

Ecole d'Ingénieurs de Lullier.  
Filière: Ingénieur Horticole.

## **La micropropagation des orchidées terrestres d'Europe.**



Agnès Bracke.  
23-27 avril 2001.

## **Sommaire:**

### **1. Introduction.**

- 1.1. Description botanique.**
- 1.2. Classification botanique.**
- 1.3. Classification phénologique.**
- 1.4. La relation mycorhizique.**
- 1.5. Les méthodes de propagation végétatives.**
- 1.6. Le choix du semis comme méthode de propagation.**

### **2. Les orchidées terrestres.**

#### **2.1. Les étapes de la culture.**

- 2.1.1. Introduction.
- 2.1.2. La pollinisation.
- 2.1.3. Le prélèvement des graines.
- 2.1.4. Les désinfections et prétraitements.
- 2.1.5. Le semis.
- 2.1.6. Le repiquage.
- 2.1.7. La mycorhization.
- 2.1.8. Le sevrage.

#### **2.2. Les conditions de culture.**

- 2.2.1. Introduction.
- 2.2.2. Méthode générale de préparation de milieux.
- 2.2.3. Méthode asymbiotique.
- 2.2.4. Méthode symbiotique.
- 2.2.5. Conditions de lumière et de température.

### **3. La culture des mycorhizes.**

- 3.1. Introduction.**
- 3.2. Le prélèvement dans la nature.**
- 3.3. L'isolation.**
- 3.4. Les tests d'efficacité.**
- 3.5. La culture et la conservation.**
- 3.6. Besoins et facteurs influençant la culture des mycorhizes.**

**4. Résultats et discussions.**

**4.1. Introduction.**

**4.2. Fiches de culture:**

*Dactylorhiza maculata.*

*Ophrys apifera.*

*Himmantoglossum hircinum.*

**4.3. Ebauche de fiche de culture de deux orchidées en danger:**

*Orchis provincialis*

*Orchis papilionacea.*

**4.4. Tableau récapitulatif des résultats de mycorhizations.**

**5. Discussions-conclusion.**

**5.1. Introduction.**

**5.2. Remarques générales sur les résultats obtenus.**

**5.3. Production à but commercial.**

**5.4. Conservation et réintroductions.**

**5.5. Exemples concrets de réintroductions.**

## **Remerciements.**

Le moment est venu de remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont permis la réalisation de ce travail de diplôme.

Dans un premier temps, j'aimerais remercier Dr. Charles Moncousin, et les Conservatoire et Jardin Botaniques de Genève. Si la réalisation de ce travail de diplôme (et donc la finalisation de mes études) a pu se faire, c'est grâce au premier, directeur de l'Ecole d'Ingénieurs de Lullier, qui a su comprendre la situation difficile dans laquelle je me trouvais. Les Conservatoire et Jardin Botaniques de Genève ont permis la matérialisation de mon travail de recherches en mettant à mon entière disposition toute leur infrastructure (bibliothèque, utilisation d'un P.C., utilisation d'internet, etc...). Plus personnellement, je citerais Sophie Dunand Martin qui, avec Dr. Ch. Moncousin, était l'autre "directeur d'étude" pour ce présent projet. J'ai également pu échanger (par ordre alphabétique) avec Maria-Dolores Ferro, Pascale Steinmann et Raymond Tripod, qui m'ont toujours répondu lorsque je venais avec des questions.

Viennent ensuite les personnes qui m'ont permis d'acquérir de nouvelles connaissances dans le domaine des orchidées terrestres: Heinrich Beyrle, Samuel Sprunger et Jean-François Weiss. Ces derniers ont, sans hésitation, transmis toute leur expérience afin que je puisse m'en servir pour l'écriture de ma monographie. Ces échanges scientifiques très ouverts m'ont beaucoup stimulée et motivée.

Je voudrais également remercier l'Agence Horticole Bernuau, Eric Menneret (Pépinière de Vézenaz), Olivier Morel (Schilliger Garden Centre SA) et Vincent Reynaud (Wyss Samen und Pflanzen AG) qui m'ont confié leurs données commerciales et/ou culturelles permettant l'élaboration de la partie commerciale de mon travail. Il n'est pas toujours évident de communiquer ces dernières, étant donné la forte concurrence régnant dans ce domaine.

Dans un dernier lieu, j'aimerais citer, pour leur soutien moral et leur aide lors de la manipulation de matériel informatique, mes parents, Han et Gerda Dieperink, les collègues de travail de mon père ainsi que ceux de la Maison des Jardiniers et Maurizio Tomei. J'ajouterais également une pensée toute particulière pour Marlyse Hauser.

## **Précision.**

Le jury a mis en évidence la fréquente utilisation impropre du mot «mycorhize» dans ce travail de diplôme. En effet, le terme désigne ici souvent le champignon et non la relation définie par une «association d'un champignon inférieur avec les racines d'une plante» (Petit Larousse Illustré, 1998). Dans la littérature et la pratique, cette confusion est fréquente. Elle a induit l'utilisation du terme dans ce sens plus «large» lors de l'écriture de certaines phrases dans la présente monographie.

## 1. Introduction.

### 1.1. Description botanique.

Les orchidées terrestres sont des plantes à tige tubérisée sous forme de rhizome (fig. 1, p 8), de tubercule racinaire (fig. 2, p 8) ou de pseudo-bulbe (fig. 3, p 8) (Reinhard *et al*, 1991), elles forment parfois aussi des cornes (Cronquist, 1981; Rasmussen, 1985). Leurs feuilles sont entières, engainantes, à nervation parallèle (souvent un peu succulentes) et peuvent être alternes, rarement opposées ou insérées en spirale, toutes basales ou réduites à des écailles (pour les espèces sans chlorophylle) (Cronquist, 1981; Rasmussen, 1985; Reinhard *et al*, 1991).

La fleur est hermaphrodite, rarement unisexuée, épigyne («pièce florale paraissant insérée sur l'ovaire»; Gatin, 1924) et souvent résupinée (ayant subi une rotation de 180°, en général). Elle se caractérise par une forte zygomorphie (symétrie par rapport à un plan). Son périanthe est composé de trois sépales et de trois pétales (Rasmussen, 1985; Reinhard *et al*, 1991) ou de deux rangées de trois tépales pétaloïdes selon les auteurs (Cronquist, 1981; Spichiger *et al*, 2000) (fig. 4, p 9). Un des pétales est fortement différencié des deux autres en taille et en couleur, il forme très souvent une sorte de «langue» appelée le labelle. Ce caractère visuel ainsi que la présence fréquente d'un éperon nectarifère démontrent la forte dépendance de ces plantes à la pollinisation par les insectes. En effet, le labelle est un appareil d'affichage à fort mimétisme (Spichiger *et al*, 2000).

En général, il y a une ou deux étamine(s) fertile(s) toujours placée(s) en face du labelle; si elle(s) est (sont) accolée(s), par leur filet, au style et au stigmate, cet ensemble forme alors une colonne appelée le gynostème (Cronquist, 1981; Rasmussen, 1985; Reinhard *et al*, 1991; Spichiger *et al*, 2000). Un autre caractère important chez les *Orchidoideae* est l'organisation des grains de pollen en pollinies (masse gélatineuse et collante dans laquelle tous les grains sont rassemblés) (Cronquist, 1981; Reinhard *et al*, 1991; Spichiger *et al*, 2000). Ces dernières surmontent le rostellum (un des stigmates transformé) auquel elles sont attachées par le biais de caudicules et de rétinacles. Le rôle du rostellum est de prévenir l'autopollinisation de la fleur en séparant l'anthere des deux autres stigmates, il forme un buttoir pour l'insecte (Cronquist, 1981; Spichiger *et al*, 2000). Lorsque le pollen est transféré, les pollinies se détachent entièrement du rostellum et restent collées sur l'insecte grâce au viscidium qui porte une substance visqueuse et collante (Cronquist, 1981) (fig. 5, p 9).

Le gynécée est composé de trois carpelles unis qui forment un ovaire uniloculaire et infère, d'un style et de trois stigmates (Spichiger *et al*, 2000). Les ovules sont très nombreux et petits, ils ne se développent qu'après pollinisation (Cronquist, 1981). Le fruit de l'orchidée est une capsule qui s'ouvre sur trois à six fentes à déhiscence paraplacentaire (Cronquist, 1981; Spichiger *et al*, 2000) (fig. 6 et 7, p 10). Les graines, sans albumen, sont très nombreuses et de petite taille (de l'ordre du dixième de millimètre) (Rasmussen, 1995; Spichiger *et al*, 2000). L'embryon qu'elles contiennent est à peine composé de quelques cellules et il n'est pas ou est peu différencié (cotylédon à peine perceptible) (Spichiger *et al*, 2000). L'albumen est insignifiant car son évolution est, soit avortée, soit dégénérée (Cronquist, 1981).

Du fait de l'absence de réserves, l'association avec un champignon mycorhizique, au moment de la germination, est indispensable pour la survie de l'embryon qui, sans lui, ne pourrait accéder à l'eau et aux nutriments (Cronquist, 1981; Reinhard *et al*, 1991). Les orchidées passent, au moment de la germination, par un stade appelé le protocorme. Celui-ci correspond à l'axe hypocotylé (Gatin, 1924) qui a grossi et il représente le même stade que la plantule chez les autres Angiospermes (Clements, 1988). Il ne possède, cependant pas de

radicule et dure de la germination jusqu'à la formation d'une tige portant des primordia foliaires (Rasmussen, 1995) (fig. 8, p 11).

## 1.2. Classification botanique.

Dans la classification générale de botanique on retrouve les orchidées sous l'embranchement des *Magnoliophyta* (*Spermatophyta*), le sous-embranchement des *Magnoliophytina* (*Angiospermae*), la classe des *Liliopsida* (*Monocotyledoneae*), la sous-classe des *Liliidae*, l'ordre des *Orchidales* et la famille des *Orchidaceae* (Aeschimann, Burdet, 1994). Cette famille comprend un millier de genres et 15 à 20 milles espèces, ce qui la place dans les premiers rangs en ce qui concerne la diversité au sein des familles. La distribution des orchidées est cosmopolite dans le monde et leur mode de vie peut être soit épiphyte (surtout dans les zones tropicales), soit terrestre, parfois saprophyte (en Suisse, entre autres). Alors que pour Rasmussen (1985) l'ordre des *Orchidales* comprend les *Liliales*, les orchidées sont traitées comme trois familles distinctes, c'est-à-dire les *Apostasiaceae*, *Cypripediaceae* et les *Orchidaceae*; pour Cronquist (1981), la famille *Orchidaceae* est elle-même séparée en trois sous-familles qui sont les *Apostasioideae*, les *Cypripedioideae* et les *Orchidoideae*. Seules les deux dernières nous intéressent dans ce travail de diplôme car elles comportent des genres présents en Suisse (un sur les quatre pour les *Cypripedioideae* et tous pour les *Orchidoideae*) (fig. 9, p 11).

Aux Conservatoire et Jardin Botaniques de Genève (CJB), les genres qui ont été étudiés au laboratoire de culture *in vitro* sont les: *Cephalanthera* Rich., *Epipactis* Zinn, *Dactylorhiza* Nevski, *Orchis* L., *Ophrys* L., *Malaxis* Sw., *Liparis* Rich., *Epipogium* Borkh., *Limodorum* Boehmer, *Neottia* Guett., *Corallorhiza* Gagnebin, *Platanthera* Rich., *Nigritella* Rich., *Coeloglossum* Hartman, *Anacamptis* Rich., *Himantoglossum* Koch, *Aceras* R. Br., *Herminium* L., *Gymnadenia* R. Br., *Pseudorchis* Séguier, *Traunsteinera* Reichb., *Cypripedium* L., *Listera* R. Br., *Spiranthes* Rich., *Goodyera* R. Br., *Chamorchis* Rich., *Hammarbya* Kuntze, *Serapias* L. (Aeschimann, Burdet, 1994; Lauber, Wagner, 2000) et *Anteriorchis* (L.) Klein & Strack (Reinhard *et al*, 1991). Les noms d'auteurs utilisés dans cette monographie et donnés aux genres vivant en Suisse sont basés sur les abréviations faites dans Aeschimann, Burdet (1994). En ce qui concerne les autres plantes, les noms seront repris soit tels quels de la source bibliographique, soit d'après le «Zander» (Erhardt *et al*, 2000) ou encore Delforge (1994).

## 1.3. Classification phénologique.

Généralement, on classe les orchidées comme ci-dessus, mais il peut s'avérer intéressant de choisir comme critères de classification des caractères physiologiques et phénologiques [la phénologie étant «l'étude des répercussions du climat sur les phénomènes biologiques saisonniers, comme la feuillaison ou la floraison», Petit Larousse Illustré (1984)]. Pour les propagateurs-conservateurs, cette classification est plus adéquate car elle permet de planifier les étapes de la culture. Les deux caractères pris en compte pour les orchidées terrestres sont l'apparition de feuilles et la floraison. En effet, la mycorhization et surtout le sevrage ne se font pas au même moment suivant la physiologie de la plante. Mais ce qui revêt un aspect encore plus important est le fait que la mycorhize se trouve dans un état de vigueur optimal au moment où la plante est en pleine végétation. Ceci a lieu quand l'orchidée forme ses feuilles. Pendant cette période, on a le plus de chance de rencontrer la mycorhize dans les tissus, c'est donc le moment idéal pour l'isoler et la mettre en culture. De même, comme cette dernière est très présente, elle procure à l'orchidée hôte une plus grande résistance aux stress; le risque d'abîmer du matériel végétal lors d'opérations de culture (repiquage, sevrage, transplantation) est alors à son minimum.

On distingue, de ce fait, deux groupes dans les orchidées terrestres cultivées aux CJB. Le premier est composé des plantes qui forment une rosette au printemps et qui fleurissent l'été de la même année, alors que le second comprend toutes les plantes qui forment d'abord une rosette en automne, puis qui passent l'hiver sous cette forme pour ne fleurir qu'au printemps suivant (fig. 10, p 12). Cette différenciation est liée à l'habitat des différentes espèces et à la latitude à laquelle elles se trouvent. En effet, la photosynthèse nécessite une lumière suffisante (en quantité et en durée), une humidité appropriée et une température modérée pour être optimale et permettre à la plante de constituer ses réserves.

Pour les régions du Nord de l'Europe, dans les lieux non couverts (prairies), la photosynthèse est à son maximum pendant la période estivale, l'eau venant rarement à manquer. Pour les espèces poussant dans ces environnements, il est alors du plus grand intérêt d'avoir un maximum de feuilles à cette époque. On trouve donc dans cet habitat toutes les orchidées qui forment une rosette au printemps et dont la floraison a lieu l'été de la même année. Par contre, dans les lieux ombragés (forêts), la photosynthèse a un rendement élevé en automne-hiver, après la chute des feuilles, ou, au tout début du printemps avant que la feuillaison n'ait atteint son développement complet. C'est pourquoi les orchidées ayant un habitat plutôt forestier constituent une rosette de feuilles à la fin de l'été ou au début de l'automne et ne fleurissent qu'au printemps suivant.

Dans le sud de l'Europe, l'été est très souvent une période beaucoup trop sèche, il marque alors le repos annuel de beaucoup de plantes. On retrouve, dès lors, dans ces régions des espèces formant leur rosette de feuilles à l'automne et qui fleurissent au printemps suivant (Reinhard *et al*, 1991, Rasmussen, 1995).

Comme beaucoup de classifications, celle-ci n'est pas parfaite et on trouve des exceptions à la règle. Ces dernières sont liées à l'évolution particulière que certaines espèces ont suivi pour s'adapter à des conditions différentes. Ainsi, certaines orchidées telles que *Aceras anthropophorum* (L.) Aiton f., *Himantoglossum Koch sp*, *Orchis simia* Lam., *Orchis militaris* L. et *Orchis purpurea* Hudson, qui sont pourtant des plantes méditerranéennes, ne laissent apparaître leurs feuilles qu'au printemps précédant leur floraison. Pour ne pas manquer de réserves, celles-ci sont probablement plus dépendantes de leur mycorhize que d'autres orchidées. Mais, en général, on peut dire que la période de repos des orchidées terrestres correspond, soit au gel hivernal, soit à l'ombrage estival dû à la voûte de feuilles de la forêt, soit à la combinaison d'une température élevée avec des précipitations insuffisantes (été) (Rasmussen, 1995).

#### **1.4. La relation mycorhizique.**

Etant donné leur extrême petite taille, les graines d'orchidées, selon certains auteurs (Spichiger *et al*, 2000), ne contiennent pas d'albumen et n'ont pas, de ce fait, de réserves pouvant les nourrir jusqu'à ce qu'elles atteignent l'autotrophie (stade où une feuille permet de faire la photosynthèse et donc où une plante peut subvenir à ses propres besoins). Afin de tout de même pouvoir germer, l'association avec un champignon mycorhizique, saprophyte ou parasite (Downie, 1943; Smith, 1966; Reinhard *et al*, 1991; Rasmussen, 1995), au cours de l'évolution de ces plantes, leur a permis de contourner le problème. C'est ce qui est appelé une mycotrophie (Spichiger *et al*, 2000) (fig. 11, p 13).

Il existe des gradients dans la mycotrophie (Reinhard *et al*, 1991; Rasmussen, 1995), certaines orchidées dépourvues de chlorophylle restent toute leur vie entièrement dépendantes de leur mycorhize alors que celles qui ont des feuilles vertes ne le sont que partiellement (Harvais, Hadley, 1967; Smith, Read, 1997).

Cet état de mycotrophie n'est pas atteint tant que la graine n'a pas commencé son imbibition et qu'elle n'a pas touché le sol ou toute autre source de mycorhize (autres racines d'orchidées, par exemple). Les orchidées sont donc fortement dépendantes du hasard lors de la dispersion des graines (ceci explique aussi leur importante production de semences) car, non seulement il faut que la graine tombe dans un lieu où elle trouve les conditions favorables à sa germination, mais encore faut-il qu'elle y rencontre une mycorhize qui puisse lui fournir ses éléments nutritifs nécessaires (Harvais, Hadley, 1967).

Lorsque toutes les bonnes conditions sont réunies, la relation graine-mycorhize s'établit. Le champignon pénètre par les grandes cellules du suspensoir (Clements, 1988; Mitchell, 1989; Reinhard *et al*, 1991; Smith, Read, 1997), sous forme d'hyphes (filaments de mycélium). On dit du champignon que c'est un endophyte parce qu'il pousse à l'intérieur des tissus de la plante. Les cellules hôtes sont investies mais ne meurent pas car, en situation d'équilibre, la mycorhize joue, à la fois, le rôle de «canal d'approvisionnement» entre le sol et l'embryon (Breddy, Black, 1954; Smith, 1967), et celui de nourriture (Harvais, Hadley, 1967; Hadley, Williamson, 1971; Reinhard *et al*, 1991).

Il existe, toutefois, bien une relation de force entre les deux partenaires (Knudson, 1922) car, si la mycorhize est trop vigoureuse, elle détruit l'embryon (Reinhard *et al*, 1991) par un développement incontrôlé de ses hyphes (Clements, 1988; Smith, Read, 1997) et si l'embryon est trop «gourmand», c'est la disparition du champignon qui a lieu (Clements, Ellyard, 1979; Reinhard *et al*, 1991). Il faut, notamment, savoir que le mode de nutrition de l'embryon repose sur deux principes:

- l'absorption, par capillarité, d'éléments nutritifs présents dans la solution du sol (après qu'ils aient été libérés des matières organiques par les décomposeurs du sol) et,
- la digestion des hyphes, souvent rencontrés sous forme de «pelotes» dans les cellules de l'orchidée (Reinhard *et al*, 1991; Rasmussen, 1995; Smith, Read, 1997) (fig. 12, p 13).

