une culture à l'aide de deux hormones : l'auxine et la cytokinine. On joue sur le rapport Auxine / Cytokinine:

R représentant la concentration en auxine/concentration en cytokinine

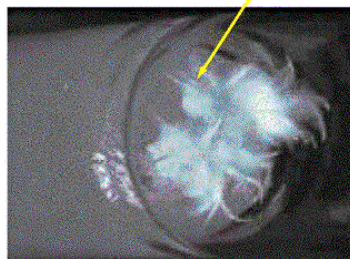
- si
- R = 1: formation de cal uniquement;
 - R < 1 : formation de fleurs ou de feuilles sur le cal
 - R > 1 : formation de racines sur le cal.



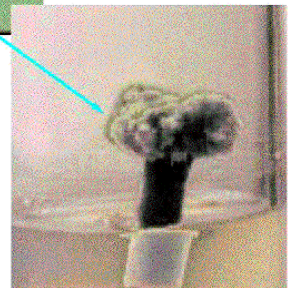
Fleur de Tabac sur le cal.



Plantule de Tabac obtenue à partir d'un cal.



Racines formées sur un cal.



Formation de cal sur un explant de tige de Tabac.

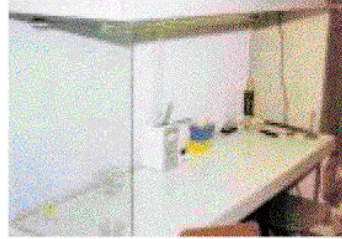
⁵ Les cytokinines ont été découvertes par le biais de la culture *in vitro* en 1956. Ce groupe de substances de croissance végétales est responsable des divisions cellulaires. Les cytokinines sont principalement synthétisées dans les parties racinaires jeunes.

⁶ Les méristèmes sont des organes de la plante contenant des cellules capables de se diviser, et sont responsables de la formation des tiges, des feuilles, des fleurs et des racines. On trouve des méristèmes apicaux (en haut des tiges), axillaires et racinaires (au bout des racines).

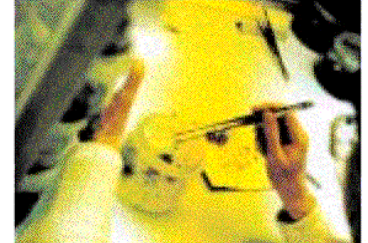
La technique in vitro est un mode de multiplication végétative artificielle des plantes correspond à un ensemble de méthodes faisant intervenir d'une part l'asepsie (stérilisation du matériel, désinfection des explants)



Autoclave : sert à la stérilisation des milieux de culture et du matériel.



Hotte à flux laminaire : travail en conditions aseptiques.



Repiquage de fraisiers dans une hotte à flux laminaire.

et d'autre part des conditions de culture parfaitement contrôlées (milieux de culture définis pour chaque type de plante, température, lumière, humidité,...).



Éléments minéraux et organiques rentrant dans la composition d'un milieu de culture.



Chambre de culture. Les conditions de lumière

Ce qui nécessite la mise en oeuvre d'une infrastructure matérielle relativement sommaire et peu onéreuse.

Ces méthodes s'appliquent des organes ou des fragments d'organes, les explants :

- graine immature,
- embryon,
- ovule
- pollen
- bourgeon terminal
- bourgeon axillaire
- morceau de tige
- morceau de feuille
- morceau de pétale
- etc



L'explant doit trouver dans le milieu de culture tout ce dont il a besoin pour survivre, se multiplier et éventuellement régénérer un nouvel individu, en fait, tout ce que la plante mère peut fournir:

- a) par les racines: les éléments minéraux, l'eau
- b) par les feuilles et grâce à la photosynthèse : des sucres, des vitamines et des acides aminés
- c) les hormones, pour orienter la formation des organes.

La réussite de ces procédés de culture « accélérés » reposent sur la qualité du support, du substrat utilisé :
 entreront dans la composition du milieu de culture, des éléments minéraux ainsi que des éléments organiques et éventuellement des régulateurs de croissance (hormones).

LES ÉLÉMENTS MINÉRAUX:

1- Les macroéléments interviennent en grande quantité.

Il s'agit de 6 éléments présents à des concentrations élevées tels que l'azote (N), le calcium (Ca), le potassium (K), le soufre (S), le magnésium (Mg) et le phosphore (P).

2- Les microéléments appelés parfois oligo-éléments, et bien qu'ils ne soient nécessaires à la plante qu'en faibles concentrations, leur rôle est essentiel.

