



HAL
open science

Observations sur la multiplication *in vitro* de la tulipe (*Tulipa gesneriaha* L.) à partir de hampes florales prélevées chez des bulbes en cours de conservation

Marcel Le Nard, Christine Ducommun, Gwenaëlle Weber, Noëlle Dorion,
Claude Bigot, Monique Casenave, Jean Leboeuf

► To cite this version:

Marcel Le Nard, Christine Ducommun, Gwenaëlle Weber, Noëlle Dorion, Claude Bigot, et al.. Observations sur la multiplication *in vitro* de la tulipe (*Tulipa gesneriaha* L.) à partir de hampes florales prélevées chez des bulbes en cours de conservation. *Agronomie*, 1987, 7 (5), pp.321-329. hal-00884997

HAL Id: hal-00884997

<https://hal.science/hal-00884997>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Observations sur la multiplication *in vitro* de la tulipe (*Tulipa gesneriana* L.) à partir de hampes florales prélevées chez des bulbes en cours de conservation

Marcel LE NARD, Christine DUCOMMUN (*), Gwenaëlle WEBER (*), Noëlle DORION (*) & Claude BIGOT (*)

avec la collaboration technique de Monique CASENAVE et Jean LEBOEUF

Station d'Amélioration de la pomme de terre et des plantes à bulbes, B.P. 5, F 29207 Landerneau Cedex
(*) Chaire de Physiologie Végétale Appliquée, E.N.S.H., 4, rue Hardy, F 78009 Versailles Cedex

RÉSUMÉ

Des disques de hampes florales prélevées chez des bulbes de tulipe en cours de conservation à 20 °C, cvs « Lustige Witwe », « Paul Richter » et « Apeldoorn », ont été cultivés *in vitro* et leur aptitude à la néoformation d'organes de multiplication a été étudiée.

Chez les trois cultivars, la néoformation d'organes de type foliacé à partir des tissus externes des explants a pu être observée après environ 1 mois de culture. En présence du milieu minéral de Murashige et Skoog, les conditions les plus favorables ont été les suivantes : acide α -naphtalène acétique 1 mg/l, 6-benzylaminopurine 1 mg/l ou 2-isopentényladénine 1 à 3 mg/l, obscurité, température inférieure ou égale à 20 °C. La plus grande aptitude à la néoformation a été décelée au niveau de la zone médiane de la hampe, mais le pourcentage d'explants réactifs, maximum en novembre (90 p. 100), a diminué progressivement pour s'annuler à la fin du mois de janvier.

Après un passage à température basse, 2 à 3 mois à 6 °C, suivi d'un transfert à 18-20 °C, la bulbification de certaines néoformations a été obtenue *in vitro*, en particulier quand elles avaient été produites sur un milieu contenant de la 2-isopentényladénine. Seulement un tiers des néoformations initiales a évolué en donnant des bulbes (soit 0,2 à 2 bulbes par explant ou encore 1,2 à 12 bulbes par hampe florale). Au cours de l'acclimatation, les bulbes de petite taille ont présenté un taux de survie très faible (90 p. 100 d'entre eux n'ont pas levé). Les obstacles à une multiplication rapide de la tulipe, à partir de la culture *in vitro* de fragments de hampes florales prélevées dans des bulbes en cours de conservation, sont discutés.

Mots clés additionnels : *Tulipa gesneriana* L. ; multiplication *in vitro* ; bulbification ; acclimatation ; coefficient de multiplication.

SUMMARY

In vitro multiplication of tulip (*Tulipa gesneriana* L.) from flower stem explants taken from stored bulbs.

Flower stem explants from tulip bulbs stored at 20 °C, cvs 'Lustige Witwe', 'Paul Richter' and 'Apeldoorn', were put in *in vitro* culture and their capacity to produce propagating organs was studied. For all three cultivars, production of leaf-like organs from the external tissues of the explants was observed after nearly one month of culture. In the presence of Murashige and Skoog mineral medium, the most favourable conditions were : α -naphthaleneacetic acid 1 mg/l, 6-benzylaminopurine 1 mg/l or 2-isopentenyladenine 1 to 3 mg/l, darkness, temperature below or equal to 20 °C. The highest rate of neof ormation was obtained with explants containing nodal parts. The percentage of reactive explants reached a maximum in November (90 %), then steadily decreased. No neof ormations were produced by the end of January. Following a low temperature treatment, 2 or 3 months at 6 °C, and a transfer to 18-20 °C, some of the leaf-like organs produced bulblets, especially when their neof ormation took place in the presence of 2-isopentenyladenine. Only one third of the leaf-like neof ormations produced bulblets (i.e. 0.2 to 2 bulbs per explant or 1.2 to 12 bulbs per flower stem). During acclimatization, most of the smallest bulblets did not survive (90 % did not grow). The obstacles to rapid propagation of tulip by *in vitro* culture of flower stem explants from dry stored bulbs are discussed.

Additional key words : *Tulipa gesneriana* L. ; *in vitro* propagation ; bulbing ; acclimatization ; propagation rate.

I. INTRODUCTION

La tulipe (*Tulipa gesneriana* L.) possède un bulbe à renouvellement annuel : planté, il disparaît progressivement ; il est remplacé par des bulbes-fils produits par les bourgeons végétatifs situés sur le plateau à l'aisselle des écailles, à raison généralement d'un bourgeon par écaille. Le nombre d'écailles fixe donc la potentialité de multiplication d'un bulbe : selon sa taille, ce nombre varie d'un minimum de 2 à un maximum de 6, mais par suite de l'existence de relations de dominance entre les bourgeons, seule une partie d'entre eux se transforment en bulbes-fils. De ce fait, le coefficient réel de multiplication d'un cultivar de tulipe se situe aux environs de 2 ou 3, ce qui constitue évidemment un frein à la diffusion rapide de nouveaux génotypes.

Une telle situation explique que des recherches aient été entreprises pour tenter de mettre au point une méthode de multiplication rapide de la tulipe à partir de cultures de tissus *in vitro*. Les premiers résultats positifs furent ceux de BANCILHON (1974) qui obtint des bourgeons de néoformation à partir de disques de hampes florales prélevées dans des bulbes en cours de conservation, c'est-à-dire à un stade où le bourgeon floral n'a pas encore commencé sa croissance active.

Utilisant le même type de tissus, mais des conditions expérimentales différentes, WRIGHT & ALDERSON (1980), dans un premier temps, confirmèrent ces résultats puis, dans un deuxième temps, réussirent à provoquer la bulbification *in vitro* (ALDERSON *et al.*, 1983a et b ; RICE *et al.*, 1983).

A partir de fragments d'écailles prélevées soit chez des bulbes ayant à peine commencé leur développement (RIVIÈRE & MULLER, 1979), soit chez des bulbes en fin de grossissement ou en cours de conservation (NISHIUCHI, 1979, 1980, 1982), une néoformation de bourgeons puis une production de bulbes *in vitro* ont également été obtenues. Les coefficients de multiplication observés n'ont toutefois pas été clairement chiffrés.