L'observation de la mycorhize à l'intérieur des cellules d'orchidée est possible mais il faut choisir le bon matériel végétal ainsi que le bon moment. On peut repérer la présence du champignon par des «pelotes» d'hyphes un peu jaunâtres à l'intérieur des cellules (Curtis, 1939, Breddy, Black, 1954; Rasmussen, 1995). D'après Mitchell (1989) et Rasmussen (1995), on trouverait le champignon surtout dans les racines et très rarement dans les rhizomes, les tubercules [Warcup (1971) pour un genre non-européen: *Diuris* J. Smith] ou les cormes. Mollison (1943), quant à elle, en décèlerait aussi bien dans les racines que les rhizomes ou les tiges latérales, chez l'orchidée *Goodyera repens* (L.) R. Br.. On peut évidemment aussi utiliser des protocormes qui ont poussé en milieu symbiotique *in vitro* (Rasmussen, 1995). Landwehr (1982), quant à lui, prétend que les tissus de réserve de plantes développées produiraient des anticorps empêchant le développement du champignon. C'est pourquoi, il serait impossible de trouver la mycorhize dans des tissus autres que ceux des racines.

Selon Mitchell (1989), le genre de l'orchidée jouerait un rôle important dans la localisation des pelotes au sein des tissus. En effet, pour les quelques plantes suivantes on a pu établir le meilleur site d'observation: chez *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall., il se trouve dans les racines fasciculées; chez les genres *Orchis* L. *sp* et *Ophrys* L. *sp*, ce sont les racines annuelles, chez le genre *Dactylorhiza* Nevski *sp*, les racines issues de la tige et non celles du tubercule et, chez le genre *Cypripedium* L., très rares sont les chercheurs ayant pu déceler, à un stade différent de la germination de la graine, des cellules contenant des pelotes ou des hyphes.

Comme l'émergence des feuilles des orchidées terrestres dépend de la saison, la présence du champignon en dépend également: elle atteint son maximum quand la plante débute sa période de végétation (Breddy, Black, 1954; Hadley, 1982; Smith, Read, 1997). De plus, ce qui importe pour la mycorhize, ce sont une humidité et un apport de matières organiques

suffisants. Or, ces conditions sont, pour la Suisse, réunies plus particulièrement au printemps et à l'automne, ce qui correspond bien avec les saisons où les orchidées terrestres de Suisse produisent leurs feuilles.

### 1.5. Les méthodes de propagation végétatives.

Comme la plupart des végétaux, les orchidées peuvent se propager de deux manières: par la voie sexuée et par la voie asexuée. Jusqu'ici, on n'a abordé que le mode génératif de multiplication des orchidées terrestres (graines) mais comme il est expliqué au début de l'introduction, ces plantes possèdent également des organes souterrains de réserves, ces derniers permettant leur multiplication végétative.

En effet, pour les orchidées possédant un rhizome {*Cypripedium* L. sp, *Epipactis* Zinn sp, *Cephalanthera* Rich. sp, *Epipogium* Borkh. sp, [Cribb, Bailes (1989)], *Neottia* Guett. sp, *Limodorum* Boehmer sp, *Corallorhiza* Gagnebin sp, [Delforge (1994)]}, il est possible de couper un tronçon de ce dernier à partir duquel une nouvelle plante se régénérera. Comme, chez ces espèces, les réserves annuelles se trouvent dans les anciennes parties souterraines, il faut veiller à ce que la section de rhizome coupée de la plante-mère possède bien un bout du rhizome des années précédentes. Si cette précaution n'est pas prise, la régénération risque d'échouer (fig. 13, p 14).

Sur les espèces ne produisant pas de pseudo-bulbe mais poussant avec un rhizome, on prélève la nouvelle section du rhizome portant le bourgeon et on prend deux, voire trois anciennes divisions en plus. Les espèces à rhizome mais avec pseudo-bulbes sont multipliées suivant le même principe sauf que dans ce cas, on prend la section de rhizome avec le bourgeon, accompagnée de deux ou trois pseudo-bulbes.

Afin de pouvoir prélever sur un même rhizome plusieurs futures plantes, il faut, au préalable, induire la production de bourgeons à partir des yeux dormants se trouvant sur ce dernier. L'année précédant celle du prélèvement, cette opération s'effectue comme suit: on incise, jusqu'à sa moitié, le rhizome à l'endroit où l'on projette de le sectionner pour la multiplication; ainsi, la dominance du bourgeon apical (dominance dictée par un flux d'hormones) est atténuée et elle laisse les yeux se développer en bourgeons. Ensuite, il suffit d'attendre le cycle suivant pour opérer de la manière décrite ci-dessus. La meilleure saison pour la multiplication d'orchidées à rhizome se situe en début de la période de croissance (Cribb, Bailes, 1989).

Sur certaines espèces du genre *Cypripedium* L., cette méthode a aussi fait ses preuves (l'année suivante, on obtient le double du nombre de plantes, d'après M. Boder, communications personnelles, septembre 1999) mais Whitlow (1983) suggère, pour ce genre, d'effectuer la séparation en fin de la période de végétation car les réserves qui ont été constituées pendant toute la croissance sont alors bien réparties dans le rhizome. De petits tronçons de celui-ci ainsi que de rhizomes secondaires ne possédant pas de bourgeon dominant, ont donné d'excellents résultats. En plus, le risque d'abîmer de nouvelles pousses (issues du nouveau cycle ayant sinon débuté) est fortement réduit et la chaleur résiduelle du sol (accumulée pendant toute la belle saison) permet un rapide établissement des racines juste avant qu'elles n'entrent dans leur phase de repos. (Cribb, Bailes, 1989).

Les orchidées possédant des tubercules sont, quant à elles, classées en deux groupes selon qu'elles sont multipliées en été ou en hiver. Parmi ces genres on trouve *Orchis* L. sp, *Ophrys* L. sp, *Dactylorhiza* Nevski sp [Hmeijer (2000)], *Coeloglossum* Hartman sp,

*Gymnadenia* R. Br. *sp.*, *Nigritella* Rich. *sp.*, *Platanthera* Rich. *sp.* [Delforge (1994)], etc. Le principe reste le même: on provoque la production de plusieurs tubercules en éliminant systématiquement le nouveau créé (Beyrle, 1996). La tubérisation est généralement accomplie en début de floraison et elle se situe juste sous la rosette de feuilles (fig. 14, p 15).

Pour les genres à multiplication estivale, au flétrissement de la hampe florale, on détache le nouveau tubercule de la rosette et on le replante en lui conférant les soins comme s'il allait entrer en dormance. Quant à l'ancien tubercule portant toujours la hampe florale et la plupart des racines, il faut essayer de le maintenir en croissance aussi longtemps que possible afin qu'il produise un maximum de nouveaux tubercules avant son entrée en repos. Il faudra donc veiller à ce qu'il n'y ait pas de montée à graines, ce qui provoquerait, le cas échéant, la mort de la rosette et, avec elle, le début de la période de dormance.

Pour les genres à multiplication hivernale, le stade atteint est celui où la rosette est entièrement développée et le tubercule en pleine formation. On enlève le nouvel épaississement de l'ancien tubercule, en veillant à laisser encore quelques racines sur ce dernier. La rosette doit fleurir normalement et produire un tubercule de remplacement, alors que l'ancien doit former deux, voire trois nouveaux renflements (à partir de yeux dormants) portant de nouveaux tubercules. On apporte ensuite les soins habituels à toutes les plantes et on les laisse faire leur période de repos (Von Ramin (1976) in Cribb, Bailes, 1989).

Pour quelques autres genres et espèces, il existe des méthodes différentes de propagation végétative, celles-ci s'observant dans la nature. Il existe, par exemple, des orchidées qui se propagent par stolons et qui forment parfois de véritables tapis de plantes identiques, ceci est valable pour *Goodyera repens* (L.) R. Br. et *Dactylorhiza iberica* (M.-Bieb. Ex Willdenow) Soó. Une autre alternative a été suivie par l'orchidée *Hammarbya paludosa* (L.) Kuntze: celle-ci produit sur le bord de ses feuilles de minuscules bulbillles capables, chacun, de redonner une nouvelle plante (Delforge, 1994).

### 1.6. Le choix du semis comme méthode de propagation.

Dans un jardin botanique, le but est de créer une banque de plantes des plus diversifiées possibles afin de contribuer à la conservation de la biodiversité (Zettler, Mcinnis, 1992). Cette biodiversité est essentielle à l'équilibre de la nature (relations entre le climat, les plantes, les animaux et les hommes) et elle permet un grand nombre d'applications pratiques pour les humains (industrie pharmaceutique, cultures pour l'approvisionnement de nourriture mais également de matières premières pour l'industrie, modèles permettant l'invention d'outils plus efficaces, etc...). Plus la quantité de caractères génétiques est grande et diverse, plus le rôle de conservatoire est rempli.

C'est pourquoi le travail de propagation *in vitro* effectué aux CJB et dans d'autres jardins botaniques (Bailes *et al.*, 1987; Mitchell, 1989) se fait à partir de graines. En effet, cette technique de multiplication sexuée se base sur le brassage de gènes qui a lieu au moment de la méiose et de la fécondation. Ainsi, chaque graine contient une information différente de sa voisine, ce qui produit par la suite, des individus tous uniques et confère à la population une vigueur accrue (Zettler, Mcinnis, 1992). Cela n'aurait pas été le cas si une technique asexuée telle que le microbouturage ou la culture de tissus avait été appliquée (Fay, Muir, 1990; Johansen, Rasmussen, 1992). Si, de plus, les techniques de semis se rapprochent de la situation rencontrée dans la nature, avec la mycorhization notamment, alors la réintroduction et ainsi la préservation de l'environnement sont encore améliorées (Clements, Ellyard, 1979; Zettler, Mcinnis, 1992).

Ces méthodes, si elles se révèlent efficaces, peuvent par le futur se développer et trouver un intérêt également commercial. Si, en effet, la culture *in vitro* de semis mycorhizés venait à permettre la production de plantes à grande échelle, on pourrait à faible prix vendre des spécimens rares (et donc en danger dans la nature) et ainsi éviter leur prélèvement sauvage dans leur environnement naturel (Bailes *et al*, 1987).

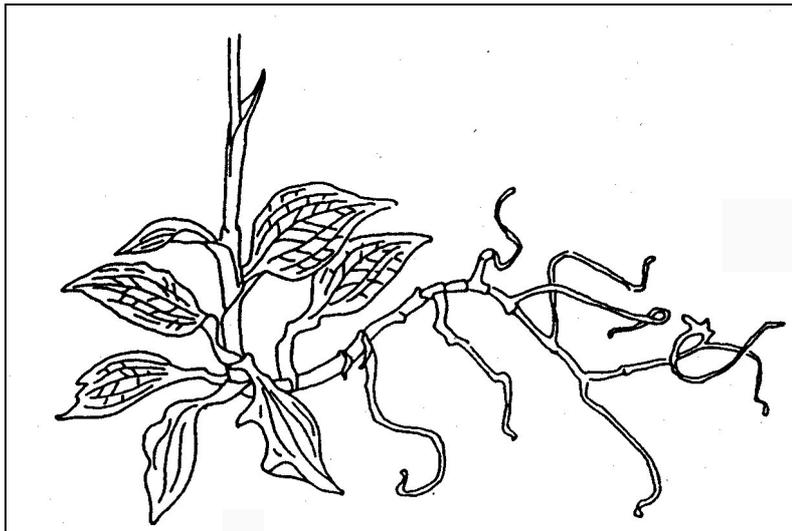


Fig. 1 Rhizome de *Goodyera repens*.

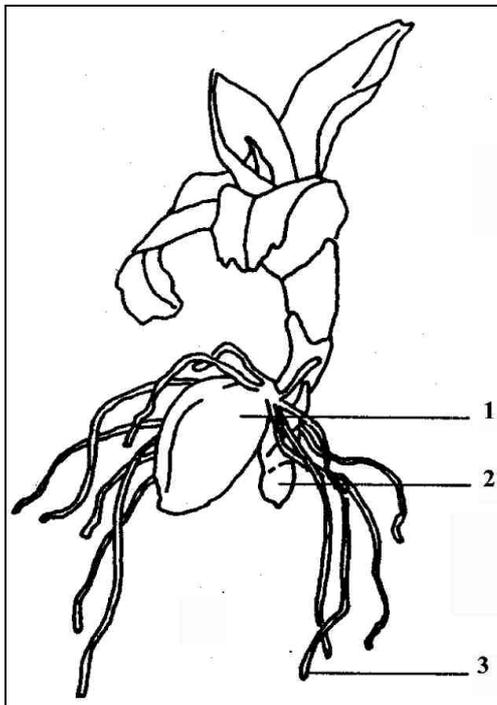
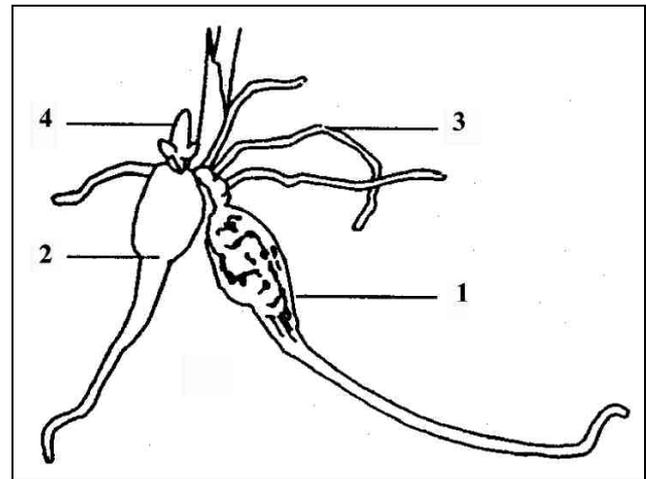


Fig. 2 Tubercules d'*Orchis mascula*.



- 1: Tubercule / pseudo-bulbe de l'année en cours.
- 2: Tubercule / pseudo-bulbe de l'année à venir.
- 3: Racine.
- 4: Bourgeon de l'année à venir.

Fig. 3 Pseudo-bulbes de *Platanthera bifolia*.

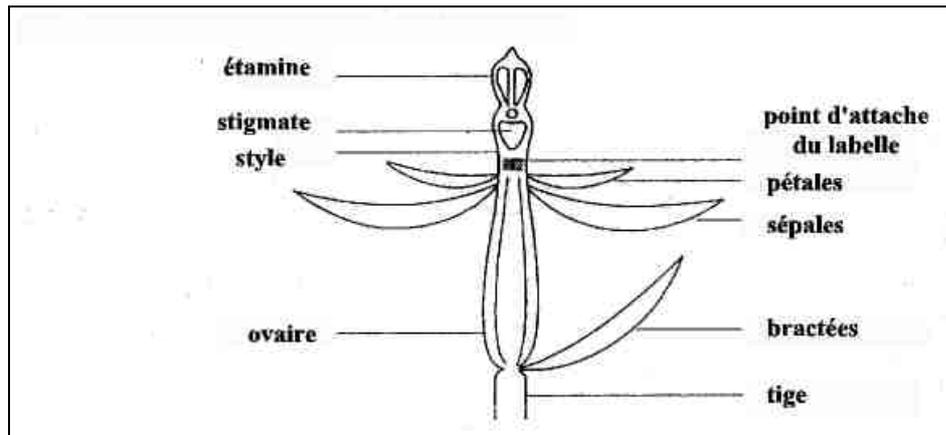


Fig. 4 Coupe schématique de la fleur d'orchidée.

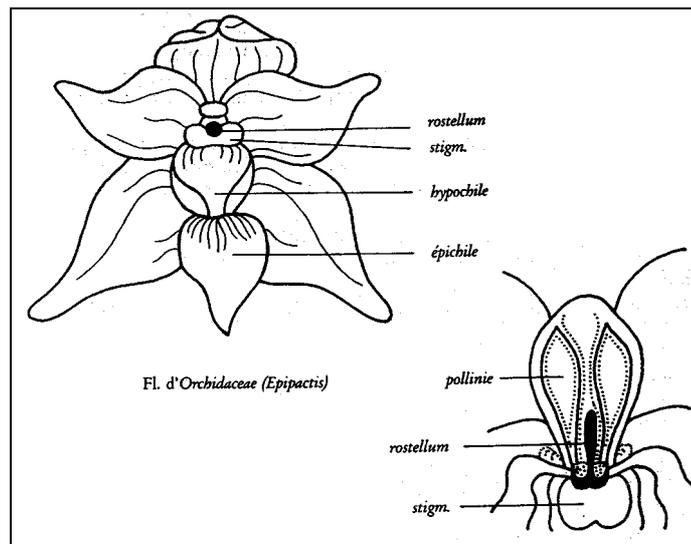
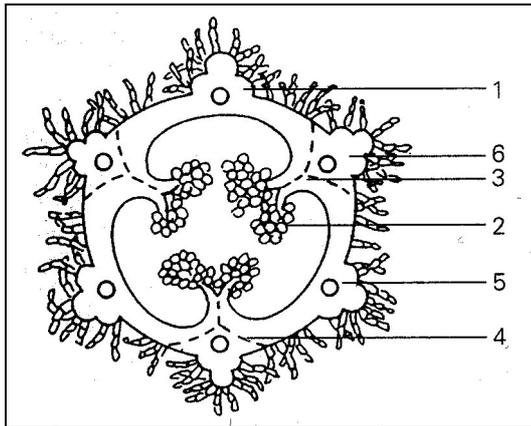
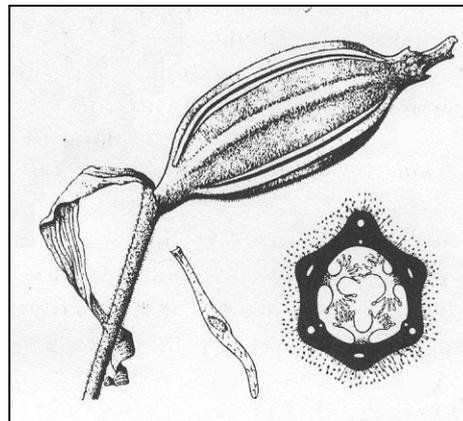


Fig. 5 Fleur d'orchidée: appareil reproducteur.

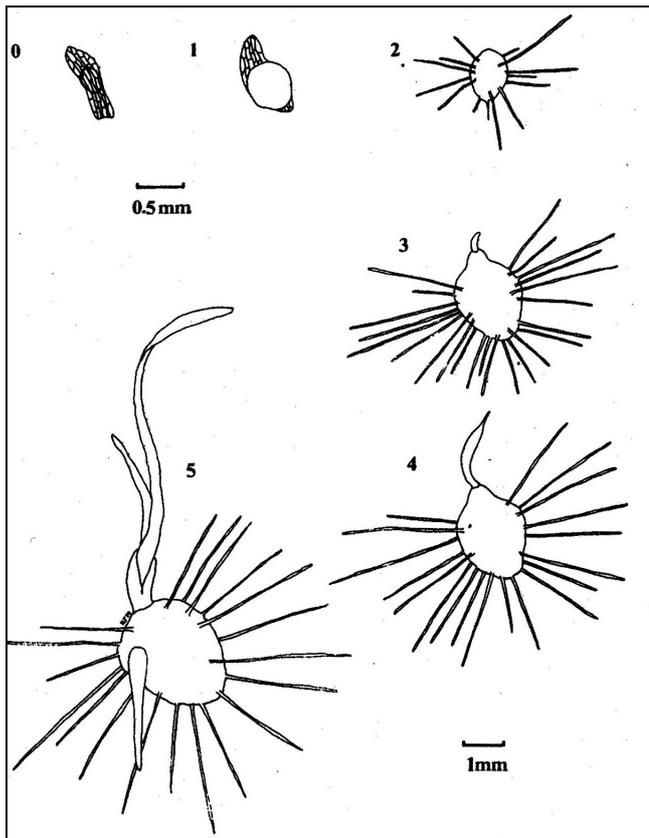


- 1: Carpelle.
- 2: Point d'attache des graines.
- 3: Placenta.
- 4: Fente de déhiscence.
- 5: Grand clapet.
- 6: Petit clapet.