Les principaux d'entre eux sont le fer (Fe), le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le molybdène (Mo), le bore (B) et le chlore (Cl), le cobalt (Co), le nickel (Ni), etc...

LES ÉLÉMENTS ORGANIQUES:

1- Les sucres

Dans le cas de tissus végétaux placés en culture in vitro, l'assimilation chlorophyllienne est nulle ou insuffisante pour assurer la survie et le développement de l'explant.

Dès lors, on ajoute des sucres, le plus souvent du saccharose, aux milieux de culture pour fournir à l'explant une source, de carbone. Dans la nature, les sucres sont photosynthétisés à partir du gaz carbo atmosphérique et de l'eau du sol.

2- Les vitamines

L'emploi de diverses vitamines favorise fréquemment le développement des cultures in vitro: elles appartiennent essentiellement au groupe B.

3- Les acides aminés

Il a parfois été observé que l'apport d'acides aminés favorisait la prolifération.

LES RÉGULATEURS DE CROISSANCE:

Appelés généralement hormones végétales, ils induisent les phénomènes de croissance et de néoformation des organes.

On trouve ces substances de croissance naturellement dans toutes les plantes; cependant, on a pu synthétiser artificiellement des molécules possédant les mêmes propriétés.

Les hormones utilisées sont principalement :

- les auxines,
- les cytokinines,

car ces hormones sont capables d'orienter les explants vers la formation de nouveaux organes.

Les milieux ainsi constitués sont liquides. Il est nécessaire de les solidifier par l'ajout d'un gélifiant pour éviter que les explants ne tombent au fond des récipients et ne pourrissent.

Différents types de multiplications *in vitro* sont utilisables facilement et permettent une croissance accélérée:

- La multiplication par bourgeonnement axillaire

Le point de départ est un bourgeon terminal ou axillaire. Cette technique de micropropagation ne fait qu'accélérer in vitro le fonctionnement normal des bourgeons déjà formés sur une plante.

L'explant initial peut être soit un méristème, soit un bourgeon, soit un fragment de tige comportant au moins un bourgeon axillaire.

Sur un milieu approprié comprenant des cytokinines, le méristème se divise ou le bourgeon débouffe et développent tous les deux une tige ou une touffe feuillée. Cette tige peut être découpée en fragments (noeuds) qui, remis sur le milieu, vont redonner autant de touffes feuillées qui peuvent être aussi subdivisées : c'est la phase de multiplication. Les tiges peuvent alors être transférées sur un milieu enrichi en auxines, qui permet leur enracinement.: on obtient finalement dans chaque tube une plantule complète. Les plantules sont mise en acclimatation en terre ou sur un support artificiel où elles reconstituent des plantes normales.

- La multiplication par bourgeonnement adventif

L'explant est constitué d'un fragment d'organe, d'une portion de tissu, ou même de cellules isolées. Il est placé sur un milieu contenant des cytokinines et, soit des bourgeons sont néoformés directement à partir des cellules de l'explant initial, ce qui est un phénomène rare, soit des cellules de l'explant initial se divisent rapidement et forment un cal primaire rattaché à l'explant de départ et qui donnera des bourgeons néoformés: c'est la phase de multiplication. Toutes les tiges obtenues dans les deux cas sont transférées sur un milieu enrichi en auxine qui va provoquer leur enracinement. Ensuite, les plantules sont alors acclimatées en terre où elles reconstituent des plantes normales.

- La multiplication par embryogénèse somatique

Dans une graine, on trouve la future plante sous forme d'embryon (embryon zygotique) qui résulte de la reproduction sexuée. L'embryogénèse somatique consiste à provoquer l'apparition d'embryons à partir de tissus végétaux mis en

culture in vitro. Elle apparaît le plus souvent dans les suspensions cellulaires, occasionnellement dans les cals, plus rarement directement sur les organes. Sous certaines conditions, les cultures cellulaires s'organisent en nombreux petits massifs à structure bipolaire (avec un méristème de tige et un méristème de racine) nommés embryons somatiques. Comme les embryons zygotiques (qui sont présents dans les graines), les embryons somatiques se développent, directement en plantules enracinées.