Comme dans le cas de plantes entières (LE NARD & COHAT, 1968), l'induction de la bulbification *in vitro* n'est possible que lorsque les bourgeons de néoformation sont placés pendant quelques semaines à température basse. La bulbification proprement dite se réalise ensuite après transfert à température plus élevée, 20° à 25 °C, et est favorisée par une forte concentration, 60 g/l, de saccharose dans le milieu (NISHIUCHI, 1980 ; RICE *et al.*, 1983).

Lors de la mise en culture de disques de hampes florales prélevées chez des bulbes en cours de conservation, nous n'avons pas toujours réussi à reproduire les résultats de BANCILHON (1974) ni ceux de WRIGHT & ALDERSON (1980). Ceci a conduit à mettre en place des recherches destinées à mieux préciser l'influence d'un certain nombre de paramètres (génotype, facteurs de l'environnement des cultures, nature des régulateurs, ...) tant sur l'obtention de néoformations que sur la bulbification *in vitro*.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Des bulbes, d'une circonférence comprise entre 11 et 12 cm, appartenant aux cultivars « Lustige Witwe »

(synom. : « Veuve Joyeuse », « Merry widow »), « Paul Richter » et « Apeldoorn », après un passage d'une semaine à 34 °C dès leur récolte au début du mois de juin sont conservés ensuite à 19-20 °C à l'obscurité. Dans ces conditions, après sa différenciation, le bourgeon floral manifeste une croissance très lente et il s'en suit que ses caractéristiques physiologiques évoluent dans le temps.

Des hampes florales ont été prélevées, périodiquement, de la fin du mois de septembre à la fin janvier. Pour effectuer ces prélèvements, les bulbes, après avoir été débarrassés de leur tunique, sont désinfectés par un passage rapide dans l'alcool à 70 ° (30 s) suivi d'un trempage dans une solution filtrée d'hypochlorite de calcium à 10 p. 100, additionnée de quelques gouttes de mouillant, pendant 30 mn. Ils sont ensuite rincés 3 fois à l'eau distillée stérile. Par dissection, le bourgeon floral, constitué généralement de 4 entrenœuds et d'une fleur complète (fig. 1) est dégagé du bulbe. Après suppression des feuilles et de la fleur terminale, la hampe florale est fragmentée en disques (fig. 1) d'une épaisseur comprise entre 1 et 1,5 mm. Lors des premières mises en culture (fin septembre), la longueur de la hampe est de l'ordre de 8 à 9 mm, ce qui permet de prélever 6 explants, nombre qui sera maintenu constant au cours de toutes les manipulations.

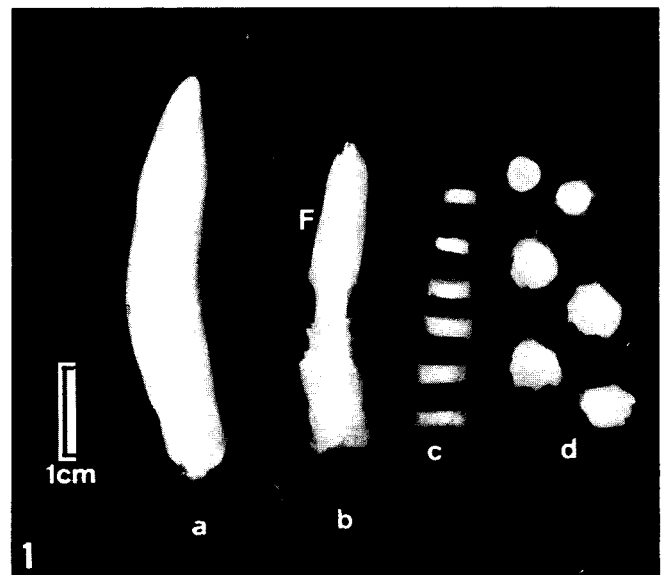


Figure 1

Méthodologie de prélèvement à partir de la jeune hampe florale (a : hampe avec feuilles ; b : hampe avant découpage avec la fleur terminale F ; c : explants vus sur le côté ; d : explants vus à plat).

Method for sampling from young stalk (a : with leaves ; b : before cutting up, with terminal flower F ; c : explants seen from the side and d : explants before putting in culture).

Les disques ont été placés en respectant la polarité (section basale au contact du milieu) dans des tubes de 25 mm × 150 mm contenant 20 ml de milieu. Deux formules de base ont été utilisées :

— la première, désignée par A, est constituée des macroéléments, microéléments et vitamines de MURASHIGE & SKOOG (1962) additionnés de 500 mg/l d'hydrolysate de caséine, de saccharose (30 g/l) et de

régulateurs de croissance à raison de 1 mg/l d'acide naphthalène acétique (auxine ; ANA) et de 1 mg/l de benzylaminopurine (cytokinine ; BAP) ;

— la seconde, désignée par B, comprend, outre les éléments minéraux de MURASHIGE & SKOOG, 500 mg/l d'hydrolysate de caséine, 20 mg/l de glycine, 200 mg/l de L-glutamine, 5 mg/l d'acide nicotinique, 100 mg/l de myo-inositol, 10 mg/l de thiamine, 1 mg/l de pyridoxine et 30 g/l de saccharose, milieu inspiré de NISHIUCHI (1979), et complété par des régulateurs de croissance dont la nature et la concentration ont pu varier selon les expériences.

Le pH des milieux A et B est ajusté à 6,1 avec KOH avant addition de gélose (Bacto agar Difco, 8 g/l) et autoclavage (110 °C ; 20 mn).

Dans le cas où les cultures ont été placées à la lumière, l'éclairage était fourni par des tubes fluorescents en mélange, pour moitié du type blanc soleil de luxe (Philips 40 W) et pour moitié de type Gro-lux (Sylvania 40 W) pendant 16 h par jour.

La température de culture sera précisée lors de la présentation des résultats.

III. RÉSULTATS

A. Facteurs influençant l'organogénèse

Après leur mise en culture, les disques de hampe florale présentent d'abord un allongement, plus ou moins important selon l'origine de l'explant et les conditions de culture. Cette croissance est limitée si, dans les semaines qui suivent la mise en culture, on observe, à partir des tissus externes, la production d'organes ayant un aspect de feuilles et qui seront appelés ici néoformations foliacées. Celles-ci peuvent être bien individualisées, mais sont parfois fasciées (fig. 2). La présence d'au moins une de ces néoformations (taille supérieure ou égale à 1 mm) caractérisera un explant réactif.

Les explants qui ne produisent pas de néoformations se nécrosent plus ou moins rapidement. Ceci indique que les néoformations constituent des zones actives semblant indispensables à la survie de l'explant lui-même.