**Fig. 6 Coupe transversale de l'ovaire.**



**Fig. 7 Fruit, coupe transversale de ce dernier et graine.**



0: Graine non germée.

1: Début de germination avec rupture du testa.

2: Production de rhizoïdes.

3: Production du primordium foliaire.

4: Production des premiers tissus chlorophylliens.

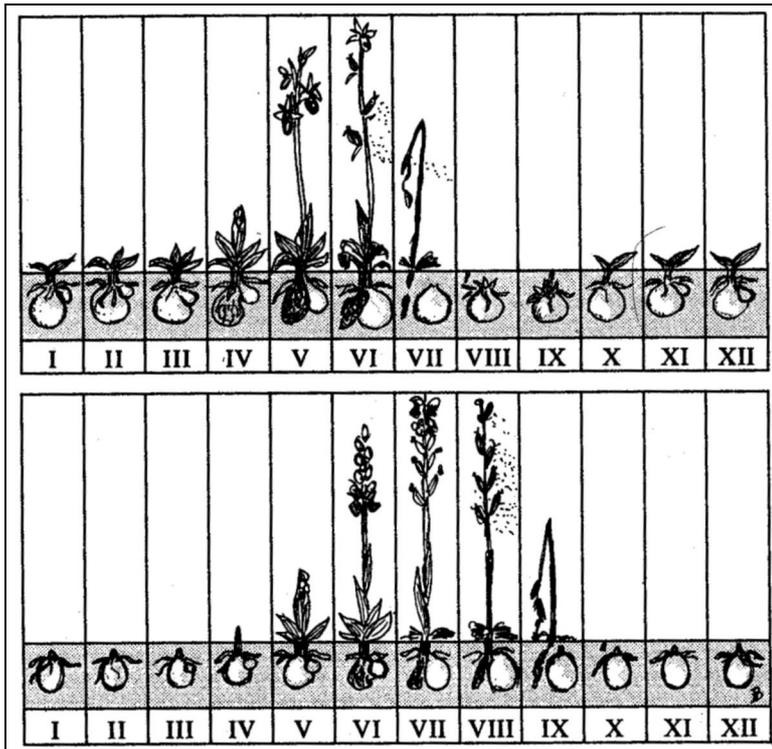
5: Production du primordium racinaire.

Echelle de 0.5 mm pour les étapes 0 et 1, l'échelle de 1 mm pour les suivantes.

Fig. 8 Etapes de la germination.

Embranchement:	<b>MAGNOLIOPHYTA</b>
Sous-embranchement:	<b>MAGNOLIOPHYTINA</b>
Classe:	<b>LILIOPSIDA</b>
Sous-classe:	<b>LILIIDAE</b>
Ordre:	<b>ORCHIDALES</b>
Famille:	<b>ORCHIDACEAE</b>
Sous-familles:	<b>APOSTASIOIDEAE</b> <b>CYPRIPEDIOIDEAE</b> <b>ORCHIDOIDEAE</b>

Fig. 9 Classification botanique selon Cronquist, 1981.

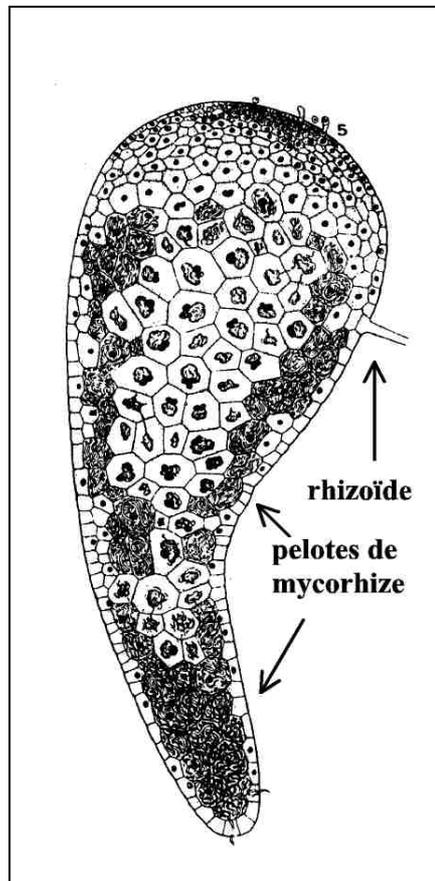


Les chiffres romains  
 représentent les mois  
 de l'année.

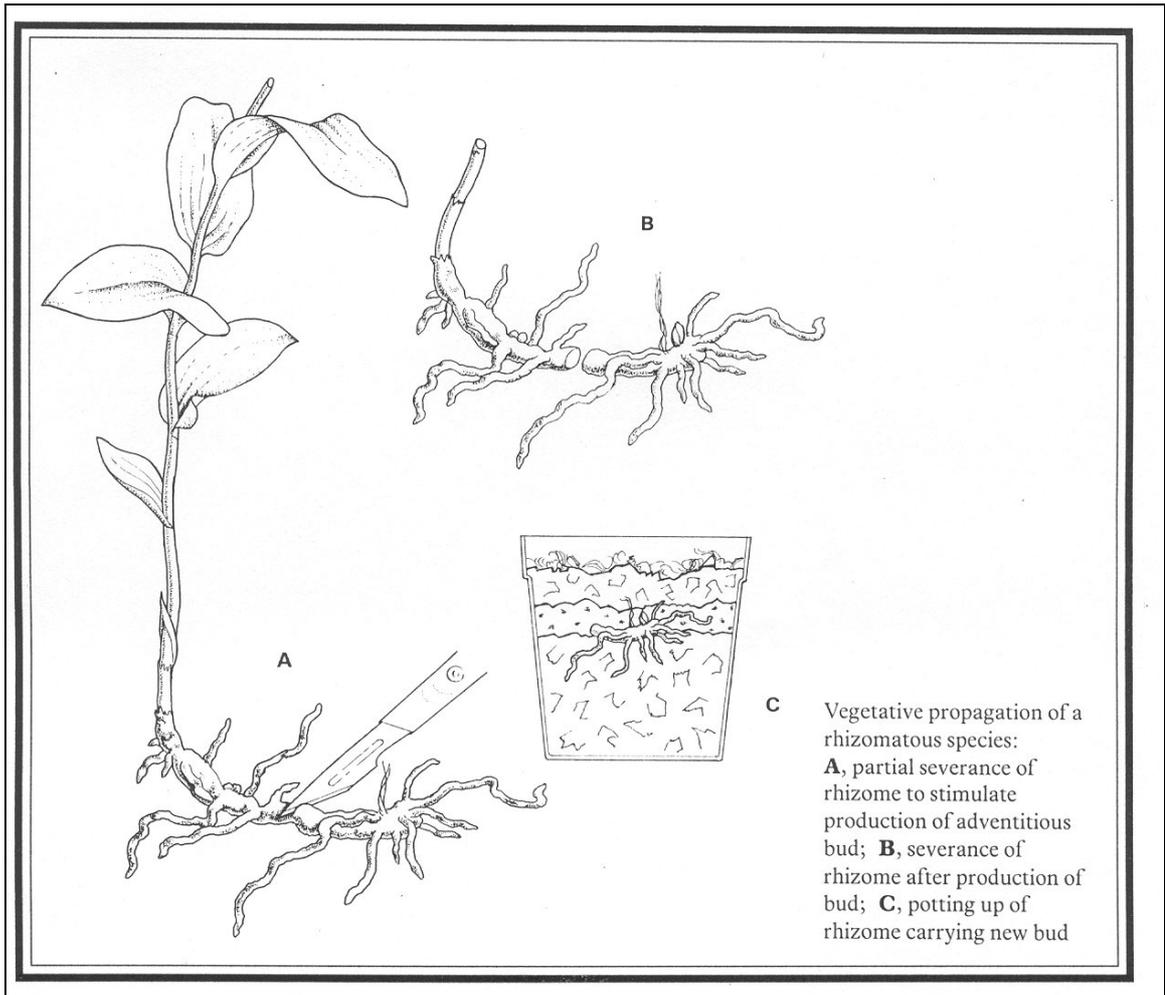
**Fig. 10** Schéma du cycle annuel d'*Ophrys sphegodes* (en haut) et d'*Orchis morio* (en bas).



**Fig. 11** Graine de *Cephalanthera longifolia*.



**Fig. 12** Protocorme mycorhizé.



**Fig. 13** Multiplication végétative d'espèces à rhizome.

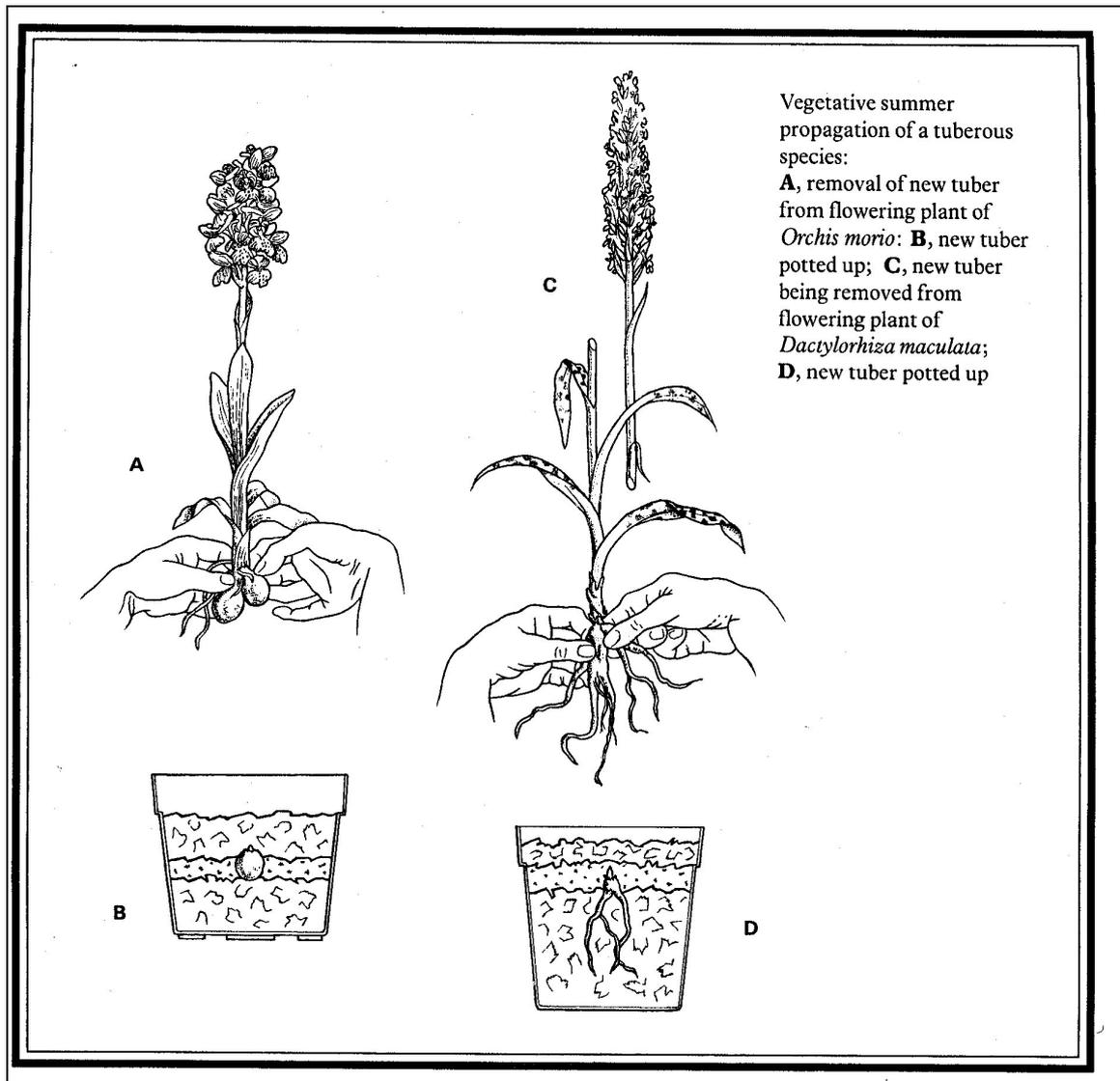


Fig. 14 Multiplication végétative d'espèces à tubercules.

## 2. Les orchidées terrestres.

### 2.1. Les étapes de la culture.

#### 2.1.1. Introduction.

Afin de mieux comprendre en quoi consiste le travail du laboratoire des CJB (qui diffère du semis traditionnel surtout par l'environnement aseptisé dans lequel il est effectué), on peut le décomposer en ses étapes constitutives qui sont: la pollinisation, le prélèvement des graines (ces deux étapes étant préliminaires à la culture *in vitro*), les désinfections et prétraitements, le semis, le repiquage, la mycorhization (qui peut se faire à plusieurs stades différents) et le sevrage (cette dernière étant le retour au milieu naturel).

#### 2.1.2. La pollinisation.

Dans la nature, la pollinisation croisée est effectuée par les insectes au sens large du terme (c'est-à-dire que les araignées en font partie); on a vu que la fleur d'orchidée présentait un attrait particulier par la présence d'un éperon nectarifère et de pétales colorés et différenciés. Le principe est que l'insecte est attiré vers la fleur par le mimétisme du labelle (araignées, insectes), la présence de nectar (insectes) ou tout simplement par la nourriture que représente pour lui la fleur d'orchidée ou le pollen (coléoptères). Il essaie alors (suivant les cas décrits ci-dessus) soit de copuler avec ce qui lui semble être une partenaire, soit de prélever du nectar, soit de se nourrir des pièces florales (Landwehr, 1982).

On appelle la première catégorie de méthodes d'attraction (mimétismes) des «leurres sexuels» et «visuels». Il semblerait que les orchidées possédant cet attirail émettent des parfums ressemblant aux phéromones émises par les femelles de certains insectes (Hyménoptères) et que, comme le labelle ressemble étrangement à la femelle, le mâle se mette à vouloir féconder ce qui lui semble être une partenaire («leurres sexuels»). Par leur apparence, certaines fleurs d'orchidées peuvent induire les pollinisateurs en erreur en leur faisant croire qu'ils vont butiner une fleur nectarifère. En effet, le labelle ressemblerait à une surface d'atterrissage, l'éperon à un calice ou une corolle tubulaire et la présence de signaux colorés (macules, tiretés sur le labelle) ferait croire au chemin qui mène l'insecte habituellement au nectar dans une fleur nourricière (Lamiacées, Fabacées). Parfois même, des papilles ou des touffes de poils sur le labelle seraient à même d'exciter les soies détectrices de substances sucrées chez le pollinisateur, et la présence de structures granuleuses ou pileuses l'induiraient en erreur en lui faisant croire à la présence de pollen. La forme de la fleur peut aussi rappeler à l'insecte un nid ou un trou (*Serapias* L. *sp.*, *Orchis papilionacea* L., *Orchis morio* L., etc...) où il pourrait trouver refuge pour dormir ou se protéger de la pluie («leurres visuels»).

La seconde catégorie de leurres est celle qui est constituée des orchidées nourricières (nectar, pièces florales servant de nourriture). Ces dernières présenteraient du nectar bien visiblement tout en l'accompagnant d'un fort parfum. S'il semble parfois que l'odeur est absente, c'est qu'elle nous est imperceptible mais néanmoins détectable par les insectes. Un autre objet d'attraction d'insectes semblerait être la substance exsudée par le stigmate et permettant au pollen sec de rester fixé dessus. Celle-ci serait riche en acides aminés et en sucres et présenterait une très bonne source de nutriments pour ces visiteurs (Williams, 1982; Delforge, 1994).

La pollinisation s'effectue comme suit: tout en s'introduisant dans la fleur, l'insecte touche le rétinacle des pollinies qui se collent sur lui, ce qui lui permet alors de jouer son rôle de vecteur. Au moment de la visite d'une autre fleur, il va être débarrassé d'une partie du pollen, celui-ci restant collé au stigmate de l'hôte. Ainsi, la pollinisation croisée est effectuée. Certaines orchidées ont cependant un mécanisme favorisant l'autogamie, la dépendance aux insectes tendant à disparaître. C'est le cas chez les *Epipactis* Zinn *sp* où le rostellum est peu efficace ou évanescent et la surface stigmatique assez inclinée vers l'anthère. Cette disposition particulière des pièces florales favorise en effet, l'autopollinisation (petit coup de vent mettant en contact le pollen avec le stigmate, par exemple). Les orchidées pratiquant la cléistogamie ont une autogamie poussée à l'extrême. Ce phénomène a lieu quand la fécondation se passe dans le bouton floral sans même que celui-ci ne se soit encore ouvert. Ceci évite à la fleur la perte d'énergie occasionnée par l'ouverture et peut même se réaliser sous terre chez certains genres saprophytes (*Epipogium* Borkh. *sp*, *Neottia* Guett. *sp*, *Limodorum* Boehmer *sp*). Chez *Ophrys apifera* Hudson, l'autofécondation peut avoir lieu, mais elle représente une solution de secours lorsque la pollinisation croisée n'a pas pu être effectuée. Une perte de tension unilatérale dans les caudicules des pollinies accompagnée de l'action de la force de gravité font que les masses polliniques se recourbent et entrent en contact avec le stigmate visqueux, assurant ainsi l'autogamie. (Landwehr, 1982; Delforge, 1994).

Mais comme, en général, l'autopollinisation n'est pas favorisée et que certaines fleurs ne sont pas visitées, les capsules ne grossissent pas et aucune graine ne peut alors être récoltée (Rasmussen, 1995). Pour augmenter la quantité de graines issues de fécondation et être sûr du maintien de la diversité, la pollinisation manuelle est effectuée. Mais une raison tout aussi importante est qu'en l'effectuant, le propagateur arrive par la suite à connaître la durée nécessaire aux semences pour atteindre un stade de maturité choisi. Ce laps de temps est une donnée essentielle car il lui donne la possibilité de semer les graines au moment où la germination est optimale. L'expérimentateur peut ainsi reconstituer la chronologie de la succession des événements physiologiques, par espèce d'orchidée.

Le principe de la pollinisation manuelle est le même que si un insecte venait dans la fleur (fig. 15, p 34): il faut détacher les pollinies d'une fleur et les transporter vers le stigmate d'une autre. On insère donc un instrument long et fin dans le calice, on découvre les rétinacles des pollinies en faisant coulisser l'instrument sur les bursicules (fine membrane recouvrant les rétinacles) et on peut ainsi décoller les pollinies du rostellum. Il suffit alors de choisir une autre fleur (de préférence sur un autre pied, pour augmenter d'avantage le brassage d'informations génétiques) et de présenter les pollinies sur le stigmate. Normalement, la surface de ce dernier est plus visqueuse encore et permet de décoller les pollinies de l'instrument, celles-ci restant attachées au stigmate. Si l'opération ne s'effectue pas comme décrit, il est tout à fait possible de s'aider d'un deuxième instrument pour que les pollinies restent bien sur la surface stigmatique de la fleur hôte. La technique est à peu près la même pour toutes les orchidées malgré quelques différences de morphologie entre les différents genres.