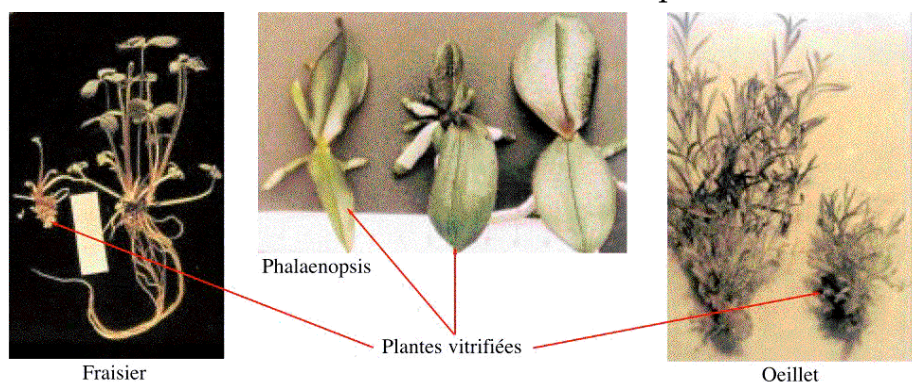
La culture in vitro permet :

- l'obtention de clones sélectionnés pour leur vigueur, leur caractères intéressants (*Chrysanthème, Bananier, etc.*) ou leur rareté (*Orchidées*), ce qui nous intéresse au premier chef ;
- l'assainissement des végétaux (*plantes sans virus*) comme, dans les recherches agronomiques pour le cas de la Pomme de terre ;
- la production rapide et en masse à n'importe quel moment de l'année ;
- le raccourcissement des cycles de développement ;
- la diminution des coûts de production (*peu de personnel*) et des dépenses énergétiques (*réduction des surfaces de culture et éclairage réduit*)
- la facilité de stockage et conservation (*au froid*) de millions de plantes sur de très petites surfaces, à l'état sain et à l'abri des contaminations
- le « rajeunissement » d'un végétal sélectionné

Néanmoins, il faut admettre qu'un certain nombre de problèmes demeurent, essentiellement :

▪ La vitrification :

certaines accidents, non prévisibles au départ, peuvent intervenir en cours de culture in vitro, comme des malformations dues à un déséquilibre hormonal.



- La perte de certaines caractéristiques :
la production répétée de grands nombres de plants uniformes (clones) peut entraîner la perte des gènes nécessaires, par exemple, à la résistance aux maladies nouvelles; il faut donc conserver les pieds mères et à certains moments, repasser par la reproduction sexuée

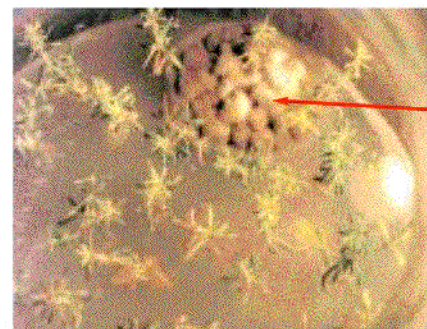
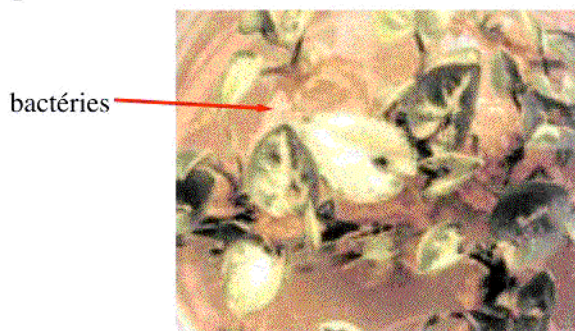


Drosera : plante normale



Drosera : plante albinos.

- Des problèmes inhérents à la technique :
 - *L'aseptie des explants, présence de micro-organismes, bactéries, champignons, virus, qui, s'ils ne sont pas totalement éliminés, contaminent la culture et tuent les jeunes plantules.*



- *L'acclimatation*
le passage à des conditions de culture normale est parfois délicat, en effet, durant son séjour in vitro, la plante est à l'abri des stress.
- *L'apparition d'anomalie génétiques*
certain cas d'hyperfloraison⁷, perte de sexualité chez certaines espèces, apparition d'organes anormaux : c'est la variation somaclonale.

⁷ Caractéristique anormale qui peut présenter un intérêt certain dans le cadre de conception de décor.
L'hyperfloraison peut être caractérisée par :

- la durée anormalement prolongée de la floraison, qui permet de travailler « dans la durée » avec un décor « stable »,
- l'intensité de la floraison ou de la végétation, qui permet l'obtention d'un décor « plus spectaculaire que nature »,
- les deux phénomènes, éventuellement.