1. Influence des conditions de l'environnement

Deux facteurs ont été étudiés : lumière et température.

a) Influence de la lumière

Des disques de hampes florales des cultivars « Paul Richter » et « Lustige Witwe » ont été placés sur les milieux A et B (cf. matériels et méthodes), à 20 °C, soit à l'obscurité, soit à la lumière. Les résultats du tableau 1 indiquent que les deux cultivars ont des comportements différents. A la lumière, la production de néoformations foliacées paraît totalement inhibée chez « Paul Richter » alors qu'elle est possible chez un certain nombre d'explants de « Lustige Witwe ». La culture à l'obscurité entraîne un accroissement du nombre d'explants réactifs chez « Lustige Witwe » d'une part, et permet la production de néoformations

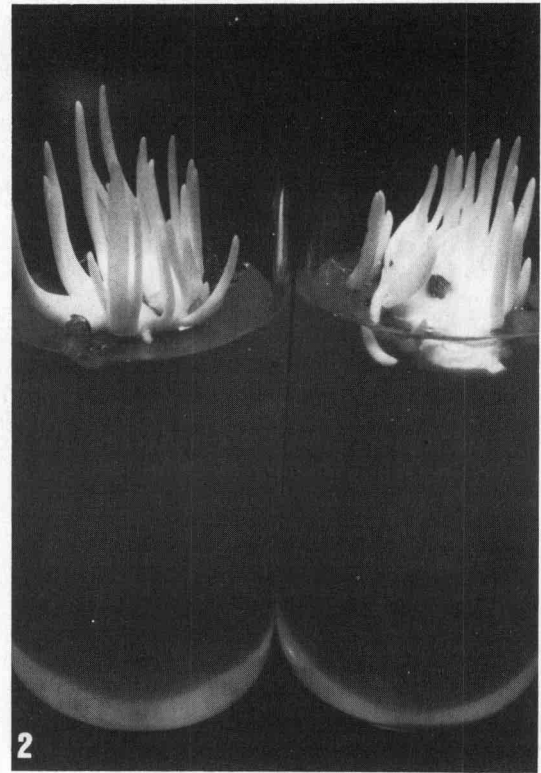


Figure 2

Néoformations foliacées à partir de fragments de hampe florale après 2 mois de culture à l'obscurité (détail dans le texte).

Leafy neoformations from flower stem explants after two months of culture in darkness (see detail in text).

TABLEAU 1

Influence des conditions d'éclairage sur le nombre d'explants produisant des néoformations foliacées.

(Mise en culture de 48 explants par traitement ; milieux A et B : cf. matériel et méthodes ; observations après 1 mois de culture ; pourcentage d'explants réactifs entre parenthèses).

Effect of environmental conditions on the number of explants with leafy neoformations.

(48 explants per treatment ; medium A and B as in materials and methods ; observation after one month ; percentage of reactive explants in brackets).

Conditions de culture	« Lustige Witwe »		« Paul Richter »	
	Milieu A	Milieu B	Milieu A	Milieu B
Lumière	6 (12,5)	20 (41)	0	0
Obscurité	23 (48)	30 (62)	19 (40)	32 (66)

foliacées chez « Paul Richter » d'autre part. La réactivité des explants de « Paul Richter » est alors pratiquement équivalente à ceux de « Lustige Witwe ».

La culture à l'obscurité favorise donc la production de néoformations foliacées et homogénéise les comportements des deux cultivars. En condition éclairée, le résultat paraît fortement dépendant du génotype utilisé.

L'influence favorable de l'obscurité sur la production de néoformations foliacées a été confirmée pour le cultivar « Apeldoorn ».

b) Influence de la température

Des disques de hampes florales des cultivars « Paul Richter » et « Apeldoorn », cultivés sur le milieu B contenant de l'ANA (1 mg/l) et de la BAP (1 mg/l), ont été placés à 18 °C, 22 °C ou 27 °C, à l'obscurité.

Les résultats de la figure 3 mettent en évidence l'influence défavorable de la température de 27 °C, tant sur le nombre d'explants réactifs que sur le nombre moyen de néoformations foliacées par explant. Ceci est particulièrement net pour « Paul Richter » dont les explants réagissent d'autant mieux qu'ils sont placés à température plus basse, 18 °C. Pour « Apeldoorn », les résultats obtenus à 18° et 22 °C sont très comparables. Ce cultivar produit, pour des mêmes conditions de culture, nettement moins de néoformations foliacées que « Paul Richter ».

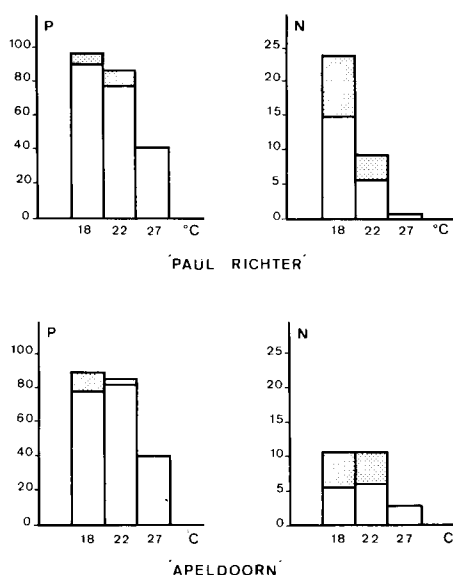


Figure 3

Influence de la température sur la production de néoformations foliacées (P : pourcentage d'explants réactifs ; N : nombre moyen de néoformations rapporté au nombre total d'explants ; : observation après un mois ; : observation après 2 mois).

Temperature effect upon leafy neoformation production (P : % reactive explants ; N : mean number of neoformations per explant ; : observation after one month ; : observation after 2 months).

Ces observations indiquent qu'une température moyenne, inférieure ou égale à 20 °C, paraît la plus favorable mais des différences d'exigences semblent exister selon les cultivars.

Les graphiques de la figure 3 permettent également de constater que la production des néoformations foliacées est échelonnée dans le temps : à 18 °C, chez « Paul Richter », le nombre moyen de néoformations passe de 15 à 24 de la fin du premier à la fin du deuxième mois, et chez « Apeldoorn », de 6 à 11 dans le même temps. Les conséquences de cette asynchronie dans la production des néoformations seront discutées plus loin.

2. Influence de l'origine de l'explant

Les résultats du tableau 2 mettent en évidence que la réaction des explants varie selon la zone de prélèvement sur la hampe florale.

TABLEAU 2

Influence de la zone d'origine de l'explant sur le nombre de disques produisant des néoformations foliacées (Observations après 1 mois de culture ; mises en culture de mi-octobre à mi-novembre de 64 explants par zone de prélèvement ; culture à 18-20 °C, obscurité, milieu B avec ANA 1 mg/l + BAP 1 mg/l ; pourcentage d'explants réactifs entre parenthèses).