### 2.1.3. Le prélèvement des graines.

Après la fécondation, les capsules se mettent à grossir, puis elles se dessèchent afin de permettre à la fente de déhiscence de s'ouvrir pour laisser les graines s'échapper. Le semis *in vitro* des graines d'orchidées peut s'effectuer soit avec des semences matures (c'est-à-dire sèches), soit avec des semences immatures (à ce stade, les capsules sont encore vertes). En général, on commence par semer avec des graines sèches prétraitées car c'est ce qu'il y a de plus simple; si ces expériences ne donnent aucun résultat, on fait subir aux graines (toujours matures) des prétraitements plus forts et, seulement si la germination ne se déclenche toujours pas, on a recours au semis avec des graines immatures. Cette dernière méthode est, en effet, assez contraignante car elle nécessite un suivi des plantes très précis: pollinisation manuelle à

plusieurs reprises, décompte de jours à partir de cette date, récolte suivie d'un semis presque immédiat.

Pour le travail de laboratoire, il est d'intérêt de maintenir les graines dans un environnement aussi propre que possible; c'est pourquoi, aux CJB, on essaie de récolter les capsules matures avant qu'elles n'aient pu s'ouvrir. De cette manière, seul l'extérieur de la capsule est à désinfecter, les graines se trouvant à l'intérieur n'ayant pas besoin d'être stérilisées. D'après Mitchell (1989), les capsules devraient être prélevées juste avant leur ouverture [c'est-à-dire quand leur couleur est passé du vert au brun ou jaune (fig. 16, p 34)] et placées dans des récipients en verre fermés par du nylon ou une mousseline. Ces derniers sont entreposés dans des dessiccateurs avec du gel de silice ou du chlorure de calcium anhydre ce qui permet de maintenir les graines dans une atmosphère assez sèche et donc de ralentir toute infection possible.

Si l'on ne projette pas de semer directement les graines, elles peuvent très bien être gardées dans les récipients en verre, tant que ceux-ci sont scellés et maintenus dans un frigo à 4 °C [méthode utilisée à Kew et aussi aux CJB (température de 6°C) (fig. 17, p 35)]. Le séchage des graines se fait comme Mitchell l'a décrit, sur du gel de silice, ou du chlorure de calcium anhydre pour Manning, Van Staden (1987); Harrison (1977); Clements *et al* (1985) et Rasmussen (1992). Mais beaucoup d'expérimentateurs ont également laissé sécher leur matériel à température ambiante [Rasmussen (1990) pendant 6 mois; Rasmussen (1992) pendant 3 mois; Zettler, Mcinnis (1992) jusqu'au dessèchement visible] ou l'ont stocké dans des récipients hermétiques à 2°C (Clements, Ellyard, 1979). Hadley, Willamson (1971) quant à eux ont gardé leur matériel une fois séché à 7°C.

Les capsules vertes, quant à elles, sont récoltées peu après la fécondation mais au stade où les graines n'ont pas encore amorcé leur dessèchement. Ce stade se repère au microscope lorsqu'elles ont une couleur entièrement blanche mais qu'elles sont complètement développées. Les observations de Mitchell (1989) l'ont amené à constater que ce stade est atteint, pour la plupart des orchidées terrestres européennes, 6 à 7 semaines après la pollinisation.

Pour ce matériel-ci, la conservation est beaucoup plus délicate: Mitchell (1989) sème ses graines directement après les avoir récoltées et, bien sûr, après avoir désinfecté l'extérieur de la capsule. Aux CJB, les capsules vertes sont parfois conservées au frigo, dans des boîtes de Pétri scellées. Mais on essaie de semer les graines directement après leur récolte car, comme les capsules ne sont pas désinfectées, il y a des risques d'infections et donc de pertes de matériel. On observe aussi que les capsules se dessèchent au frigo ce qui provoque l'ouverture des fentes de déhiscence et, de ce fait la disparition de l'état stérile des graines au sein de la capsule.

Mais la raison essentielle au semis immédiat de ces graines est qu'elles n'ont pas encore terminé leur évolution vers la maturité (malgré le fait qu'elles soient entièrement développées), donc plus on attend et plus on se rapproche de la maturité (ce que l'on veut justement éviter par cette méthode de semis). Il faut donc prendre garde à bien interpréter ce que les différents auteurs entendent par «capsule verte», car certains utilisent ce terme mais laissent leur matériel attendre pendant une longue période avant de le semer (Clements, Ellyard 1979; Linden, 1980; Ballard, 1987).

Le choix de semer des graines à un stade de maturité avancé ou pas dépend des observations faites par le propagateur. En effet, Linden (1980) a fait plusieurs essais avec des graines issues de capsules vertes et matures et il a pu constater que: pour un même genre, si les graines matures ne germaient pas, le semis de graines issues de capsules vertes échouait également. Par contre, lorsque les graines matures germaient, alors les graines du même genre

mais immatures avaient une vitesse de germination nettement supérieure, le taux de réussite étant également augmenté.

Deux explications possibles à cette facilité de germination des graines immatures par rapport aux mures sont que les cellules du testa sont encore très lâches (au stade immature des graines) facilitant ainsi la pénétration de l'eau et des nutriments et que l'embryon pourrait encore se trouver dans un état «métaboliquement éveillé» (le milieu de culture jouerait alors le rôle du placenta et nourrirait l'embryon) (Linden, 1980).

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Fast (1978) et St-Arnaud *et al* (1992) où le taux de réussite de la germination est nettement amélioré lorsque des graines immatures sont semées, comparé au semis de graines mures. Ces derniers chercheurs ont, en plus, pu préciser pour *Cypripedium acaule* Aiton, que la germination est optimale lorsque les graines utilisées ont un certain âge: 60 jours après la pollinisation. Il semblerait, en effet, qu'à partir de cette date l'embryon entre dans un état de dormance avant même que la graine n'ait atteint sa maturité (St-Arnaud *et al*, 1992).

#### 2.1.4. Les désinfections et prétraitements.

Avant de procéder au semis des graines récoltées, il est nécessaire, étant donné les conditions de culture *in vitro*, de leur faire subir des désinfections (à cause du milieu aseptique) et prétraitements (car la germination doit s'effectuer en l'absence des variations de l'environnement naturel). Le rôle de ces derniers est primordial car, non seulement ils permettent aux graines d'arriver dans un état désinfecté sur le milieu de culture, mais les prétraitements ont encore deux autres fonctions.

Le testa (tégument externe de l'ovule et de la graine) est recouvert d'une couche protectrice (fig. 18, p 35). Celle-ci est composée de lipides, substances proche de la subérine, [Harvais, Hadley (1967)] qui permettent aux graines de rester protégées pendant de longues périodes (déplacements grâce au vent et à l'eau possibles, sans altération) (Rasmussen, 1995). Le prétraitement permet d'attaquer cette couche et ainsi de faciliter la pénétration de nutriments et d'eau nécessaires à la germination (Lucke, 1984; Van Waes, Debergh, 1986), cette dernière s'en trouve donc accélérée (Harvais, Hadley, 1967). Il faut également savoir que la surface du testa, sous cette couche de lipides, est très irrégulière, ce qui permet à des bulles d'air de s'immiscer dans les interstices et de constituer une autre isolation (Reinhard *et al*, 1991). Ceci a pour conséquence que l'eau et les nutriments ont deux barrières à franchir (les lipides et la couche d'air) avant d'atteindre l'embryon. On comprend, dès lors, que dans la nature, l'association avec une mycorhize pour dégrader la couche lipidique soit indispensable pour le bon déroulement de la germination (Rasmussen, 1995).

La deuxième fonction des prétraitements est de lever une dormance éventuelle à laquelle les graines d'orchidées sont parfois sujettes. Cet état latent dépend de la physiologie de l'espèce (formation de la rosette de feuilles à l'automne ou au printemps) et fortement du stade de maturité des graines au moment de la mise en culture *in vitro*.

Pour les graines sèches, les prétraitements jouent le double rôle de désinfection et de traitement pour lever la dormance. Ils ont trois composantes: physique, chimique et mécanique. La première est assurée par un passage au froid (frigo) des graines semées pendant une période déterminée, elle permet de reconstituer en laboratoire l'hiver qu'elles auraient subi. Ensuite, au moment du semis, on fait tremper les graines, préalablement emballées dans des petits paquets en papier filtre stérilisé (fig. 19, p 36), dans une solution désinfectante. C'est le traitement chimique. Quant au traitement mécanique, il consiste à passer le récipient dans lequel les petits

paquets baignent durant leur désinfection, dans un bac à ultrasons. Cette étape est assez essentielle car elle permet de mieux faire pénétrer le désinfectant dans les petits paquets et entre les graines. Il y a en effet une fine couche d'air qui, dans le cas contraire, empêche une bonne désinfection. En faisant vibrer les graines, ces bulles d'air se «fissent» et la solution détergente peut ainsi mieux pénétrer et attaquer la couche de lipides.

Il existe trois traitements différents, ils sont nommés PT1, PT2 et PT3 aux CJB:

- PT1: 20 minutes dans une solution de  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  à 5%, dont les 3 premières minutes se passent dans le bac à ultrasons. Au bout du temps écoulé, on entre le récipient sous la hotte à flux laminaire, ce qui marque le début du travail en asepsie (fig. 20, p 36). Les petits paquets sont sortis de leur bain puis rincés deux fois de suite dans de l'eau distillée autoclavée.
- PT2: 20 minutes dans de l'eau de Javel à 2.5 % de  $\text{NaOCl}$ , les 3 premières minutes se passant dans le bac à ultrasons. Quand les paquets sont entrés sous la hotte, ils sont rincés dans deux bains d'eau distillée autoclavée. Avec les essais réalisés au laboratoire, les résultats ont montré que ce prétraitement n'était pas assez efficace sur le plan de la désinfection. Il sera, à l'avenir, abandonné.
- PT3: les 3 premières minutes se passent simultanément dans un bain composé d'une solution de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  à 2% et dans le bac d'ultrasons. On entre ensuite le récipient sous la hotte de manière à rincer dans de l'eau distillée autoclavée les paquets. On les transfère dans la solution de  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  à 5% où on les laisse tremper pendant 20 minutes, ceci s'effectuant à l'extérieur de la hotte. Les rinçages qui suivent sont, par contre, de nouveau faits sous la hotte et dans de l'eau distillée autoclavée.

Cette méthode de traitement est directement inspirée de celle que Mitchell (1989) applique à Kew. Quelques modifications ont cependant été apportées aux CJB, chaque laboratoire a ses spécificités qui impliquent des adaptations. La fabrication des paquets est identique, on utilise des filtres ronds que l'on plie et que l'on agrafe (fig. 19, p 36). Aux CJB, par mesure de sécurité, on autoclave au préalable les filtres et on les conserve dans leur récipient d'autoclavage jusqu'à l'utilisation. Mitchell (1989) laisse ses paquets s'humecter pendant 5 à 10 minutes avant de les tremper dans la solution de prétraitement, aux CJB, on les plonge directement dedans. Les solutions désinfectantes-prétraitantes préconisées par Mitchell (1989) sont: l'hypochlorite de sodium (eau de Javel) à des concentrations variant de 0.5 à 5% additionné de quelques gouttes d'un mouillant (un détergent comme le «Tween 80», par exemple) ou une solution saturée d'hypochlorite de calcium (cette dernière étant obtenue en dissolvant 10 g d'hypochlorite de calcium dans 140 ml d'eau distillée, en mélangeant vigoureusement le tout pendant 3 à 5 minutes, puis en filtrant la solution). Pendant la durée du prétraitement, aux CJB, on laisse les paquets tourner sur un mélangeur de laboratoire, comme le fait Mitchell (1989). Les durées de traitements à Kew varient entre 10 et 50 minutes alors qu'aux CJB, on traite pendant 20 minutes. Quant au nombre de rinçages, Mitchell (1989) en fait un de plus que ce qui est pratiqué aux CJB: trois au lieu de deux.

En résumé, les différentes méthodes de désinfection-prétraitement utilisées pour les graines sèches sont les suivantes (Tab. 1):

Désinfection-prétraitement:	Remarques:	Références:
Ca(OCl) <sub>2</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Différentes concentrations.</li> <li>• Différentes durées (15 min à 8 h).</li> <li>• Ajout de «Tween 80».</li> </ul>	Downie, 1940, 1959. Mollison, 1943. Harvais, Hadley, 1967. Kano, 1968. Smith, 1973. Van Waes, Debergh, 1986. Manning, Van Staden, 1987. Rasmussen, 1992.
NaOCl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Différentes concentrations.</li> <li>• Différentes durées (2 min à 45 min).</li> <li>• Ajout de «Tween 80» ou «7x».</li> </ul>	Clements, Ellyard, 1979. Linden, 1980. Lucke, 1984. Clements <i>et al</i> , 1985. Rasmussen <i>et al</i> , 1990. Rasmussen, 1990, 1992.
«Domestos»	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dilué à 5%.</li> <li>• Pendant 20 min.</li> </ul>	Hadley, Harvais, 1968. Hadley, 1970. Purves, Hadley, 1976.
«Milton»	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dilué à 20%.</li> <li>• Pendant 15 à 20 min.</li> </ul>	Warcup, 1971.

**Tab. 1: méthodes de désinfection de graines sèches.**

Les graines issues de capsules récoltées à un stade encore vert, quant à elles, n'ont pas besoin d'être désinfectées individuellement puisqu'elles sont encore protégées dans leur capsule fermée. Il faut, cependant, tout de même, nettoyer l'extérieur pour pouvoir entrer le matériel sous la hotte sans amener d'inoculum. Ce traitement est donc une simple désinfection et n'a pas la fonction de lever la dormance (on utilise justement des graines immatures pour contourner ce problème!). La désinfection s'effectue comme suit: on plonge les capsules dans une solution de Ca(OCl)<sub>2</sub> à 5% pendant 20 minutes, les 3 premières se passant dans le bac à ultrasons, puis on effectue deux rinçages dans de l'eau distillée et autoclavée (cette dernière étape ayant lieu sous la hotte).

Contrairement aux prétraitements appliqués aux graines sèches, le traitement des capsules vertes implique un semis immédiat. En effet, la conservation, pendant quelques jours, des graines désinfectées, encore emballées dans les paquets, dans de l'eau distillée est possible avec les graines matures. Par contre, les graines de capsules vertes sont encore hydratées et risqueraient de se dessécher si on les gardait dans une boîte de Pétri. Il n'est pas non plus possible de les conserver dans de l'eau car elles resteraient trop exposées à n'importe quel inoculum que ce soit.

Jusqu'à maintenant, cette méthode pour les graines immatures était appliquée aux CJB, mais comme le taux d'infections des semis s'est avéré être trop élevé, il a été prévu, qu'à l'avenir, la désinfection se ferait avec une solution plus concentrée et/ou avec une durée de traitement plus longue (en tous cas, on gardera le passage dans le bac à ultrasons). On essaiera aussi de semer les graines dès leur réception pour limiter les risques d'infections et pour que le stockage ne provoque pas le dessèchement des capsules. Il arrive, en effet que, pendant la phase de stockage, ces dernières se fendent (les graines ne sont alors plus stériles) puisque leur taux d'humidité diminue malgré toutes les précautions de conservation prises (pose sur un papier filtre imbibé d'eau distillée autoclavée, conservation dans un Pétri scellé).

Il existe encore une variante à cette méthode de désinfection des capsules vertes. Celle-ci concerne uniquement le genre *Cypripedium* L. dont la paroi des capsules est nettement plus épaisse que chez les autres orchidées terrestres. Il s'agit d'une pratique dérivée de la désinfection des capsules d'orchidées épiphytes: on fait tremper ces dernières pendant 20 minutes dans la solution de  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  à 5%, puis on les rince sous la hotte dans de l'eau distillée autoclavée avant de les flamber à deux reprises à l'aide d'alcool pur. Les capsules des autres genres, ayant une enveloppe beaucoup plus fine que *Cypripedium* L., ne supporteraient pas un tel échauffement et se fendraient. On risquerait alors de voir les graines se dessécher, voire de brûler

Pour les capsules vertes aussi, on peut résumer les différents traitements sous forme de tableau suivant (Tab. 2):

Désinfection-prétraitement:	Remarques:	Références:
Lavage dans l'éthanol à 70%, puis trempage dans NaOCl.	Trempage pendant 30 min. Concentration de NaOCl: 0.6%.	St-Arnaud <i>et al</i> , 1992.
Trempage dans l'éthanol, suivi de flambage.		Linden, 1980.
Trempage dans du «Chlorox», suivi de flambage.	Trempage pendant 15 min. Concentration du «Chlorox»: 50%.	Ballard, 1987.

**Tab. 2: méthodes de désinfection des capsules vertes.**

#### 2.1.5. Le semis.

Voilà enfin l'étape-clé de la propagation d'orchidées terrestres. Le but est, comme pour le semis traditionnel de mettre en contact les graines avec le milieu où elles seront à même de germer. La différence ici réside dans le fait que l'on se trouve dans une atmosphère aseptique (hotte à flux laminaire; fig. 20, p 36) et que les milieux utilisés ne sont pas constitués des «ingrédients» habituellement utilisés en atmosphère extérieure (terre, humus, compost...). Une fois de plus, il faut tenir compte de l'état de maturité des graines que l'on sème car la différence entre les prétraitements subis par les unes et les autres fait qu'elles se trouvent dans des états de préparation différents.

Lorsque l'on a terminé les prétraitements-désinfections avec les graines matures, celles-ci se trouvent emballées dans les petits paquets, dans un récipient contenant de l'eau distillée. Il faut donc, à l'aide de pinces, sortir un petit paquet, l'appuyer légèrement contre le bord du récipient afin d'en évacuer l'excès d'eau, couper le pli du paquet sur lequel est fixé l'agrafe pour pouvoir déplier le filtre (fig. 19, p 36). Ensuite, on ouvre le paquet et on étale la face sur laquelle sont agglutinées les graines sur le milieu solidifié dans la boîte de Pétri. Les graines se déposent par capillarité. On essaie ensuite de bien les répartir sur toute la surface (en faisant des mouvements de va-et-vient avec le filtre) pour qu'elles aient toutes autant de chance et d'espace pour germer (Mitchell, 1989) (fig. 21 et 22, p 37).

Cette méthode utilisée à Kew est aussi appliquée aux CJB. Etant donné la valeur élevée de certaines graines, il est possible, s'il reste encore de quoi semer sur le filtre, d'étaler une seconde fois le papier sur un autre milieu. Cela permet, à l'aide d'un seul paquet, de semer sur différents milieux et donc de comparer entre elles, les capacités des milieux utilisés à stimuler la

germination. C'est ce qui est pratiqué aux CJB où, parfois, par manque de graines pour une certaine orchidée, on ne peut confectionner qu'un seul petit paquet.

Pour les semis de routine, Mitchell (1989) a développé une technique personnelle faisant usage d'une pompe à vide, mais lorsqu'il a peu de graines à semer, il utilise la méthode décrite ci-dessus. Pour leurs semis, Clements *et al* (1985) se sont servis de suspensions de graines obtenues par filtration par le vide (de la solution contenant les graines et le traitement), et par resuspension du dépôt sur le filtre dans de l'eau désionisée. Des échantillons de ces dernières sont, ensuite, versés sur du papier à chromatographie (sous vide) qui, eux-mêmes sont déposés à la surface du milieu. En fait, le but à rechercher avec chaque technique de semis est d'étaler de manière la plus uniforme possible les graines sur leur milieu de culture.