Dans le cadre considéré du court-métrage « Éden », c'est l'implantation au sein des murs végétaux et en suspension⁸ d'orchidées colorées de grande taille.

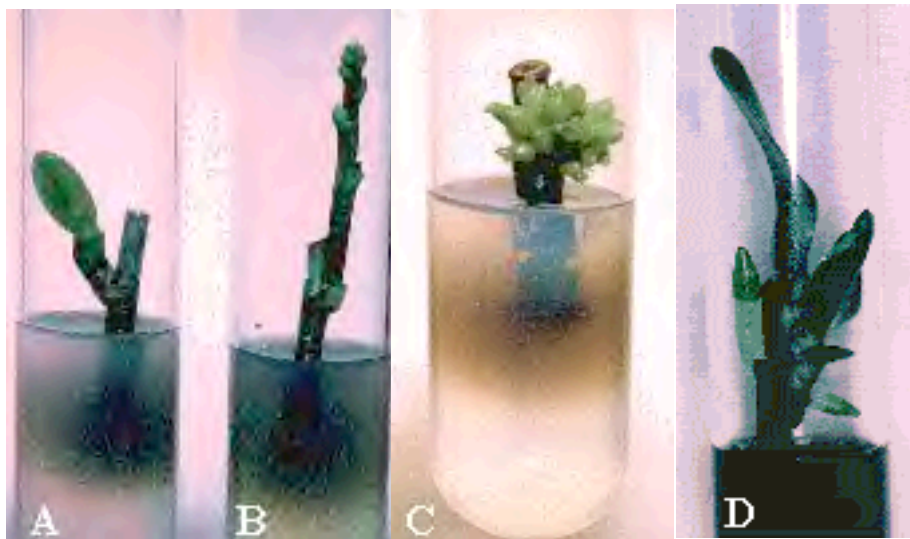
Les Orchidées botaniques, ou non (hybrides) ont des taux de germination naturel très faible (1 à 2 plantes pour un million de graines).

La méthode des semis in vitro dans un but de multiplication est d'application la plus facile. Elle permet d'avoir un pourcentage de germination très élevé (90%). La sauvegarde et le repeuplement de certaines espèces en voie de disparition ou rares est à présent possible.

Les graines sont semées sur un milieu de culture solide. Elles germent en donnant des protocormes. Les protocormes sont des structures peu différenciées directement issues du développement naturel de l'embryon des graines d'orchidées.

Par ailleurs, cultivés sur un milieu approprié et en présence de cytokinines, des protocormes peuvent être formés à partir de nombreux explants tels que

- des jeunes feuilles (Cattleya, Epidendrum, Phalaenopsis,...)
- des jeunes inflorescences (Vascostylis, Neostylis,...)
- des boutons floraux de l'inflorescence (Vanda, Dendrobium, Phalaenopsis, Oncidium, Epidendrum,...)
- des méristèmes dans ce cas, les clones seront assainis (plantes exemptes de virus et/ou de bactéries).



Microbouturage de Phalaenopsis, à partir de fragments de tige inflorescentielle comportant un noeud ou segments nodal. Les segments nodaux prélevés dans la partie inférieure de la hampe florale produisent un (A) ou plusieurs (C) bourgeons; ceux prélevés dans la partie supérieure forment généralement une "vitro-hampe" (B) dont les noeuds situés en dessous des boutons floraux peuvent également être utilisés pour la micropropagation. Des racines adventives se forment à la base des bourgeons quelques semaines après le transfert des explants sur un milieu de développement (D).

⁸ Pour les avoir en hauteur dans le champs de la caméra et donner une impression de densité exceptionnelle de la végétation tropicale.

Chaque protocorme néoformé évolue ensuite en une nouvelle plantule. La présence d'une autre hormone végétale, l'acide gibbérellique, favorise la germination des protocormes et l'élongation des tiges.

Lorsque les jeunes plantules présentent 3 à 4 feuilles et une taille de 5 à 7 cm, elles sont transférées dans un pot contenant un substrat horticole pour orchidées.



Par la technique *in vitro*, on peut, rapidement, obtenir un grand nombre de plants identiques (*mériclones*), repondant aux caractéristiques recherchées (*taille, couleurs, floraison, etc.*) permettant la mise place des décors « tropicaux » envisagés

sans recours spécifique aux méthodes usuellement utilisées.



Phalaenopsis obtenues « *in vitro* »

En haut : *Dendrobium thyrsiflorum* & *Pallaenopsis*

A droite : plan de *Bulbophyllum*

En bas : *Catasetum Orchidglade*