Effect of explant origin on the number of explants with leafy neoformations (after one month ; 64 explants per zone collected from mid-October to mid-November ; 18-20 °C, darkness, medium B with NAA 1 mg/l + BAP 1 mg/l ; percentage of reactive explants in brackets).

Cultivar	« Paul Richter »	« Apeldoorn »	« Lustige Witwe »
Explant n° 1 (apical)	32 (50)	36 (57)	16 (25)
Explant n° 2	27 (42)	56 (88)	30 (47)
Explant n° 3	51 (79)	53 (83)	36 (56)
Explant n° 4	46 (72)	47 (74)	42 (65)
Explant n° 5	38 (59)	34 (54)	38 (59)
Explant n° 6 (basal)	22 (35)	24 (38)	31 (48)

Pour les trois cultivars (malgré des différences dans les valeurs des pourcentages), il apparaît que les disques provenant de la partie médiane de la hampe florale (zone d'insertion des feuilles) fournissent 65 à 88 p. 100 d'explants réactifs, alors que 25 à 50 p. 100 seulement des disques provenant de la zone basale ou de la zone apicale (dernier entre-nœud portant la fleur) présentent des néoformations foliacées. La hampe florale de la tulipe apparaît donc constituée de portions caulinaires hétérogènes qui, placées dans les mêmes conditions de culture, ont des potentialités différentes d'organogenèse.

3. Influence de la date de prélèvement des hampes florales

Les courbes de la figure 4 représentent pour les cultivars « Paul Richter » et « Apeldoorn », l'évolution des pourcentages d'explants réactifs pour des hampes florales prélevées entre la mi-octobre et la fin janvier chez des bulbes conservés à 19°-20 °C.

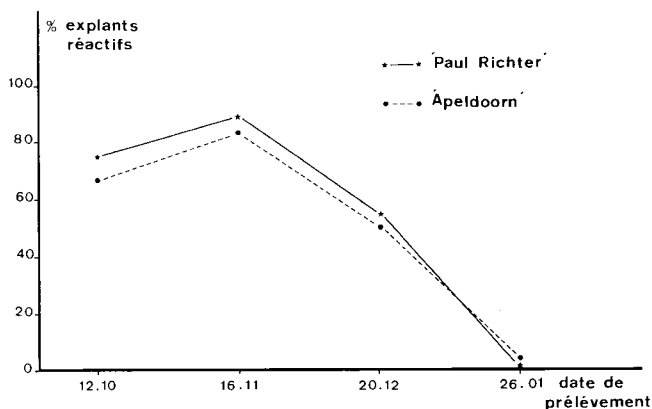


Figure 4

Influence de la date de prélèvement des hampes florales sur le pourcentage d'explants produisant des néoformations foliacées (après 2 mois de culture).

Influence of stalk sampling date on the percentage of explants with leafy neoformations (after 2 months in culture as described in text).

Chez les 2 cultivars, le nombre d'explants réactifs est le plus élevé jusqu'à la mi-novembre, décroît ensuite, pour devenir nul à la fin janvier.

Une telle évolution peut s'expliquer si l'on prend en compte :

— d'une part, l'hétérogénéité liée à la zone d'origine des explants. Au cours de la conservation, la hampe commence sa croissance. Or, le nombre de fragments a été maintenu à 6, ce qui conduit à mettre en culture une plus forte proportion d'explants provenant de la zone médiane dans un premier temps (jusqu'en novembre). On a vu que cette zone a une plus grande aptitude à la néoformation ;

— d'autre part, l'entrée en sénescence progressive de la hampe florale à partir de la zone apicale vers la base au cours de la conservation à 19°-20 °C (LE NARD & COHAT, 1968), ce qui se traduit dans un deuxième temps par une diminution rapide du pourcentage d'explants réactifs (du 20 décembre à fin janvier).

4. Influence de la composition du milieu de culture

Il convient d'abord de rappeler que l'utilisation du milieu B, plus riche en composés organiques que le milieu A, a permis d'obtenir une meilleure activation des explants (tabl. 1).

Par ailleurs, on sait que généralement la nature de la cytokinine utilisée et sa concentration ont une influence sur l'organogénèse.

Une étude de l'effet comparé de la benzylaminopurine (BAP), et de la 2-isopentényladénine (2 iP) a alors été réalisée, la nature de l'auxine et sa concentration restant inchangées (ANA 1 mg/l).

Les résultats portés dans le tableau 3 montrent qu'une augmentation de la concentration en BAP de 1 mg/l à 5 mg/l, entraîne une réduction du nombre d'explants produisant des néoformations foliacées. Cette réduction est moins nette dans le cas de l'utilisation de 2 iP.

D'autre part, la BAP inhibe complètement la néoformation de racines à partir des explants, contrairement à la 2 iP pour laquelle la concentration dans le milieu n'a aucune influence sur le pourcentage de fragments entrant en phase rhizogène (tabl. 3 ; fig. 5).

TABLEAU 3

Influence de la nature et de la concentration de la cytokinine sur l'organogénèse dans le cas du cv. « Paul Richter » (48 explants par traitement ; après 4 mois à 18 °C, obscurité ; milieu B en présence d'ANA 1 mg/l).

Cytokinin effect on organogenesis (cv. 'Paul Richter') (48 explants/treatment ; after 4 months, 18 °C, darkness ; medium B with NAA 1 mg/l).

Nature et concentration de la cytokinine	Nombre d'explants avec néoformations foliacées (pourcentage)	Nombre d'explants avec racines (pourcentage)
BAP 1 mg/l	36 (75)	0
BAP 3 mg/l	35 (72)	0
BAP 5 mg/l	13 (27)	0
2 iP 1 mg/l	31 (64)	35 (72)
2 iP 3 mg/l	28 (58)	33 (68)
2 iP 5 mg/l	22 (45)	33 (68)

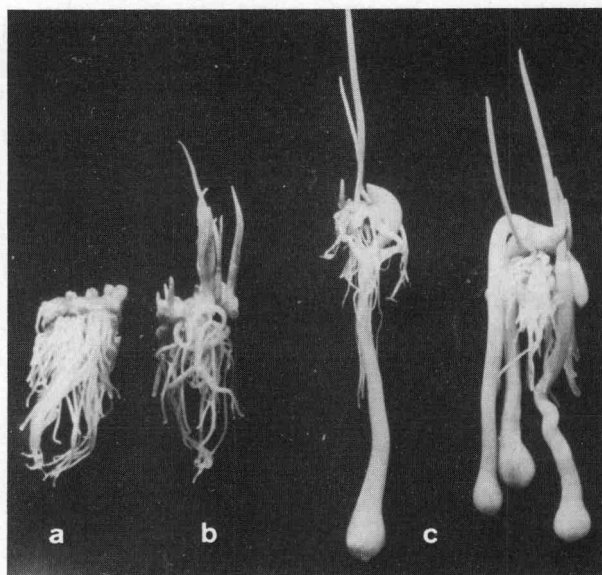


Figure 5

Evolution des explants cultivés sur un milieu contenant 2 iP 3 mg/l, cv. « Paul Richter »

(a : explants avec racines sans néoformations foliacées ; b : explants avec racines et néoformations foliacées ; c : explants avec stolons tubérisés après passage au froid à 5 °C).