Les graines immatures sont encore emprisonnées dans leur capsule ce qui les préserve dans leur état stérile. Grâce à la désinfection, la capsule est propre et se trouve dans la hotte à flux laminaire (fig. 20, p 36). On aura pris soin, à partir de cet instant, de réduire la force du vent par le biais du voltage, à 80 V (normalement, il se trouve à 120-130 V), pour éviter que les graines libérées de leur capsule ne soient soufflées hors de la hotte. Le semis se passe comme suit: avec une pince, on tient la capsule à sa base, et avec un scalpel, on l'ouvre sur toute sa longueur. Ceci s'effectue au-dessus d'une boîte de Pétri contenant du milieu solidifié, on secoue doucement la capsule afin que les graines puissent tomber sur le milieu. Si rien ne tombe, on les étale directement. Il faut veiller à ne pas trop appuyer sous peine de voir s'enfoncer la capsule dans le milieu, il faudrait juste pouvoir déposer les graines à la surface. Par la suite, cela facilite le travail d'observation à la loupe binoculaire car les graines se trouvent toutes à la même distance de l'objectif et ne sont pas recouvertes de milieu (observations personnelles, 1999-2000). Les graines issues de capsules flambées sont semées exactement de la même manière, même si, malgré toutes les précautions prises, il arrive qu'un bout de capsule atterrisse sur le milieu. Ce dernier incident n'est pas trop grave puisque le flambage a tout stérilisé.

Pour ses expériences, Linden (1980) a suivi la même procédure mais, au lieu d'étaler les graines avec la capsule, ils les a d'abord extraites à l'aide d'un instrument. St-Arnaud *et al* (1992) se sont, quant à eux, servis de coupes transversales de la partie centrale de la capsule (1 à 2 mm d'épaisseur) qu'ils ont déposées sur le milieu de germination.

Etant donné l'existence d'une multitude de conditions de mise en culture et de traitements de température et de lumière appliqués aux semis, un chapitre (2.2.) spécialement consacré à ces sujets sera exposé ultérieurement.

#### 2.1.6. Le repiquage.

Cette étape suivant le semis, a lieu quand la germination et la production de protocormes se sont réalisées. Elle est nécessaire car, inévitablement, les protocormes ont une distribution trop dense: au semis, les graines étaient de très petite taille et il était possible d'en étaler beaucoup sur le milieu de culture; mais lorsque la germination a débuté, les protocormes ont enflé et leurs besoins nutritifs ont, de ce fait, proportionnellement augmenté (fig. 23 et 24, p 38). Il faut donc les transférer vers un milieu où chacun a plus d'espace pour croître et subsister: d'une boîte de Pétri contenant une couche de graines contiguës, il faut les transférer, à raison de 5 protocormes (en culture symbiotique) ou 15 à 20 (en asymbiotique) par boîte, sur un nouveau milieu (Mitchell, 1989).

Le principe du repiquage est le même quel que soit le mode de culture choisi: en effet, la mycorhize se trouvant dans les tissus du protocorme, au repiquage, elle est simultanément

transférée avec lui. L'inoculation du milieu n'est donc plus nécessaire, la mycorhize proliférant à partir du protocorme (Mitchell, 1989).

Par contre, il est important de faire la distinction entre les deux méthodes lors du contrôle des boîtes de semis, car le développement des protocormes en mode symbiotique est généralement plus rapide qu'en mode asymbiotique (Mitchell, 1989). De plus, la présence d'une mycorhize trop vigoureuse pourrait altérer leur développement en créant une pression de compétition trop importante. S'ajoute à cela, que si le bon moment de repiquage est dépassé, des blocages de croissance peuvent avoir lieu (Mitchell, communications personnelles, 1998). En ce qui concerne les semis asymbiotiques, on a constaté que les graines immatures germaient beaucoup plus rapidement que si elles étaient en milieu symbiotique; ce sont donc également des boîtes de Pétri à surveiller de près.

En espaçant les protocormes par le repiquage, on offre, en fait, à la mycorhize un plus vaste terrain de prélèvement des nutriments ce qui, indirectement, permet au protocormes de devenir bien plus gros et vigoureux (Mitchell, 1989). D'où l'importance de bien détecter le stade précis auquel il faut réaliser l'opération, car plus un protocorme est gros, plus son sevrage sera facilité. Il n'est pas vraiment possible de donner un nombre de jours précis (suivant le semis) concernant le moment idéal du repiquage, car l'évolution des protocormes est fortement dépendante du genre d'orchidée, de la vigueur de la mycorhize en présence, des conditions de température, du milieu, de la densité du semis, etc. Par contre, on peut décrire l'apparence qu'ils ont: il faut que le testa ait disparu, que l'embryon soit enflé, qu'il porte des rhizoïdes [cellules épidermiques allongées qui ressemblent à des poils absorbants et en jouent le rôle, Gatin (1924)] et que l'on aperçoive le bourgeon apical (Mitchell, 1989).

Le repiquage est donc doublement délicat: le stade idéal de transfert doit être surveillé de très près afin de ne pas le manquer (pour éviter toute concurrence entre les individus et tout arrêt de croissance) et l'état dans lequel, morphologiquement, les protocormes se trouvent les rend très sensibles au dessèchement et aux blessures (présence de rhizoïdes, tissus hydratés et souvent très cassants, caractéristiques des cultures *in vitro*) (fig. 24, p 38).

Aux CJB, on procède de la manière suivante: l'intérieur de la hotte est désinfecté à l'aide d'alcool à 70%, les instruments (scalpels, pinces, instruments en forme de petite cuillère) dans des tubes à essai stérilisés dans l'autoclave sont également aspergés d'alcool et entrés dans la hotte, les boîtes de Pétri contenant les semis sont désinfectées extérieurement avec l'alcool et déposées contre la paroi injectant l'air. On attend un moment afin que le flux d'air redevienne laminaire et pousse hors de l'enceinte de la hotte les éventuelles causes d'infection, avant de baisser la tension du courant à 80 V. On est obligé de la réduire énormément car au moment du transfert des protocormes, le souffle d'air dessèche extrêmement vite les tissus (observations personnelles, 1999-2000).

Le choix de l'instrument de transfert dépend de l'aisance éprouvée par le propagateur: on peut utiliser une pince longue pour attraper le protocorme et une petite pince pour le détacher des autres avec lesquels les rhizoïdes sont entremêlés; on peut se servir d'un instrument ressemblant à une toute petite cuillère au bout d'un long manche avec lequel on prélève le bout de milieu sur lequel se trouve le protocorme et une petite pince pour le détacher des éventuels protocormes l'entourant, ou on peut encore découper le cube de milieu le portant à l'aide d'un simple scalpel. Il appartient à chacun de développer sa propre méthode pour autant que les instruments soient bien refroidis à la sortie du stérilisateur (sinon de graves brûlures sont provoquées sur les protocormes) et que le temps écoulé entre le moment où on ouvre la boîte de Pétri contenant le semis et celui où on dépose le protocorme sur son nouveau milieu soit le plus court possible.

On veillera également à refermer chaque boîte entre toutes les opérations (fig. 25 et 26, p 39). Le bref temps du transfert provoque déjà le dessèchement des rhizoïdes qui prennent un aspect tout «fané» et recroquevillé. Heureusement, après quelques jours, ces poils se redressent et de nouveaux apparaissent. Cet événement provoque tout de même des blessures car les protocormes montrent des tâches brunâtres à la base des rhizoïdes desséchés ou arrachés (si les protocormes étaient entrelacés avec d'autres rhizoïdes) (observations personnelles, 1999-2000). C'est à ce moment que l'on comprend l'intérêt de pratiquer un semis pas trop dense: les orchidées terrestres produisent, en effet, beaucoup de rhizoïdes, ceci est bien sûr lié à leur mode de vie terrestre (contrairement aux genres épiphytes où ils sont remplacés par le «velamen», sorte de voile constitué d'un réseau très dense de poils absorbants très fins) mais aussi à l'obscurité dans laquelle elles poussent au laboratoire (Mitchell, 1989).

#### 2.1.7. La mycorhization.

Comme il a été écrit dans l'introduction, la mycorhization peut se réaliser à plusieurs stades à partir de la germination des semences. En général, elle a lieu au semis et découle du choix que le propagateur a fait pour débiter sa culture (symbiotique ou asymbiotique), mais il arrive aussi que l'inoculation mycorhizique se fasse au repiquage. Cette alternative est notamment suivie lorsque le propagateur n'arrive pas à obtenir de protocormes en culture symbiotique. C'est une situation souvent rencontrée quand la mycorhize est trop vigoureuse et qu'elle prend le dessus sur l'embryon amenant ce dernier à dépérir. Le semis s'effectue sur des milieux de culture asymbiotiques adéquats (certains milieux donnent d'excellents résultats avec de très belles formations de protocormes), puis, au repiquage, on apporte la mycorhize.

Il semblerait cependant, que les plantes ainsi obtenues soient moins vigoureuses que si elles avaient été tout de suite mises en compétition avec la mycorhize (fig. 27, p 40). Ceci est particulièrement vrai pour les plantes qui ont été produites en milieu asymbiotique pendant toute leur croissance *in vitro*; lorsqu'on les sèvre, rares sont celles qui supportent les attaques fongiques provoquées par tous les autres champignons présents naturellement *ex vitro* (Mitchell, 1989). Pour un jardin botanique qui veut faire de la réintroduction de plantes, cet argument est très important et devrait donc inciter à utiliser la première méthode décrite ci-après.

La manipulation aux CJB se passe comme suit: après avoir étalé les graines ou déposé les protocormes, on prélève un petit cube (0.5 à 1 cm de côté) de milieu (appelé milieu d'inoculation) dans lequel on a fait pousser la mycorhize et on le dépose à l'envers, sur le centre de la boîte de Pétri où se trouvent les graines ou les protocormes (Mitchell, 1989). Il aura été vérifié auparavant que ce cube contienne bien des hyphes du champignon. Ceci se contrôle au préalable, en regardant à contre-jour le milieu d'inoculation dans sa boîte de Pétri et en constatant que les hyphes recouvrent la surface entière du milieu (cet état est atteint en l'espace d'une semaine environ, suivant l'espèce de mycorhizes). Ensuite, le prélèvement d'un petit bout suffit à obtenir un nouveau développement. On dépose le cube à l'envers sur le milieu de culture des orchidées pour que le développement du champignon soit plus rapide, et au centre parce que les hyphes produits se propagent de manière radiale. Toutes les graines ou tous les protocormes sont ainsi mycorhizés de façon homogène (fig. 29 et 30, p 41).

Dans ses expériences, Mollison (1943) a mycorhizé le milieu sur lequel elle a semé ses graines sèches, 10 jours auparavant. Au semis, une légère couche de filaments mycéliens était visible. Aux CJB, cette méthode n'a pas été suivie du fait de l'utilisation à plusieurs reprises des petits paquets de semis pour étaler les graines (il y aurait eu mélange de mycorhizes dès le deuxième étalement avec le même paquet). Harvais, Hadley (1967) ont procédé de la même manière qu'aux CJB. Hadley (1970), quant à lui, a inoculé ses milieux de culture quelques jours après le semis. Downie (1957) l'a fait le lendemain de ses semis. Elle a suivi la même méthode que lors de ses expériences sur la nutrition en 1940, en prélevant des fragments d'hyphes qui

croissaient sur le bord de la boîte de Pétri et qui n'étaient plus en contact avec leur milieu de croissance. Ainsi, elle a pu transférer le champignon sans que celui-ci n'apporte d'autres éléments nutritifs qui auraient pu fausser ses résultats.

Comme il a été évoqué dans l'introduction à propos du rôle de la mycotrophie des orchidées terrestres, la mycorhization est une étape indissociable et indispensable à la vie de ces plantes (Breddy, Black, 1954), même lorsque le protocorme est déjà capable de subvenir à ses besoins (Clements, 1988). Afin de mieux comprendre pourquoi cette association avec un champignon est nécessaire, il faut se pencher sur la structure de la graine. Beaucoup d'auteurs (Mitchell, 1989; Reinhard *et al*, 1991; Spichiger *et al*, 2000) prétendent, en effet, que celle-ci ne contient pas d'albumen, mais selon d'autres (Harrison, 1977; Manning, Van Staden, 1987; Rasmussen, 1995), il y aurait bien des réserves sous forme très concentrée de protéines et de lipides, parfois de quelques grains d'amidon (Dijk, 1988; Rasmussen, 1995). En fait, ces quelques réserves seraient directement stockées dans l'embryon (Harrison, 1977, Manning, Van Staden, 1987). Il est vrai que l'infime taille de la graine ne permet pas vraiment le stockage de nutriments car l'embryon entouré de sa carapace (couche unicellulaire le recouvrant très intimement; Lucke, 1984), du testa et de la couche d'air comprise entre ces deux dernières occupent déjà tout le volume disponible (Reinhard *et al*, 1991).

Malgré cette situation inhabituelle de stockage de réserves et grâce à ses expériences sur la germination des graines d'orchidées, Harrison (1977) a pu en déduire les étapes suivantes:

- la graine s'imbiberait d'eau et grossirait jusqu'au stade de protocorme tout en utilisant ses réserves protéiques, ce processus nécessitant, en effet, l'imbibition (Manning, Van Staden, 1987; Rasmussen, 1990).
- Ensuite, le protocorme resterait en attente de l'infection d'une mycorhize pour continuer son évolution jusqu'à la plante finie (Hadley, Williamson, 1971; Hadley, 1982, 1983; Zettler, Mcinnis, 1992; Rasmussen, 1995).

Pendant toute cette période de latence, les lipides apporteraient l'énergie nécessaire à l'embryon juste pour survivre, sans pour autant être transformés en hydrates de carbones (Rasmussen, 1990). L'embryon aurait donc une incapacité à métaboliser ses réserves en sucres (Harrison, 1977).

Seul un apport de sucres de l'extérieur permettrait leur stockage dans le protocorme (Purves, Hadley, 1976; Harrison, 1977) et ce serait à partir de ce moment que la lipolyse pourrait se faire (Manning, Van Staden, 1987, Dijk, 1988) ou se ferait dans un rythme beaucoup plus soutenu (Harrison, 1977). La mycorhization n'interviendrait finalement qu'après la formation du protocorme (Harvais, Hadley, 1967; Hadley, 1970; Hadley, Williamson, 1971; Harrison, 1977; Hadley, 1982, 1983; Reinhard *et al*, 1991) et elle seule serait à même de déclencher la suite de l'évolution du protocorme en plante finie. Ainsi, malgré leur capacité à survivre en «latence» comme indiqué ci-dessus, les embryons d'orchidées ne seraient pas capables de se développer entièrement sans un apport extérieur de source d'énergie (Downie, 1940; Manning, Van Staden, 1987; Rasmussen, 1995).

Mitchell (1989) affirme pourtant le contraire en soutenant l'hypothèse que la formation du protocorme nécessiterait d'abord l'introduction du champignon dans les tissus de la graine. L'infection pourrait donc avoir lieu à deux moments différents [suivant les auteurs et les genres d'orchidées: Downie, 1940, 1941 pour *Goodyera repens* (L.) R. Br.; Harvais, Hadley, 1967 pour *Orchis purpurella* (T. & T. A. Stephenson) Soó; Purves, Hadley, 1976 pour *Goodyera repens* (L.) R. Br.; Hadley, 1982, 1983 pour *Dactylorhiza purpurella* (T. & T. A. Stephenson) Soó; Rasmussen, 1990 pour *Dactylorhiza majalis* (Reichb.) P. F. Hunt & Summerhayes; Zettler, Mcinnis, 1992 pour *Platanthera integrilabia* (Correll) Luer] et par deux endroits différents. Si celle-ci devait se passer au stade de la graine avant imbibition, les hyphes pénétreraient par les larges cellules du suspensoir (Mollison, 1943; Mitchell, 1989; Rasmussen, 1990, 1992; Smith,

Read, 1997), par contre, si elle devait avoir lieu une fois la formation du protocorme achevée, le suspensoir resterait une des portes d'entrées (Hadley, 1983; Clements, 1988), mais les rhizoïdes constitueraient l'autre voie (Mollison, 1943; Harvais, Hadley, 1967; Purves, Hadley, 1976; Hadley, 1983; Rasmussen, 1990, 1992; Smith, Read, 1997).

De toutes façons, il a été constaté que la mycorhize ne rentrait pas uniquement dans l'orchidée à la germination mais qu'au cours des cycles de vie de la plante, il y avait souvent réinfection des tissus (Mollison, 1943; Harvais, Hadley, 1967; Alexander, Alexander, 1984; Smith, Read, 1997). Ces dernières, selon Rasmussen (1995), joueraient un rôle important dans le cycle annuel des orchidées puisqu'elles permettraient de déclencher le mécanisme de stockage des sucres dans les racines (réserves), conférant à ces plantes leur caractère vivace (Delforge, 1994).

Avec les changements de saison, la croissance des tissus et l'équilibre précaire existant entre les deux partenaires, il est concevable, qu'à un moment, la mycorhize soit en perte de vigueur et qu'elle dépérisse (parfois même, sous l'action de l'orchidée qui sécréterait des substances antifongiques: les phytoalexines). Elle laisserait alors une «niche» vide au bénéfice d'une souche plus saine, du même ou d'un autre genre. Le protocorme n'existant plus à ce moment, il est bien évident que cette réinfection doit s'effectuer par les cellules de l'épiderme des organes souterrains (Smith, Read, 1997). Or, d'après les observations de Mollison (1943) sur *Goodyera repens* (L.) R. Br., elle ne s'observerait que par le biais des poils absorbants du rhizome mais pas par les cellules épidermiques non transformées. Pourtant, Rasmussen (1995) aurait bien observé que des hyphes pénétraient par les cellules épidermiques de certaines espèces (à un stade ultérieur à celui du protocorme): *Liparis lilifolia* A. Rich., *Corallorhiza odontorhiza* et *Tipularia discolor*.

Ces voies d'infection (poils absorbants, plus rarement, les cellules épidermiques) seraient valables pour les contaminations provenant du sol mais il arriverait aussi qu'elles se fassent par l'intérieur des tissus: on assisterait alors à une «infection» se déplaçant de cellule en cellule grâce à la croissance des hyphes (Smith, Read, 1997).

Finalement, la mycorhization, sans laquelle le protocorme mourrait, permettrait de procurer à l'embryon les hydrates de carbone nécessaires à sa croissance pour atteindre le stade de plante finie (Manning, Van Staden, 1987). L'association protocorme-mycorhize pourrait s'effectuer de deux manières: d'une part, les éléments nutritifs seraient acheminés par le biais des hyphes dans les cellules de l'embryon (Smith, 1966, 1967; Harvais, Hadley, 1967; Hadley, Williamson, 1971; Purves, Hadley, 1976; Hadley, 1982, 1983; Dijk, 1988), d'autre part, certaines cellules spécialisées seraient capables de «digérer» les hyphes ou pelotes (fig. 28, p 40) du champignon afin d'obtenir ce dont elles ont besoin (Hadley, Williamson, 1971; Dijk, 1988; Rasmussen, 1990; Smith, Read, 1997).

Le premier cas éviterait ainsi à l'embryon d'être en compétition avec les autres microorganismes du sol, puisque la mycorhize accomplirait la tâche du prélèvement des matières carbonées du sol en apportant directement les sucres disponibles de la solution environnante, dans les cellules de l'embryon (Harvais, Hadley, 1967; Hadley, 1983; Dijk, 1988). Cet avis n'est pas partagé par Curtis (1939) qui prétend que les hyphes ne se trouvant pas sous forme de pelotes ne joueraient que le rôle de propagateurs du champignon au sein des tissus de l'orchidée. Il prétend, en effet, qu'on ne les rencontre que très rarement sous cette forme.