Explant development on medium with 2-iP 3 mg/l, cv. 'Paul Richter' (a : rooted explants without leafy neoformations ; b : explants with roots and leafy neoformations ; c : explants with droppers after cold treatment at 5 °C).

Il apparaît donc que la nature de la cytokinine et sa concentration influencent nettement l'organogénèse manifestée par les fragments de hampe florale. Ces résultats ont été obtenus avec le cultivar « Paul Richter », mais des observations comparables concernant l'influence favorable de la 2 iP sur l'organogénèse ont également été faites avec « Apeldoorn » et « Lustige Witwe ». Des différences entre cultivars se situeraient toutefois au niveau de la concentration en 2 iP la plus favorable et au niveau de l'intensité de réaction des explants.

B. Obtention de bulbes *in vitro*

Il faut d'abord signaler que, dans nos conditions expérimentales, l'éclairage a eu peu d'influence sur l'induction puis sur la réalisation de la bulbification (résultats non publiés).

Les bulbes obtenus *in vitro* se sont formés, principalement, soit à l'intérieur de la base des néoformations foliacées (fig. 6), soit à l'intérieur et à l'extrémité d'organes provenant de la croissance de la base de néoformations foliacées (fig. 5). Ces organes, appelés ici stolons (ou « dropper »), permettent l'enfouissement des bulbes. Ils sont normalement observés chez les semis de Tulipe et chez les petits bulbes issus de semis mais n'existent généralement pas chez les bulbes florifères (LE NARD, 1977). Quelques bulbes ont aussi été produits par des petits « bourgeons », ne possédant pas d'organes foliacés, situés très souvent à l'aisselle des néoformations foliacées initiales (fig. 6).

Il a toutefois été observé que l'accroissement de volume des bulbes et leur site de formation pouvaient

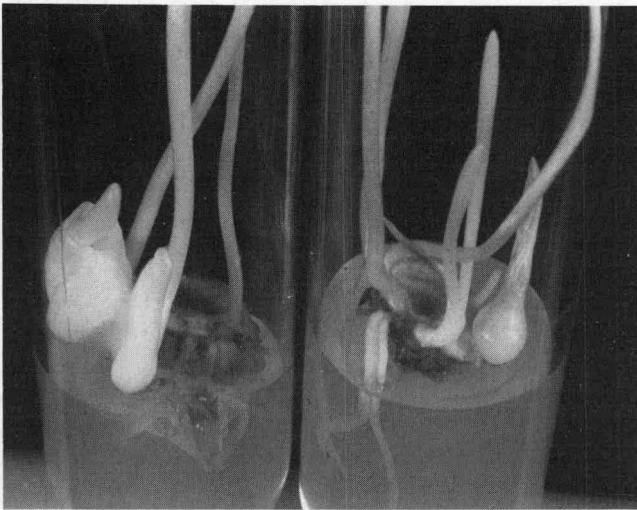


Figure 6

Fragments de hampes florales cultivés 2 mois à 18 °C (milieu, cf. texte), placé 8 semaines à 6 °C sur milieu sans régulateur : bulbification après 2 mois à 18 °C à l'obscurité (cv. « Paul Richter »).

Stalk explants cultured during 2 months at 18 °C (medium, see text) and put during 8 weeks at 6 °C on medium without growth regulators : bulbing after 2 months at 18 °C in darkness (cv. 'Paul Richter').

être influencés par quelques facteurs étudiés ci-dessous.

1. Influence d'un repiquage des explants sur un milieu sans régulateurs de croissance

Des explants ont été cultivés à 18°-20 °C, à l'obscurité, pendant 4 mois, sur le milieu B additionné d'ANA (1 mg/l), et de BAP (1 mg/l). Les explants possédant des néoformations foliacées ont été répartis en 2 lots homogènes puis repiqués sur le même milieu avec ou sans régulateurs de croissance mais enrichi en saccharose (60 g/l). Après un passage de 3 mois à 6 °C, les explants ont été transférés à 20 °C.

Les courbes de la figure 7 indiquent que la bulbification semble pouvoir se réaliser plus rapidement à la suite d'un repiquage des explants sur le milieu sans régulateurs de croissance.

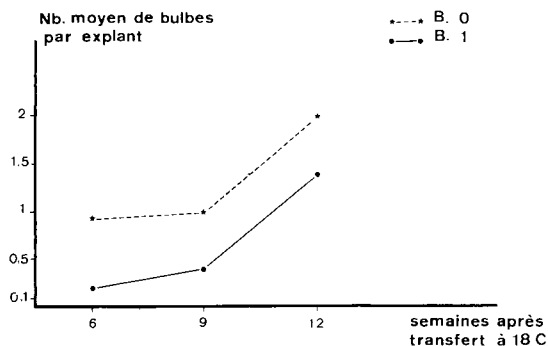


Figure 7

Evolution de la bulbification après repiquage sur un milieu avec ou sans régulateurs de croissance, cv. « Paul Richter ».

B₁ : ANA 1 mg/l + BAP 1 mg/l ; B₀ ; sans régulateurs ; explants placés 2 mois à 6 °C puis transférés à 18 °C, obscurité.

Progress of bulbing after subculture on media with or without growth regulators, cv. 'Paul Richter'.

2. Influence de la nature et de la concentration de la cytokinine utilisées dans le milieu de production de néoformations foliacées

L'influence de la 2 iP a été comparée à celle de la BAP. Les résultats portés dans le tableau 4 indiquent que l'utilisation de la 2 iP dans le milieu favorable à l'organogenèse a permis d'obtenir, après repiquage sur un milieu sans régulateurs de croissance, un nombre nettement plus élevé de bulbes. Pour 8 hampes florales mises en culture, l'utilisation de la 2 iP à 3 mg/l conduit à l'obtention de 58 bulbes, contre 25 bulbes au maximum en présence de BAP à 1 mg/l.

Dans le cas du cultivar « Paul Richter », la concentration en 2 iP la plus favorable semble se situer aux environs de 3 mg/l, sans un effet trop dépressif d'un accroissement de la concentration jusqu'à 5 mg/l. En revanche, une augmentation de la concentration en BAP de 1 à 5 mg/l tend à réduire puis à supprimer toute production ultérieure de bulbes (tabl. 4). La nature de la cytokinine utilisée dans le milieu de production des néoformations foliacées influence aussi, ultérieurement, le site de formation des bulbes. Après utilisation de la BAP, la majeure partie des bulbes a été produite à la base des néoformations foliacées. En revanche, l'utilisation de 2 iP conduit à la production d'un grand nombre de stolons qui contiennent les bulbes à leur extrémité (fig. 5).