Dans le second cas, l'orchidée jouerait plutôt le rôle d'un parasite par rapport au champignon. En effet, en le «consommant» ainsi, elle se procurerait toutes les matières

carbonées que la mycorhize aurait prélevées du sol et métabolisées en ses propres tissus sous forme d'hydrates de carbone (Hadley, 1969; Clements, 1988; Rasmussen, 1995; Smith, Read, 1997).

Contrairement à ce que beaucoup d'auteurs prétendent (Cronquist, 1981; Landwehr, 1982), il y aurait donc bien des tissus différenciés à l'intérieur de l'embryon. En effet, Mollison (1943), Hadley (1982), Clements (1988) et Rasmussen (1990) distinguent dans celui-ci des cellules différenciées avec des fonctions bien déterminées. On peut distinguer entre eux ces tissus en observant la présence ou l'absence d'hyphes ou de pelotes dans les cellules. Il y aurait, selon ces auteurs, des cellules d'entrée, des cellules de garde et des cellules de digestion des hyphes. Suivant le compartiment dans lequel se trouverait le champignon, il jouerait donc, soit le rôle de canal (cellules d'entrée et de garde), soit celui de nourriture pour l'embryon (cellules de digestion). Grâce à ses observations, Mollison aurait déduit un positionnement au sein des tissus: les couches externes (exception faite de celles de l'épiderme) ne contiendraient que des hyphes et des pelotes lâches, alors que les couches internes seraient occupées par des pelotes dont la seule issue serait celle d'être digérées.

Cependant, pour Hadley, Williamson (1971), la lyse des hyphes et pelotes ne représenterait pas une source de nutriments (sauf en situation de «disette») mais serait plutôt une réaction de défense de la part de l'embryon. Il est vrai que Mollison (1943) aurait constaté dans ses expériences une croissance des embryons dès le début de l'infection mais bien avant que la digestion des pelotes ne fût visible. En plus, elle aurait observé que les parties infectées ne l'étaient pas uniformément: seules les parties entourant les poils absorbants du rhizome présentaient des hyphes. Son explication serait que, soit l'orchidée produirait des facteurs limitant l'infection à une partie de ses organes, soit les hyphes subiraient une perte de vitalité au cours de leur colonisation. Par une même méthode de défense contre tous les champignons tentant de l'infecter, l'embryon sélectionnerait la mycorhize adéquate à son association: la seule résistante devenant alors son «associée» (Clements, 1988). Ce mécanisme lui permettrait de n'être infecté que par un champignon dont la résistance aurait prouvé son efficacité face aux autres organismes du sol. Ensuite seulement, la germination pourrait débuter (Clements, 1988).

Une réaction de défense similaire aurait été constatée par Rasmussen (1990): l'infection par la mycorhize chez *Dactylorhiza majalis* (Reichb.) P. F. Hunt & Summerhayes ne pourrait se réaliser qu'à partir des rhizoïdes, tous les hyphes tentant de pénétrer par les cellules du suspensoir et essayant de former des pelotes dépérissant sous l'action de sécrétion de phytoalexines par ces cellules. Cette situation indiquerait donc, que pour cette orchidée-ci, l'infection ne serait admise qu'au stade de protocorme et que l'embryon serait capable de survivre jusque là sur ses réserves lipidiques. A partir de l'infection, une hausse substantielle des hydrates de carbone dans l'embryon aurait été constatée, ce qui indiquerait la contribution du champignon. En effet, c'est à partir de ce moment que l'on verrait la formation de pelotes avoir lieu ainsi que leur digestion. Mais c'est également là que les mitoses à l'intérieur de l'embryon seraient mises en route. Outre son rôle de «nourrice», il semblerait donc que l'infection mycorhizique déclenche des voies métaboliques nouvelles dans l'embryon, l'amenant à initier le développement du méristème et les différenciations qui s'en suivent (Mollison, 1943; Hadley, Williamson, 1971; Purves, Hadley, 1976; Hadley, 1982; Manning, Van Staden, 1987; Rasmussen, 1990; Smith, Read, 1997). Ceci expliquerait la plus grande rapidité d'absorption des hydrates de carbone du milieu par les protocormes infectés (par rapport aux protocormes cultivés en mode asymbiotique), leur métabolisme «drainant» plus vite les sucres (Purves, Hadley, 1976; Hadley, 1984; Manning, Van Staden, 1987).

A la vue de ces différentes constatations, la destruction des tissus de mycorhizes pourrait avoir deux fonctions: d'une part, elle permettrait à l'orchidée de se défendre (par le biais de sécrétions de phytoalexines; à la germination mais aussi à certaines phases dans le cycle

annuel, expliquant ainsi la nécessité des réinfections saisonnières des tissus), d'autre part, elle représenterait une source de nutriments pour son développement (Dijk, 1988).

Une dernière question à propos de la mycorhization reste à être posée: existe-t-il une relation de spécificité entre l'embryon et le champignon? Au tout début de la culture *in vitro* des orchidées, il était admis qu'un genre ou une espèce abritait toujours la même mycorhize puisque la mise en commun de deux partenaires quelconques n'aboutissait pas toujours à une association bénéfique (Hadley, 1983). Mais au fil des isolations à partir de tissus infectés et des mises en culture commune de ces souches ainsi que de graines d'orchidées ou de protocormes, plusieurs constatations ont pu être faites.

Premièrement, une espèce d'orchidée pourrait tout à fait abriter, au stade adulte, plusieurs endophytes différents (Breddy, Black, 1954; Dijk, 1988). Mais cela ne signifierait pas encore que ces souches seraient toutes bénéfiques à la germination des graines. Il existerait donc, une sorte de sélectivité au moment de la germination, l'embryon nécessitant une mycorhize précise [des réactions de rejet de la mycorhize étant possibles (Warcup, 1971; Smith, Read, 1997)]; et elle disparaîtrait ou s'atténuerait au cours du passage à l'âge adulte. Ainsi, plusieurs champignons différents pourraient être rencontrés dans une même espèce adulte, mais une seule ou un nombre restreint ne se révélerait vraiment efficace pour déclencher le stimulus de croissance de l'embryon. C'est ce qu'ont constaté Curtis (1939), Downie (1941, 1959), Harvais, Hadley (1967), Hadley (1970, 1983) et Zettler, Mcinnis, (1992).

Deuxièmement, il semblerait bien plus probable que la mycorhize soit spécifique à un milieu naturel et que, rencontrant une certaine espèce d'orchidée poussant habituellement dans cet écosystème, la relation entre les deux soit très fréquente (Downie, 1943; Dijk, 1988). Ceci aurait induit les chercheurs en erreur en leur faisant croire à une relation assez spécifique (Curtis, 1939; Harvais, Hadley, 1967; Hadley, 1970; Dijk, 1988; Smith, Read, 1997).

#### 2.1.8. Le sevrage.

Pour la culture *in vitro*, le sevrage représente le passage de la plante d'un milieu aseptisé, c'est-à-dire indemne d'agents pathogènes, et clos (tube à essais, boîte de Pétri,...) vers un milieu plus ou moins «ouvert». Pour la première fois, elle est mise en contact avec l'air ambiant et des conditions climatiques moins stables et contrôlées: serre ou air extérieur par opposition à une chambre de culture. Cette étape présente donc un certain nombre de risques pouvant endommager sa santé. En effet, la plantule n'a jusqu'ici été habituée qu'à un milieu peu agressant (pas d'attaques de microorganismes pathogènes et conditions climatiques favorables), elle n'a, de ce fait, pas développé de systèmes immunitaire et de protection contre les stress environnementaux [tissus non «durcis» c'est-à-dire non subérifiés (Vidalie *et al*, 1984)] assez performants. On conçoit dès lors, aisément, que le pourcentage de reprise soit assez faible. Toutefois, le sevrage d'orchidées cultivées *in vitro* a donné de bons résultats avec des plantes ayant tout de même su s'adapter à leur nouvel environnement et ayant continué leur développement comme si elles avaient toujours vécu dans leur milieu naturel.

Empiriquement, on a pu se rendre compte qu'il existait des moments plus propices au sevrage. En effet, dans les classifications décrites en introduction, on a vu que les orchidées pouvaient être réparties selon le mode de formation de leurs feuilles (chapitre 1.3.). Le sevrage a plus de chance de réussir quand la plante est en pleine période de végétation, moment où la mycorhize est la plus active et la plus présente dans les tissus. Pour les espèces à feuilles persistantes, le meilleur moment pour sevrer se situe à la fin de l'automne et au commencement de l'hiver, alors que pour les espèces à feuillage printanier/estival, la réussite est optimale au printemps, juste après la vernalisation. Pendant l'été, le sevrage est à déconseiller à cause des

risques de dessèchement des tissus, sauf si la plante a déjà formé un organe souterrain de réserves assez résistant à la sécheresse estivale.

Idéalement, le sevrage devrait avoir lieu quand le quotient racines/partie aérienne est le plus élevé: la grande quantité de racines permettant une mycorhization importante, et la faible quantité de tissus exposés à l'air ambiant limitant les stress climatiques. Il est possible d'augmenter la part des racines dans ce quotient de plusieurs façons. Rien que le fait de mycorhizer une culture permet déjà de stimuler la croissance racinaire et de repousser le début de la photosynthèse. Le maintien des boîtes de semis à l'obscurité ainsi qu'à des températures fraîches pendant une certaine période sont également des méthodes favorisant l'apparition de multiples racines (Rasmussen, 1995).

Quant au stade auquel les orchidées peuvent être sevrées, il dépend aussi des contraintes économiques du propagateur: plus la durée de culture *in vitro* peut être réduite au bénéfice d'une culture traditionnelle, plus le sevrage est effectué précocement. Les coûts liés aux chambres de culture et au matériel de laboratoire, ainsi que ceux de la main d'œuvre étant plus élevés. Mais il est dans l'intérêt de la plante que son sevrage se fasse quand la plantule est aussi grosse et vigoureuse que possible (Rasmussen, 1995). Pour Mitchell (1989), le moment le plus précoce mais viable représente celui où un protocorme mesure 3-5 mm, avec un apex de tige formé et visible. Pour les semis symbiotiques, le moment idéal est atteint quand la plantule présente des racines en croissance et quelques feuilles, et qu'elle se met à exsuder des substances brunissant le milieu gélosé et abîmant les racines [substances phénoliques (Vidalie *et al*, 1984)]. Pour les semis asymbiotiques, le choix du stade est plus difficilement détectable car leur sevrage a, généralement, entraîné de grandes pertes si bien que l'on ne l'a pas vraiment déterminé (Mitchell, 1989).

Le sevrage s'accompagne non seulement d'un changement de milieu en ce qui concerne la partie aérienne, mais également concernant la partie souterraine de la plante. En effet, d'un milieu composé de nutriments et d'agar stérilisés, les racines passent vers un substrat contenant plus ou moins de matières grossières et à des stades de décomposition différents (donc avec une multitude de microorganismes). Ceci implique une grosse adaptation de la part des racines. C'est pourquoi Mitchell (1989) effectue une étape intermédiaire pour ses semis symbiotiques. Il les repique d'abord dans du compost stérilisé (autoclavage pendant 15 minutes à 110°C à 1 atm., laissé pendant quelques jours ainsi puis autoclavé une seconde fois pour être sûr de sa totale stérilité) et arrosé de FIM liquide (milieu de culture utilisé pour le développement des mycorhizes, voir les données dans «culture des mycorhizes», chapitre 3.3.5.) tout en les gardant *in vitro*. Cela permet aux racines de continuer leur développement tout en s'habituant à la nouvelle structure du substrat (*Orchis militaris* L. et autres orchidées particulièrement sensibles). Ensuite, quand elles se mettent à produire des feuilles, elles peuvent définitivement être sevrées. Le substrat utilisé alors est appelé «compost de base de sevrage» et il a la même composition que le précédent additionné de quelques ingrédients supplémentaires.

Compost de base de sevrage:

- 1 partie de terreau de feuilles de hêtre/chêne (tamisé à 13 mm de finesse)
- 1 partie de perlite (mouture fine)
- 1 partie de «Terragreen»
- 1 partie de «mixture terrestre de base» (voir la composition plus loin)
- 0.1 ml de préparation à base de poudre de sabot et de corne, par litre de compost (préparation faite avec ½ cuillère à dessert de poudre pour 2 gallons), ceci étant les ingrédients supplémentaires au substrat intermédiaire.

Ce compost peut, au préalable, avoir été stérilisé et inoculé avec la mycorhize appropriée afin de faciliter l'installation des plantules (Breddy, Black, 1954). Pour ses semis asymbiotiques, Mitchell (1989) a constaté que, ses plantules n'étant absolument pas habituées à une quelconque concurrence, il était de très grand intérêt de bien débarrasser leurs racines de toute trace de milieu gélosé lors de leur passage au substrat traditionnel. Les milieux de culture *in vitro* contiennent, en effet, des sucres à un taux suffisamment élevé pour attirer de ce fait toutes sortes de microorganismes. Ces derniers faisant une concurrence trop importante pour ces orchidées «sans défense».

Comme pour les semis symbiotiques, on peut effectuer une étape intermédiaire dans le sevrage des cultures asymbiotiques: on repique les protocormes *in vitro*, mais dans un milieu inoculé. Les plantules, au moment de leur passage à l'air ambiant, sembleraient mieux s'installer que si elles avaient été maintenues en milieu asymbiotique (Breddy, Black, 1954; Westerman, 1959; Rasmussen, 1995).

D'autres substrats sont aussi utilisés pour le sevrage mais, selon Mitchell (1989), ils ne permettraient pas d'obtenir d'aussi bons résultats, sauf pour les plantes émergeant de leur première dormance. Ce sont le «mélange de base pour plantes terrestres» et le «mélange forestier pour plantes terrestres» selon Cribb et Bailes (1989). Le compost décrit ci-dessus est plus organique et drainant que ces deux derniers, ceci le rend plus délicat à utiliser pendant la saison de repos à cause du risque de dessèchement des jeunes tubercules.

Mélange de base pour plantes terrestres (utile pour une grande palette d'orchidées terrestres à tubercule):

- 3 parties de terreau désinfecté à la vapeur
- 3 parties de sable gréseux grossier ou de grès concassé (taille des particules: 6 mm)
- 2 parties de terreau de feuilles de hêtre/chêne (tamisé à 13 mm de finesse)
- 1 partie d'écorces de pin compostées (à 6 mm de grosseur)
- 1 ml de préparation à base de poudre de sabot et de corne, par litre de compost (préparation faite avec 1 cuillère à dessert de poudre pour 2 gallons).

Mélange forestier pour plantes terrestres utiles pour les genres poussant en forêts (*Cypripedium* L. *sp* par exemple) et ceux appréciant l'humidité (*Dactylorhiza* Nevski *sp*, par exemple):

- 2 parties de terreau désinfecté à la vapeur
- 2 parties de terreau de feuilles de hêtre/chêne (tamisé à 13 mm de finesse)
- 1 partie de tourbe fibreuse de sphaigne
- 1 partie de sable ou de grès concassé (à 6 mm de grosseur)
- 1 ml de préparation à base de poudre de sabot et de corne, par litre de compost (préparation faite avec 1 cuillère à dessert de poudre pour 2 gallons).

Aux CJB, la méthode appliquée reste au stade expérimental par manque de pratique (seulement 2 ans). Dans les années à venir, d'autres manières de sevrer seront expérimentées. La conservation *in vitro* des plantules 6 à 8 mois de plus pour sortir des plantes plus grandes et les acclimater en milieu naturel directement constitue un de ces projets. Mais actuellement, les plantules sont sevrées en fonction de la classification physiologique/phénologique en ce qui concerne la saison, et quand les protocormes possèdent une tige et suffisamment de racines (stade des rhizoïdes dépassé et présence de tissus bien blancs pour les racines). Si, au moment de cette opération, il y a des boîtes de Pétris contenant des protocormes à ce même stade mais infectés, ces derniers sont également sevrés (et non jetés). Les infections ne provoquant pas de lésions sur les tissus mycorhizés, la sortie à l'air ambiant exerce une pression de concurrence favorable aux protocormes, permettant ainsi leur sauvetage. Le substrat utilisé aux CJB est très simple et il se compose de:

- 2 parties de terreau de feuilles et autres déchets organiques compostés
- 1 partie de sable.

L'acclimatation des orchidées appliquée par Mitchell (1989) se fait sur une à deux semaines, en déménageant les boîtes de culture *in vitro* vers une serre, mais en les maintenant fermées. Beaucoup de précautions au niveau de la luminosité sont à prendre car même le soleil hivernal peut abîmer les jeunes feuilles. Ensuite, les couvercles sont légèrement soulevés pendant quelques jours pour être entièrement enlevés à la fin. A ce stade, le repotage a lieu dans le compost de base de sevrage; dans des récipients servant habituellement au semis ou dans des pots, à raison de plusieurs plantes par pot. Parfois, ces derniers sont choisis en terre cuite (pour leur porosité, contrairement aux pots plastiques) et il sont enfoncés dans de la tourbe ou du sable humidifié afin de préserver une ambiance humide plus stable autour des plantes.

Zettler, Mcinnis (1992) appliquent une autre méthode: ils déposent les protocormes symbiotiques (et devenus verts car exposés au préalable à la lumière) sur des filtres en papier humidifiés (avec de l'eau stérile et distillée). Ces derniers sont posés sur des boîtes contenant du sol d'un site de prélèvement des graines. Ensuite, les boîtes sont entreposées dans une serre et mises directement en contact avec l'air ambiant et la luminosité y régnant (au début du printemps).

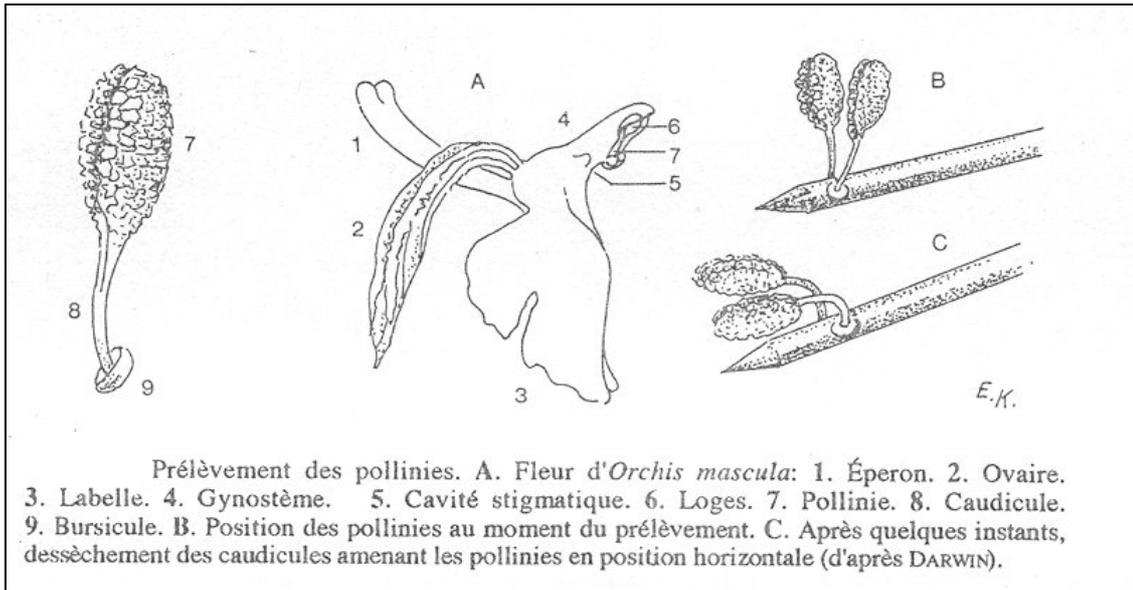
Pour les plantes induites à la dormance pendant la phase de culture en laboratoire, le sevrage peut se réaliser avec des tubercules en dormance. Ceci est très pratique car le risque d'abîmer de jeunes racines très cassantes est alors limité. Par contre, l'induction à la dormance est longue et peut coûter plus d'une année en temps de culture *in vitro* ainsi que de nombreux repiquages. Afin de tout de même sevrer les plantes possédant des racines, il est possible d'effectuer le dernier repiquage dans un milieu contenant moins d'agar. Ainsi, les racines se nettoient plus facilement et l'agar peut être détaché en limitant les dégâts liés aux cassures des tissus (Mitchell, 1989).