TABLEAU 4

Arrière-effet de la nature et de la concentration de la cytokinine sur la production de bulbes dans le cas du cv. « Paul Richter » (Milieu B₀ et conditions standard comme pour la figure 7 ; 48 explants).

Cytokinin after-effect on bulb formation (cv. 'Paul Richter'). (B₀ medium and standard conditions as in fig. 7 ; 48 explants).

Nature et concentration de la cytokinine	Nombre total de bulbes produits	Nombre d'explants avec stolons	Nombre de stolons/explant	Coefficient de multiplication*
BAP 1 mg/l	25	10	1,6	3,1
BAP 3 mg/l	18	2	1	2,2
BAP 5 mg/l	0	0	0	0
2 iP 1 mg/l	32	19	1,7	4,0
2 iP 3 mg/l	58	23	2,1	7,2
2 iP 5 mg/l	45	19	1,8	5,6

(*) Le coefficient de multiplication est relatif au nombre de bulbes obtenus par hampe florale, donc par bulbe-mère.

Il apparaît donc que les effets de la cytokinine utilisée dans le milieu d'obtention des néoformations foliacées se manifestent non seulement sur l'intensité de cette néoformation mais également beaucoup plus tard sur le nombre de bulbes ainsi que sur les modalités de leur formation.

3. Evolution de la bulbification en fonction du nombre de néoformations foliacées par explant

Après passage à température basse (6 °C), il est apparu, vis-à-vis de la production de bulbes, une grande variabilité entre les explants.

Pour essayer de mieux cerner ce problème, des explants du cultivar « Paul Richter », cultivés à 18°-

20 °C, à l'obscurité, sur le milieu B additionné de ANA (1 mg/l) et BAP (1 mg/l), ont été répartis en 3 classes selon le nombre de néoformations foliacées qu'ils possédaient : explants avec 1 à 3 néoformations, 4 à 8 néoformations et plus de 8 néoformations. Après repiquage sur un milieu sans régulateurs de croissance, ils ont été placés à 6 °C pendant 2 mois avant d'être transférés à 18 °C.

Par des observations effectuées 3 semaines après transfert à 18 °C, on a noté visuellement l'apparition de la bulbification qui se manifeste par le renflement (taille > 4 mm) de la base des néoformations ou de l'extrémité des stolons. Les explants sont sortis des tubes après 12 semaines et le nombre de bulbes effectivement formés a été compté.

La bulbification est nettement visible après 3 semaines à 18 °C (fig. 8) ; les fragments comportant entre 4 et 8 néoformations présentent la proportion la plus élevée (60 p. 100) d'ébauches en voie de bulbification. On constate d'autre part qu'aucune nouvelle ébauche ne manifeste en général, au cours des semaines suivantes, le processus de bulbification. On constate que le nombre de bulbes récoltés est toujours inférieur à celui des néoformations dont la base avait manifesté un grossissement, sauf pour la classe des explants comportant plus de 8 ébauches foliacées en début d'expérience. Après 12 semaines, *moins du tiers des néoformations produisent des bulbes dont le nombre moyen par explant reste faible* (de 0,6 à 3,3) mais dépend de la classe considérée.

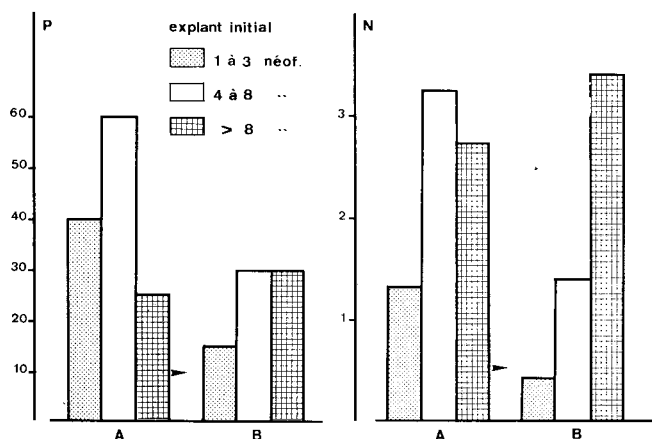


Figure 8

Pourcentage (P) et nombre (N) de néoformations foliacées manifestant un début de bulbification après 3 semaines (A) donnant naissance à des bulbes après 12 semaines (B) en fonction du nombre initial de néoformations par explant (cv. « Paul Richter » ; détail dans le texte).

Percentage (P) and number (N) of leafy neoformations forming bulblets after three weeks (A), or giving rise to bulblets after twelve weeks (B), in relation to initial number of neoformations per explant (cv. 'Paul Richter' ; see details in text).

Il a par ailleurs été observé que les bulbes obtenus sont en moyenne de plus petite taille quand leur nombre par explant est plus élevé.

C. Evolution des bulbes obtenus *in vitro*

Les bulbes obtenus *in vitro* sont généralement constitués d'une écaille charnue protégeant un méristème (fig. 9). Ils possèdent ou non une tunique membra-

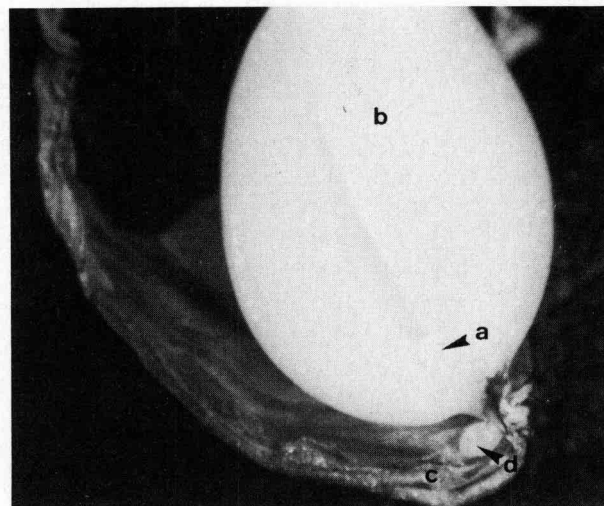


Figure 9

Bulbe avec méristème formé *in vitro* à partir des néoformations foliacées (a : méristème principal ; b : écaille ; c : tunique ; d : axillaire de tunique).

In vitro bulblet with meristem formed from a leafy neoformation (a : meristem ; b : scale ; c : tunica ; d : tunica bulblet).

neuse selon qu'ils se sont formés à l'intérieur d'une néoformation foliacée ou d'un stolon, ou qu'ils proviennent de « bourgeons » sans organe foliacé.