Les semis mycorhizés nécessitant une vernalisation en laboratoire peuvent tout à fait être sevrés au stade de protocorme, juste après leur période de froid. Ils sont empotés dans le compost de base de sevrage, les protocormes doivent être recouverts de 5 à 10 mm de substrat pour éviter le contact direct avec l'air. Le tout est entreposé à l'ombre et maintenu humide. L'avantage de cette méthode est la formation de tissus beaucoup plus «durcis» qu'en conditions aseptiques mais il faut tout de même surveiller l'exposition à la lumière car les premières feuilles sont produites avant l'apparition de vraies racines. Si elles venaient à dépérir à cause du dessèchement, les plantes n'auraient pas la capacité de survivre. En effet, à ce stade, les plantules dépendent encore entièrement des rhizoïdes du protocorme et de la mycorhize, il est donc essentiel que le substrat reste suffisamment humide (facteur limitant pour le bon «fonctionnement» de la mycorhize).

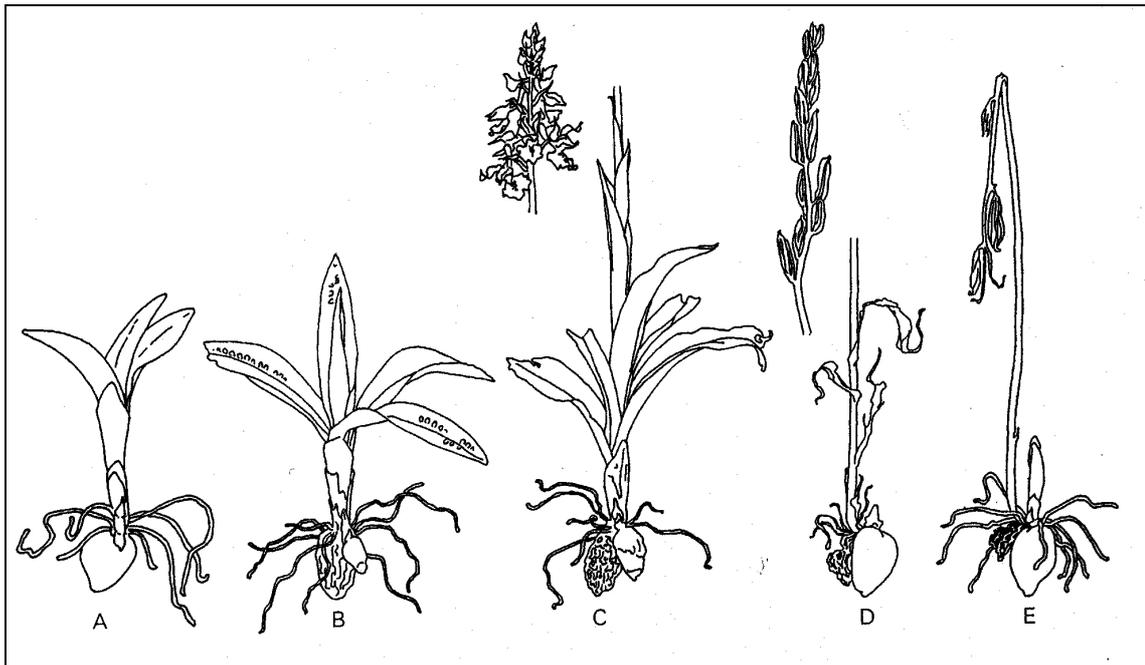
Les mêmes semis mais en conditions asymbiotiques, sembleraient mieux résister au sevrage s'ils sont maintenus *in vitro* jusqu'à la complète formation de plantules bien racinées (durée d'environ 1 an de culture). Le sevrage s'effectue alors pendant les mois d'hiver. Mais on peut aussi emballer les plantules dans de la sphaigne stérilisée dans un sac en polyéthylène et leur faire subir la vernalisation au frigo à 4°C pendant 3 mois pour ne les empoter qu'au printemps (Mitchell, 1989).

Aux CJB, on empote 3 protocormes par pot en terre cuite de 5 cm de diamètre, dans le mélange décrit ci-dessus. On les dépose au fond de trous, formés à l'aide d'un outil utilisé pour le repiquage en culture traditionnelle, et on rebouche ces derniers afin de bien protéger les protocormes du dessèchement. Pour humidifier, on n'arrose pas mais on pose les pots au bain-

marie, dans un récipient contenant de l'eau. Ainsi, le substrat est mouillé sans être détrempé puisque l'eau remonte par capillarité, et on évite de trop favoriser les attaques fongiques et l'asphyxie des rhizoïdes. Ensuite, les pots sont entreposés dans des couches sur une litière de sable et recouvertes de plaques de verre sur lesquelles une protection contre la lumière du soleil peut être ajoutée.



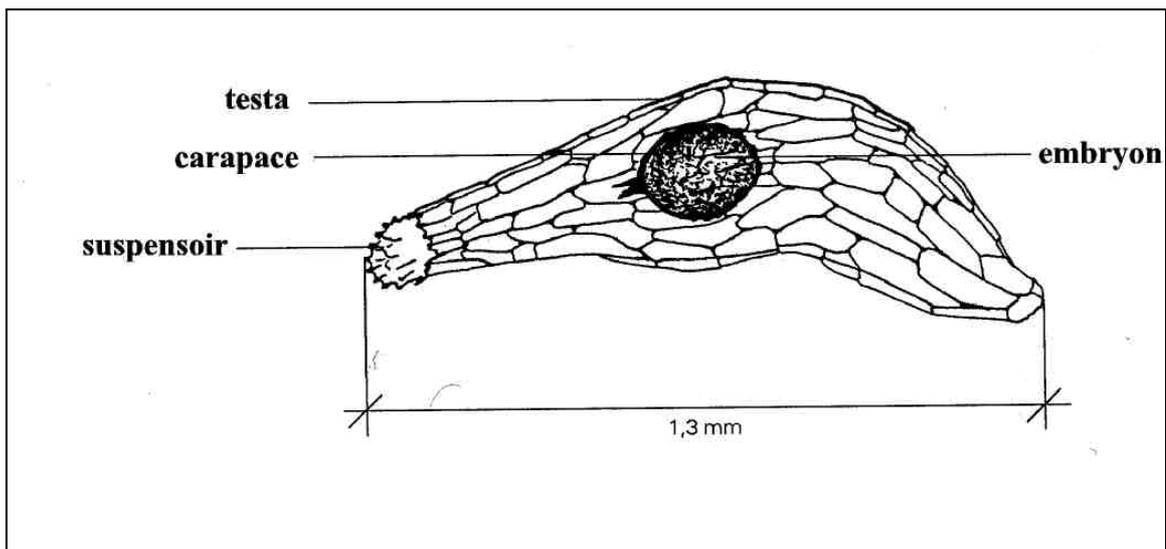
**Fig. 15** Pollinisation manuelle.



**Fig. 16** Etapes du cycle annuel d'une orchidée.



**Fig. 17 Conservation frigorifique des graines sèches emballées pour le semis.**



**Fig. 18 Schéma d'une graine d'orchidée terrestre.**

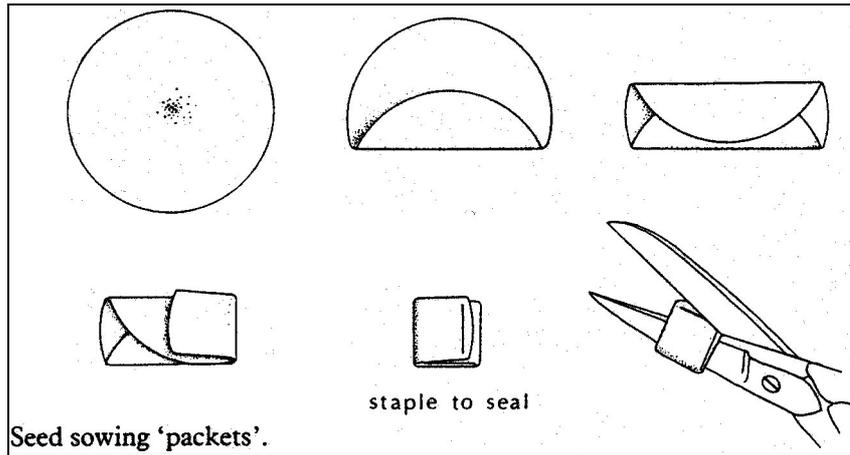


Fig. 19 Petits paquets utilisés pour la désinfection et le semis des graines sèches.

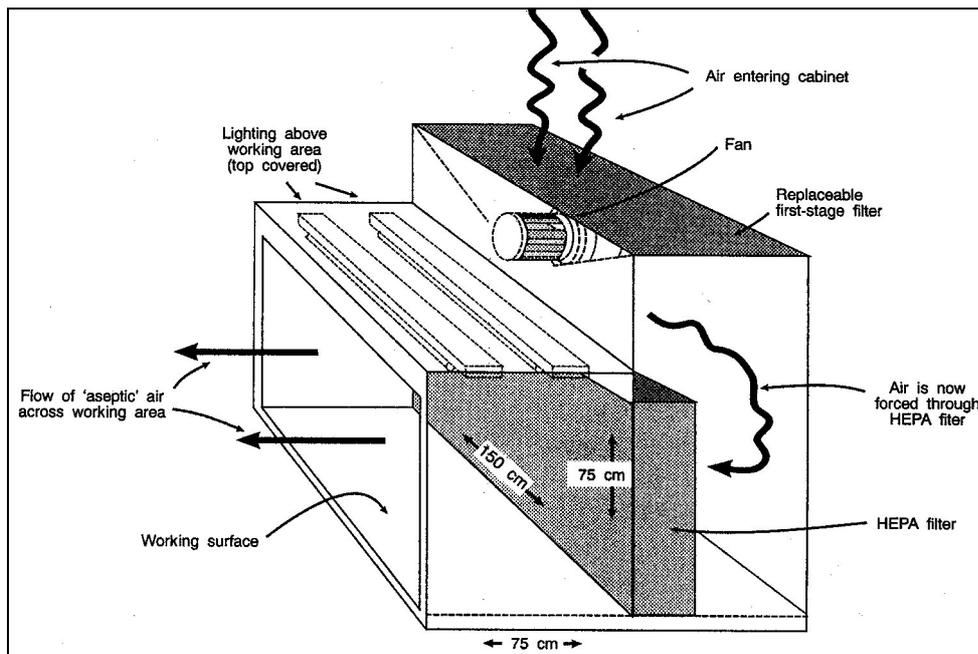
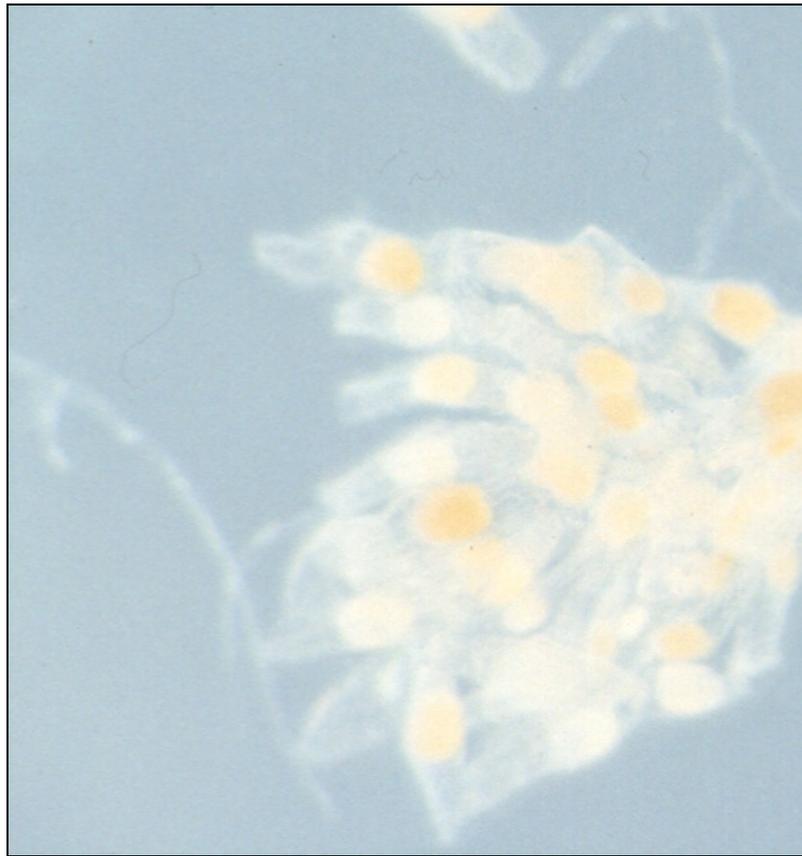


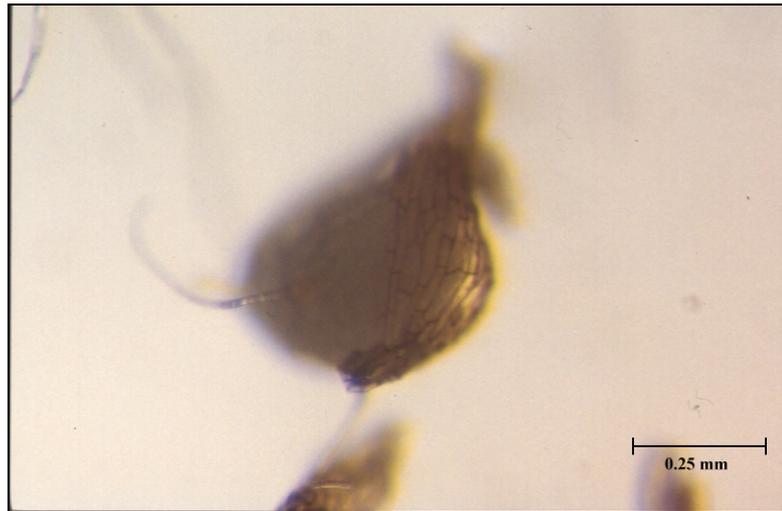
Fig. 20 Schéma d'une hotte pour le travail en atmosphère "aseptisée".



**Fig. 21 Mauvais étalement des graines au semis**  
(*Dactylorhiza fuchsii*, milieu Kew-A).



**Fig. 22 Etatement optimal au semis**  
(*Dactylorhiza fuchsii*, milieu Kew-A).



**Fig. 23** Début de germination, rupture du testa (*Cypripedium parviflorum*).



**Fig. 24** Différents stades de développement de protocormes (*Cypripedium parviflorum*).



**Fig. 25** Type de récipient initial de repiquage.



**Fig. 26** Nouveau type de récipient pour le repiquage (essais en cours).

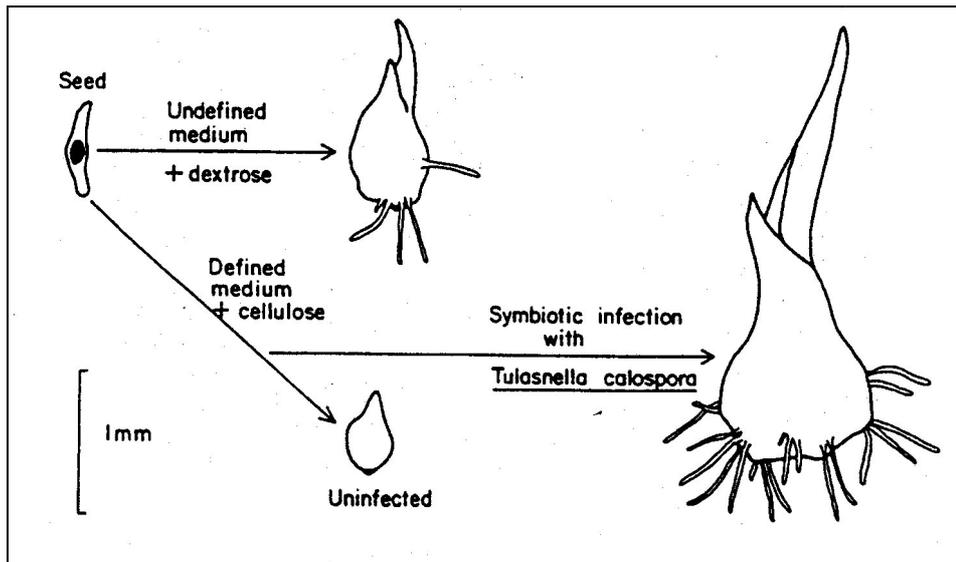
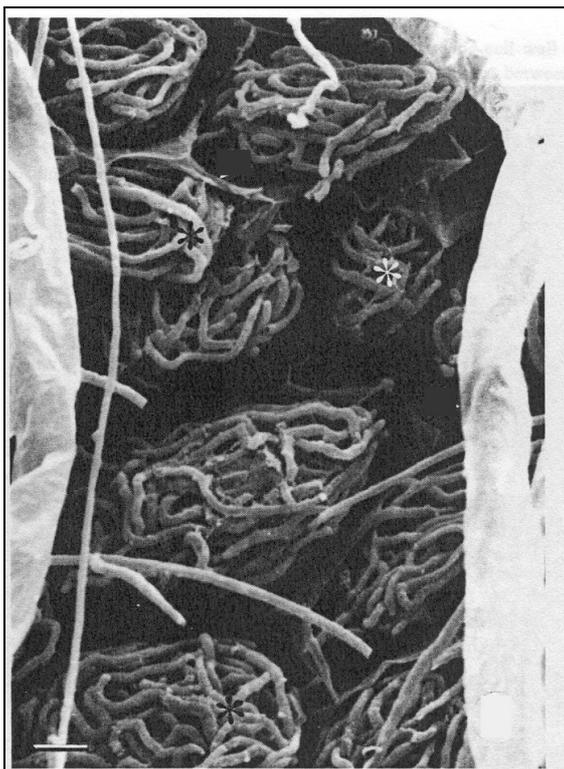
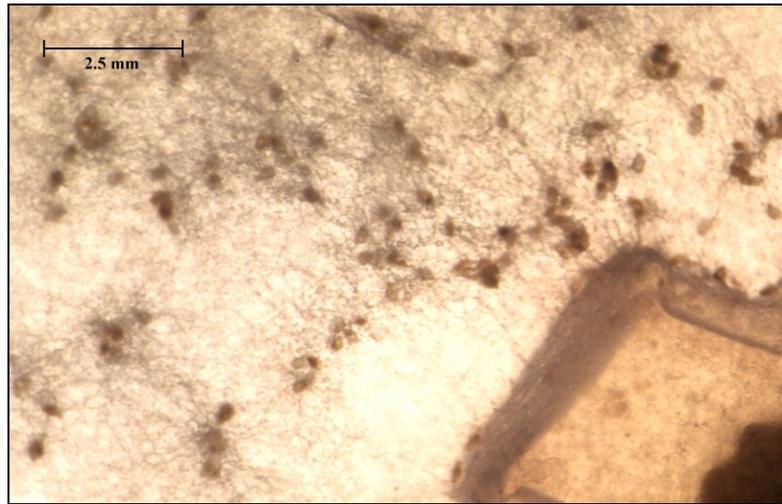


Fig. 27 Différence de résultat en fonction du mode de culture (asymbiotique/symbiotique).