Après leur sortie de tube, des bulbes ont été répartis en 4 classes en fonction de leur diamètre : inférieur à 4 mm, entre 4 et 8 mm, entre 8 et 12 mm et supérieur à 12 mm. Plantés en pleine terre, en conditions naturelles, au début du mois de novembre, ils ont manifesté une croissance aérienne à partir du mois de janvier. Mais, comme le montre le tableau 5, une assez grande quantité de bulbes n'a pas levé, surtout pour la classe de diamètre inférieur à 4 mm (91 p. 100). Ceci était essentiellement dû au fait que ces bulbes s'étaient déshydratés, probablement à cause d'une insuffisance de maturité lors de la sortie de tube. On récolte en effet, à partir d'un explant, des bulbes qui non seulement sont de tailles différentes mais présentent des degrés de maturité différents, les plus petits étant généralement les moins « mûrs » et semblant les plus sujets à la déshydratation.

TABEAU 5

Comportement, après plantation, de bulbes de différentes tailles obtenus *in vitro*.

Behaviour in soil of bulblets (different sizes) from *in vitro* culture.

Diamètre des bulbes en mm	Nombre de bulbes plantés	Nombre de bulbes n'ayant pas levé (%)
< 4	82	75 (91,5)
4-8	116	53 (45,7)
8-12	54	14 (25,9)
>12	10	1 (10)

Les bulbes qui ont levé ont donné naissance à des éléments de renouvellement suivant une modalité conforme à l'espèce.

IV. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

L'ensemble des observations rapportées ici met en évidence que l'évolution *in vitro* de fragments de hampe florale de tulipe, prélevées dans des bulbes en cours de conservation (20 °C), est influencée d'une part, par des facteurs internes, c'est-à-dire liés aux caractéristiques des tissus eux-mêmes, et, d'autre part, par les conditions de réalisation des cultures (environnement, composition du milieu).

Le fractionnement de la hampe florale conduit à mettre en culture des tissus qui présentent des aptitudes variables à produire des néoformations foliacées dépendant de la zone de prélèvement et aussi du moment du prélèvement. Cette aptitude évolue en effet dans le temps : elle est maximum au mois de novembre et décroît ensuite rapidement. On sait par exemple que, dans le cas des inflorescences de tabac (CROES *et al.*, 1985), des tissus dont les états physiologiques sont différents manifestent des réactions inégales dans les mêmes conditions de culture ; d'autre part, pour obtenir une activation organogène identique, la teneur et la nature des régulateurs de croissance sont à modifier (fragments de tiges de chrysanthème : MIYAKAZI & TASHIRO, 1978). Une telle situation complique évidemment la définition des conditions optimales de culture. On remarquera que nos observations concernant l'influence de la zone d'origine de l'explant sont en accord avec celles de WRIGHT & ALDERSON (1980).

Parmi les facteurs qui influencent la production de néoformations foliacées, il a été noté que les conditions d'environnement sont importantes. L'utilisation de températures moyennes 18° à 20 °C, et de l'obscurité favorise la production de néoformations foliacées. Au cours de cette étude, il est toutefois apparu qu'il peut exister une forte interaction entre le génotype utilisé et les conditions de culture. Ceci se manifeste au niveau des températures les plus favorables, mais est surtout net si l'on considère les comportements des cultivars à l'égard de la lumière. En condition éclairée, toute possibilité de production de néoformations foliacées paraît inhibée chez « Paul Richter » alors que ce n'est pas le cas pour « Lustige Witwe ».

La mise en évidence de l'influence favorable de l'obscurité confirme les observations de BANCILHON (1974) faites avec le cultivar « Paul Richter ». On peut signaler encore que les conditions d'environnement définies ici comme favorables à l'obtention de néoformations foliacées diffèrent de celles utilisées pour la stimulation de l'organogenèse à partir, soit de fragments d'écaillés de bulbes de tulipe (NISHIUCHI, 1979 ; RIVIÈRE & MULLER, 1979), soit d'embryons de tulipe (AUBERT *et al.*, 1986). Ces deux types de tissus ont en effet été cultivés à la lumière.

L'organogenèse qui se manifeste au niveau des fragments de hampe florale est également fortement influencée par la nature de la cytokinine utilisée dans le milieu de culture. La 2 iP, comparée à la BAP, entraîne une réaction organogène plus diversifiée car, outre la production de néoformations foliacées, il est possible d'observer soit l'émission de racines, soit celle de stolons (ou « dropper ») ; la formation de ces derniers organes pourrait être considérée comme un

indice de rajeunissement, car elle est observée d'habitude systématiquement dans le cas de germination de graines de tulipe et de petits bulbes issus de semis.

L'influence favorable de la 2 iP se manifeste aussi par la production d'un plus grand nombre de bulbes *in vitro* : ceci constitue un exemple de l'arrière-effet du régulateur sur un autre processus : la bulbification. Cette production, dans nos expériences, a également été favorisée par un repiquage des explants sur un milieu sans régulateurs de croissance. Bien que les racines émises à la suite de l'utilisation de la 2 iP ne paraissent pas présenter de connexions directes avec les néoformations foliacées qui donnent naissance aux bulbes (fig. 5), il n'est pas exclu qu'elles jouent un rôle dans le déroulement de la bulbification *in vitro*.

Le nombre de bulbes obtenus *in vitro* est demeuré faible. Les résultats du tableau 4 indiquent qu'à partir d'un bulbe (mise en culture d'une hampe florale), il a été possible d'obtenir avec 2 iP (3 mg/l) 7 bulbes en moyenne (exceptionnellement, jusqu'à 12 bulbes). Si l'on considère les diverses données publiées par ALDERSON *et al.* (1983a et b) pour le cultivar « Lustige Witwe », il apparaît que nos résultats avec le cv. « Paul Richter » sont très comparables à ceux de ces auteurs.

Bien qu'il soit supérieur au coefficient de multiplication naturelle de la tulipe, le nombre maximum de bulbes obtenu jusqu'à présent est encore trop faible pour envisager une multiplication *in vitro* économiquement intéressante, d'autant plus que des pertes très importantes ont été observées au cours de l'acclimatation de ces bulbes.

Comme la présence d'un plus grand nombre de néoformations foliacées par explant conduit également à la production d'un plus grand nombre de bulbes (fig. 8), il apparaît que l'augmentation du coefficient de multiplication *in vitro* de la tulipe, passe d'abord par une augmentation du nombre de néoformations foliacées. La blessure constituant l'un des éléments probables de la dédifférenciation cellulaire, puis de l'entrée en mitose suivie d'une induction organogénétique (BIGOT, 1972), il sera certainement intéressant d'étudier l'influence de la fragmentation, éventuellement répétée, des explants comme un moyen d'accroître le nombre de néoformations.

Une augmentation du nombre de bulbes obtenus *in vitro* passe enfin par une augmentation du nombre de néoformations foliacées aptes à produire des bulbes. Le fait que 30 p. 100 seulement d'entre elles évoluent en bulbes conduit à se poser au moins 2 questions :

— la première concerne la structure des néoformations obtenues : il faut en effet prouver que toutes les néoformations possèdent un « bourgeon » capable de produire un bulbe, ce qui implique qu'il y ait eu mise en place d'un méristème capable de différencier non seulement des écaillés (feuilles charnues), *mais également un plateau racinaire*. Seules des études histologiques permettraient d'apporter des éléments de réponse à cette question ;

— la seconde conduit à se demander si la bulbification n'est pas liée à un état réceptif particulier qui rend possible l'induction du processus au niveau des néoformations foliacées après un passage à tempéra-

ture basse. L'initiation de celles-ci n'étant pas synchronisée, on peut penser que sur un explant, l'état physiologique des néoformations est différent au moment de l'application du froid. Or, dans le cas d'un bulbe, on sait (LE NARD, 1972) que la bulbification est stimulée par les températures basses seulement lorsqu'il atteint une certaine « maturité physiologique » dont les caractéristiques restent à définir.

Pour renforcer cette hypothèse, ALDERSON *et al.* (1983a et b) ont observé que la meilleure production de bulbes, à partir de néoformations foliacées, était obtenue quand le traitement à température basse était appliqué à des explants préalablement cultivés pendant 14 à 18 semaines à 20 °C. De même, il a été mis en évidence que des néoformations obtenues à partir d'embryons de graines de tulipe étaient plus ou moins sensibles à l'action du froid selon leur stade de développement (AUBERT *et al.*, 1986).

En conséquence, pour espérer améliorer de façon significative la production de bulbes *in vitro*, il paraît nécessaire de déterminer des critères qui permettraient de caractériser des néoformations aptes à réagir à l'influence du froid d'une façon homogène. Une telle situation ne sera probablement observée que dans la mesure où les néoformations se trouveront toutes dans un état favorable, ce qui implique la maîtrise de la synchronisation de leur initiation ; ce n'est pas le cas actuellement.

Une telle maîtrise, conséquence d'une connaissance plus précise des facteurs internes et externes gouvernant la morphogenèse à partir des explants, pourrait avoir aussi un effet bénéfique sur l'homogénéité du développement, puis de la maturation des bulbes *in vitro* et permettrait alors une réduction des pertes lors de la réalisation du premier cycle végétatif naturel.

Les comportements parfois différents des cultivars utilisés dans nos expériences indiquent que les résultats obtenus avec un génotype ne seront pas nécessairement transposables sans modification à d'autres ; c'est un fait connu avec de nombreuses espèces comme la tomate par exemple (KURTZ & LINEBERGER, 1983). Si par certains aspects cette variabilité de réaction des génotypes à la multiplication *in vitro* constitue un handicap, elle mérite aussi d'être explorée en vue d'une exploitation éventuelle dans un programme de sélection.

Enfin, un dernier point à évoquer est la nécessité d'obtenir une multiplication à l'identique ; cette vérification est actuellement en cours avec les bulbes obtenus *in vitro*, mais les résultats ne sont pas à attendre avant 3 ou 4 ans, période nécessaire pour obtenir des bulbes de taille suffisante pour fleurir.

Reçu le 9 mai 1986.

Accepté le 10 février 1987.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alderson P. G., Rice R. D., Wright N. A., 1983a. Towards the propagation of tulip *in vitro*. *Acta Horticulturae*, 131, 39-47.
- Alderson P. G., Rice R. D., Wright N. A., 1983b. The potential for propagating tulips through tissue culture. *The Plant Propagator*, 29, 4, 10-13.
- Aubert B., Weber G., Dorion N., Le Nard M., Bigot C., 1986. Etude préliminaire sur l'organogenèse adventive à partir d'embryons de tulipe cultivés *in vitro* (*Tulipa gesneriana* L.). *Can. J. Bot.*, 64, 1837-1842.
- Bancilhon L., 1974. Premiers essais de multiplication végétative en culture *in vitro* chez *Tulipa gesneriana* L., variété « Paul Richter » (Liliacée). *C. R. Acad. Sc. Paris, série D*, t. 279, 983-986.
- Bigot C., 1972. Contrôle multiple de l'expression de l'aptitude à la néoformation de bourgeons épiphyllés chez un clone de *Begonia rex* Putz. *Soc. Bot. Fr., Mémoires*, 173-190.
- Croes A. F., Cremeers-Molenaar T., Van Den Ende G., Kemp A., Barendse G. W. M., 1985. Tissue age as an endogenous factor controlling *in vitro* bud formation on explants from the inflorescence of *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Experimental Botany*, 36, 1771-1779.
- Kurtz S. M., Lineberger R. D., 1983. Genotypic differences in morphogenic capacity of cultured leaf explants of tomato. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 108, 710-714.
- Le Nard M., 1972. Incidence de séquences de hautes et basses températures sur la différenciation des bourgeons, l'enracinement et la bulbification de la tulipe. *Ann. Amélior. Plantes*, 22, 1, 39-59.
- Le Nard M., 1977. L'amélioration de la tulipe pour l'aptitude au forçage : Recherche de critères de sélection. *Ann. Amélior. Plantes*, 27, 4, 451-463.
- Le Nard M., Cohat J., 1968. Influence des températures de conservation des bulbes sur l'élongation, la floraison et la bulbification de la tulipe (*Tulipa gesneriana* L.). *Ann. Amélior. Plantes*, 18, 2, 181-215.
- Miyazaki S., Tashiro Y., 1978. Tissue culture of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. IV. On the explant sources for stem segment culture. *Agric. Bulletin*, Saga University, 44, 67-78.
- Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
- Nishiuchi Y., 1979. Studies on vegetative propagation of tulip. II. Formation and development of adventitious buds in the excised bulb scale cultured *in vitro*. *J. Japan Soc. Hort. Sci.*, 48, 1, 99-105.
- Nishiuchi Y., 1980. Studies on vegetative propagation of tulips. IV. Regeneration of bulblets in bulb scale segments cultured *in vitro*. *J. Japan Soc. Hort. Sci.*, 49, 2, 235-240.
- Nishiuchi Y., 1982. Studies on multiplication of tulip bulb by tissue culture method. *Journal of Hokkaido University of Education (Section II B)*, 33, 1, 49-65 (Jap.).
- Rice R. D., Alderson P. G., Wright N. A., 1983. Induction of bulbing of tulip shoots *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, 20, 377-390.
- Rivière S., Muller J. F., 1979. Etude du bourgeonnement *in vitro* de l'écaille du bulbe de tulipe. *Can. J. Bot.*, 57, 19, 1986-1993.
- Wright N. A., Alderson P. G., 1980. The growth of tulip tissues *in vitro*. *Acta Horticulturae*, 109, 263-270.