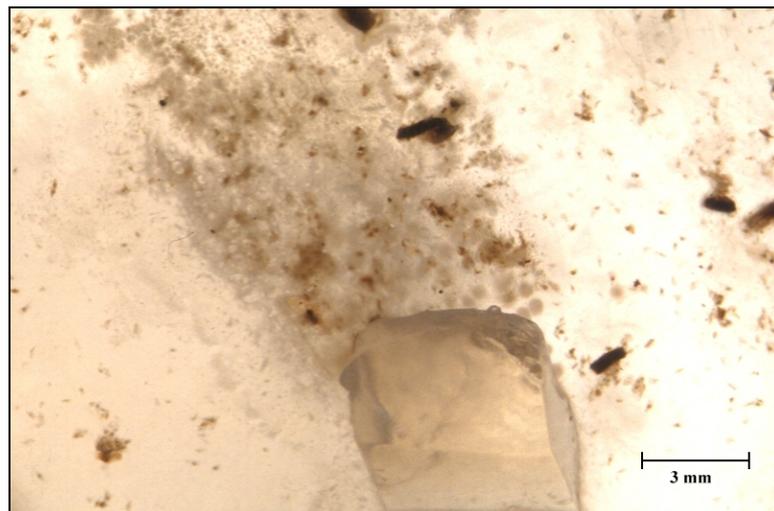


Chaque étoile représente une pelote différente. (Aucune échelle n'était donnée).

Fig. 28 Pelotes de mycorrhize au sein des cellules.



**Fig. 29** Semis mycorhizé (*Orchis purpurea*) avec le cube de mycorhization, en bas à droite.



**Fig. 30** Mycorhization sale de semis à partir d'une capsule (graines immature, *Aceras anthropophorum*).

## 2.2. Les conditions de culture.

### 2.2.1. Introduction.

Maintenant que les connaissances de base et les étapes de la culture des graines d'orchidées terrestres ont été décrites, il faut se pencher sur les données plus techniques concernant les méthodes appliquées en laboratoire. Il a en effet été évoqué que le semis pouvait se faire selon deux manières: asymbiotiquement ou symbiotiquement. Chacune d'elles implique quelques modifications quant à la composition des milieux de culture choisis et aux manipulations de maintenance et de contrôle. Après avoir brièvement exposé la méthode générale de préparation de milieux, les données spécifiques aux deux méthodes seront décrites dans ce chapitre. Aucun renseignement concernant les conditions de températures et de luminosité n'a encore été apporté, cela vient du fait que chaque expérimentateur applique et interprète à sa manière ce qu'il trouve dans la littérature et ce qu'il a expérimenté. Il en découle une multitude de combinaisons et de variantes possibles qu'il valait mieux décrire de façon synthétique dans un chapitre à part. C'est ce qui sera décrit en dernière partie.

### 2.2.2. Méthode générale de préparation de milieux.

Pour les orchidées terrestres, les milieux de culture utilisés généralement sont solides ou semi-solides (Arditti, 1982; George, 1996). Comme pour d'autres milieux confectionnés en laboratoire, ils se composent de macro éléments, de micro éléments et parfois de vitamines et/ou régulateurs de croissance. A leur préparation, ces derniers sont liquides et c'est grâce à l'ajout d'agar qu'ils se solidifient (Arditti, 1982). Les deux premières catégories d'éléments sont apportées sous forme de prélèvements à partir de solutions-mères dont les concentrations sont beaucoup plus élevées que dans le milieu final. Les vitamines et régulateurs de croissance sont achetés prêts à l'emploi ou doivent aussi être préparés en solution-mère, mais en très faible quantité à cause de leur rapide dégradation. Toutes ces solutions-stocks sont gardées au frigo à 6°C et à l'obscurité afin qu'elles restent le plus longtemps possible dans un état stable (il faut éviter les précipitations de sels, les destructions par la lumière de certains éléments et le développement de microorganismes) (fig. 31, p 53). Lorsque le milieu est ajusté au bon volume (pour des concentrations voulues), avant que l'on ajoute l'agar et le sucre, on mesure le pH, qui doit en général être compris entre 5 et 6, et on l'ajuste si cela est nécessaire. Puis, les conditions de stérilité du milieu doivent être remplies: on autoclave la solution à 121°C, à une pression de 1 atmosphère et pendant 15 à 20 minutes pour 1 l de milieu (Arditti, 1982). Une fois cette étape accomplie, on peut, sous la hotte à flux laminaire, couler la solution encore chaude dans les récipients stériles où les semis seront effectués. En effet, lorsque le milieu refroidit, l'agar ayant bouilli, il se solidifie, obligeant alors à le réchauffer pour le ramener à l'état liquide. L'idéal, quand on prépare des milieux, est de ne pas les garder trop longtemps (1 semaine) sans les utiliser (Arditti, 1982) car des modifications de composition ou le développement de microorganismes peuvent avoir lieu si on les fait trop attendre (fig. 32, p 54).

### 2.2.3. Méthode asymbiotique.

Comme il a été décrit dans l'introduction générale des orchidées, l'apport d'une mycorhize pour la germination des graines d'orchidées semble indispensable. Pourtant, aujourd'hui il est possible de mener *in vitro* des graines au stade de plante finie sans l'utilisation du champignon, ceci grâce au travail de recherches de Knudson (1922). Ce dernier a su montrer qu'en apportant les bons éléments nutritifs et dans des concentrations adéquates, il était possible de remplacer le rôle joué par la mycorhize. Cette découverte a eu pour effet que beaucoup de recherches et de travaux sur la mycorhization ont été délaissés, pour un moment, en faveur de la germination asymbiotique des orchidées terrestres (Hadley *in* Arditti, 1982). Pour un

producteur, il est tellement plus facile d'obtenir des plantes sans avoir à prendre en compte les aléas de la culture et l'entretien d'une mycorhize!

Actuellement, les recherches dans le domaine de la symbiose ont tout de même repris de l'importance car il est apparu que les plantes asymbiotiques sont moins robustes que lorsqu'elles ont été élevées avec le champignon (Mitchell, 1989) et qu'elles mettent beaucoup plus de temps à croître (Downie, 1940; Clements, Ellyard, 1979; Hadley, 1982, 1983). De plus, le souci de préservation et de maintien d'espèces en voie de disparition a également contribué à ce regain d'intérêt. Mais pour le monde de la production horticole, la culture asymbiotique reste une méthode très séduisante. C'est pourquoi les essais et recherches dans ce domaine continuent mais dans une optique un peu différente: trouver ce qui pourrait améliorer la germination et la vitesse de croissance des plantules. De ce fait, beaucoup d'expériences basées sur les diverses concentrations ou sur l'ajout de divers composants aux milieux ont été entreprises. Pour résumer les facteurs observés, on peut dire que la concentration des macro- et des micro-éléments, le pH, l'ajout et le type de sucres, de composants organiques, des sources d'azote, de régulateurs de croissance ainsi que de charbon actif ont été testés.

En ce qui concerne la concentration des macro- et des micro-éléments, Fast (1978) en recommande une qui soit la plus faible possible. Van Waes et Debergh (1986) ont, eux aussi, constaté que les orchidées terrestres européennes (*Aceras* R. Br. sp, *Anacamptis* Rich. sp, *Cephalanthera* Rich. sp, *Cypripedium* L., *Dactylorhiza* Nevski sp, *Epipactis* Zinn sp, *Gymnadenia* R. Br. sp, *Limodorum* Boehmer sp, *Listera* R. Br. sp, *Ophrys* L. sp, *Orchis* L. sp, *Platanthera* Rich. sp, *Spiranthes* Rich. sp) germent le mieux dans le milieu de base (défini par ces auteurs) sans macro-éléments. Malheureusement, les protocormes stoppent leur évolution, une fois que cette étape est terminée. Harvais et Hadley (1967) en sont arrivés à la même conclusion pour la germination et le développement d'*Orchis purpurella* (T. & T. A. Stephenson) Soó: que le milieu soit composé d'eau désionisée ou des ingrédients du milieu de Pfeffer, la croissance des protocormes et leur développement en plantule n'a pas lieu. De même, Downie (1941) constate que *Orchis maculata* L. ssp *elodes* Godfrey et *Orchis purpurella* (T. & T. A. Stephenson) Soó sont gênés pour germer lorsqu'ils sont semés sur le milieu de Pfeffer. Par contre, Harvais (1973) démontre que, pour *Cypripedium reginae* Walt. l'absence ou la présence de macro- accompagnés de micro-éléments uniquement ne permet pas la germination de cette orchidée.

Concernant les micro-éléments, lors de l'utilisation de son milieu B, Knudson (1946) s'est rendu compte que les proportions entre les éléments mineurs de ce milieu provoquaient la mort des embryons et des plantules ayant commencé leur développement [(pour les genres *Paphiopedilum* Pfitzer sp, *Cypripedium* L. sp (américains), certains hybrides de *Cattleya* Lindl., *Phalaenopsis* Blume sp et *Vanda* Jones ex R. Br. sp, ainsi que la Vanille)]. C'est ce qui l'a amené à modifier son milieu B en créant le C. Dans ce dernier, le fer est apporté sous une autre forme (sulfatée au lieu de phosphatée) et du manganèse (sous forme de sulfate) est ajouté: toutes ces modifications faisant donc bien changer la concentration des micro-éléments.

Le pH est également mis en cause dans les milieux de culture, il s'est, en effet, avéré que la croissance des orchidées non-européennes citées ci-dessus (Knudson, 1922) était optimale à un pH de 5. Or, lors de la préparation puis de l'autoclavage, le pH change, il faut donc le ramener à la valeur adéquate (Knudson, 1922). Malgré le fait qu'il s'agisse d'orchidées différentes de celles étudiées aux CJB, on peut tout à fait imaginer que les orchidées d'ici aient également leurs préférences quant à l'acidité du milieu. Les expériences de Knudson ont amené Downie (1940) à tester le rôle joué par le pH dans la germination des graines de *Goodyera repens* (L.) R. Br.: lorsque celui-ci est compris entre 3.6 et 7.6, aucune différence de développement n'est mesurable et les graines n'évoluent pas, ce qui indique que le pH à lui seul n'est pas capable d'induire la germination.

Les sucres utilisés dans les milieux sont un sujet d'étude assez important, tant dans leur qualité que dans leur quantité. En effet, Knudson (1922) a constaté, toujours sur des orchidées non-européennes (*Cattleya* Lindl. *sp* et hybrides de *Cattleya* Lindl.), que le glucose est moins efficace que le fructose. Les substrats qu'il a comparés entre eux sont: les milieux de Pfeffer à 0 et 1% de sucrose, le milieu B à 2% de glucose et un autre à 2% de sucrose. Afin de connaître l'effet de la quantité de sucre présent, il a testé, sur des hybrides de *Laelia-Cattleya* hort., des concentrations de glucose comprises entre 0 et 2%. Les protocormes les mieux développés se sont avérés être cultivés sur les milieux à forte teneur en glucose. En appliquant les mêmes principes que Knudson, pour une orchidée européenne [*Goodyera repens* (L.) R. Br.], Downie (1940) a montré le résultat supérieur de l'emploi de lévulose ou de dextrose sur celui du sucrose dans le milieu dont elle fait usage (Pfeffer additionné de 0.5, 1, 1.5 ou 2% de dextrose ou de lévulose ou de sucrose) (Fast, 1978). Pour la germination de l'*Orchis purpurella* (T. & T. A. Stephenson) Soó, Harvais et Hadley (1967) ont également constaté l'effet bénéfique du dextrose (à 0.1% dans le milieu de Pfeffer) comme source de sucre dans les milieux asymbiotiques. Quant à Harvais (1973), il classe les hydrates de carbone dans l'ordre décroissant d'efficacité suivant: sucrose, dextrose et fructose, pour *Cypripedium reginae* Walt..

La composante organique a également été étudiée par Knudson (1922). En ajoutant au milieu complet différentes sortes de «jus» organiques (extrait de betterave, de pomme de terre, de blé, de levure), à diverses concentrations, il a déduit que la germination des hybrides de *Laelia-Cattleya* hort. pouvait se faire sur des milieux contenant des extraits de plantes mais avec une concentration faible en sucres. De même, Downie (1940) a constaté que l'ajout de 2% d'extrait de pomme de terre au milieu de Pfeffer permet d'obtenir de meilleures germination et croissance de *Goodyera repens* (L.) R. Br. par rapport au milieu pur. C'est ce que Harvais (1973) constate également pour ses *Cypripedium reginae* Walt., mais à une concentration 10 fois plus faible.

Par contre, Downie (1940) a observé que l'extrait de levure en faible concentration, malgré son effet bénéfique sur la germination, est toxique pour les embryons; alors que Harvais (1973) trouve que ce dernier élément est néfaste pour *Cypripedium reginae* Walt. dès le semis.

Hadley et Harvais (1968) font également référence à la fraction organique: le lait de coco ou l'extrait de pomme de terre auraient un effet nettement supérieur aux milieux purement minéraux (contenant parfois des régulateurs de croissance) sur le développement des cultures asymbiotiques. De même, Linden (1980) fait usage de lait de coco et d'extrait de levure dans ses expériences et il obtient des résultats tout à fait satisfaisants sur la germination et la croissance de ses semis.

Plus rarement, il est également fait mention (Hadley, 1982) de pulpe de banane, de jus d'ananas et de peptone (Fast, 1978) comme ingrédients appartenant à ce groupe. En fin de compte, l'influence des fractions organiques sur les cultures semblerait être assez acceptée mais il reste très délicat à définir sur quel stade elle a lieu et quel est l'agent réellement responsable de l'effet produit.

La source d'azote apporté aux milieux a été testée par Van Waes et Debergh (1986) sur la série d'orchidées citées ci-dessus. Il en est ressorti que la forme du besoin dépend du genre de l'orchidée: *Epipactis helleborine* (L.) Crantz ne germe que si l'azote inorganique est absent, la forme organique lui étant nécessaire; *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó peut germer en la présence de l'une ou de l'autre forme, mais l'azote organique procure un taux de germination plus élevé en général. Ces auteurs ont, cependant constaté que l'absence d'azote à la germination n'empêche pas cette étape, alors que pour la croissance qui s'en suit, l'azote devient un nutriment indispensable.

Pour la germination des *Epipactis palustris* (L.) Crantz, Rasmussen (1992) n'a utilisé que de l'azote organique en suivant l'exemple de Van Waes (1984), mais dans ses expériences, les graines n'ont rien donné. Selon cet auteur, il se pourrait que des variations génétiques au sein du genre soient la cause de ces résultats contradictoires (Rasmussen, 1992). Pour *Cypripedium reginae* Walt. (Harvais, 1973), la présence d'ions ammonium pourrait être la cause d'une légère stimulation de la germination et de la croissance (avec ou sans sucre dans le milieu), mais le rapport nitrate/ammonium semblerait être beaucoup plus critique à cet égard. En effet, il influencerait sur l'absorption du fer.

Les régulateurs de croissance, quant à eux, ont été testés surtout dans le but de lever la dormance rencontrée chez certaines espèces mais aussi afin d'accélérer la croissance trop lente des protocormes en culture asymbiotique. Dans cette optique, Hadley et Harvais (1968) ont conclu que seule la kinétine (toute seule ou en combinaison avec l'acide indol-acétique) est capable d'avoir un effet intéressant sur la croissance et le développement des protocormes d'*Orchis purpurella* (T. & T. A. Stephenson) Soó. Ceci suggère donc l'importance de l'équilibre auxines/cytokinines dans l'initiation de la racine et de la tige.

Les autres hormones mises en jeu [acide gibbérellique (Hadley, Harvais, 1968; Rasmussen, 1992), acide indol-acétique seul, adénine et les préparations du commerce (Hadley, Harvais, 1968)] n'ont pas montré de résultat espéré. Pour Van Waes et Debergh (1986), les besoins en hormones varient selon les genres d'orchidées. En effet, chez *Cypripedium calceolus* L. et *Epipactis helleborine* (L.) Crantz, une cytokinine est nécessaire pour que la germination s'accomplisse. Par contre, *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó et *Listera ovata* (L.) R. Br. s'en passent sans problème. L'acide gibbérellique, également testé par ces auteurs, s'est révélé, quant à lui, négatif pour la germination de ces quatre plantes. *Cypripedium reginae* Walt. réagit également négativement à l'ajout de quatre aminopurines [kinétine, kinétine-riboside, 6( $\gamma,\gamma$ -diméthyl-allylamino)purine et zéatine], que les cultures soient éclairées ou pas (Harvais, 1973).

L'addition de charbon actif au milieu de culture a été faite pour la première fois, dans les années quarante, dans le but de faciliter la germination de différentes espèces de *Cypripedium* L. *sp* américains. On pensait, en effet que le noircissement des milieux pouvait contribuer à une accélération de la germination ainsi que de la croissance. Mais, avec les expériences réalisées, rien de vraiment significatif n'a pu être déduit. Le rôle du charbon actif pourrait être d'apporter des micro-éléments, d'établir une polarité en noircissant le milieu, d'augmenter légèrement la température du milieu ou d'absorber les substances toxiques produites par les orchidées [en général, ce sont des substances phénoliques qui brunissent en s'oxydant (Vidalie *et al*, 1984)]. Pour Arditti (1982), l'explication la plus plausible serait l'amélioration de l'aération que procurerait cet ingrédient. Fast (1978) pense, quant à elle, que ce serait plutôt d'éviter aux plantules de faner sous l'effet de leurs exsudations racinaires brunes.

L'apport du charbon actif se fait en fin de préparation de milieu, il est sous forme de poudre noire qu'il faut peser à raison de 2 g/l. Deux précautions sont à prendre:

- le charbon se dépose au fond du récipient, il faut donc agiter avant que le milieu ne soit figé afin d'en obtenir une répartition homogène,
- certains additifs de milieux (vitamines et hormones) peuvent, irréversiblement, être adsorbés par cet agent noircissant (Arditti, 1982). Le graphite à 2 g/l semble représenter une bonne alternative si le noircissement doit tout de même être fait [Thurston *et al*, (1979) *in* Arditti, 1982].

En résumé, les milieux de culture asymbiotiques rencontrés dans la littérature sont les suivants (Tab. 3):

Milieu:	Références:
BM.	Van Waes, Debergh, 1986.
Burgeff EG I.	Borriss (1969) <i>in</i> Fast, 1978 et Arditti, 1982.
Chang.	Harbeck (1963) <i>in</i> Fast, 1978 et Arditti, 1982.
CT-I.	Lucke (1976) <i>in</i> Fast, 1978.
Curtis modifié.	Curtis (1936) modifié <i>in</i> Arditti <i>et al</i> , 1985.
FN.	Fast (1978).
Harvais (1982) modifié.	St-Arnaud <i>et al</i> , 1992.
Harvais, 1973: Medium I, II, III, IV.	Harvais, 1973.
Kano, 1965.	Kano, 1968.
Kew-A.	Mitchell, 1989.
Knudson B.	Knudson, 1922. Smith, 1973.
Knudson C.	Knudson, 1946. Fast, 1978.
Mead & Bulard.	Mead & Bulard, 1975. Mead & Bulard (1979) <i>in</i> Arditti, 1982.
Norstog.	Norstog (1973) <i>in</i> Arditti <i>et al</i> , 1985.
Pfeffer.	Harvais, 1972. Arditti, 1982.
Potato Dextrose Agar.	Harvais, 1973. Fast, 1978.
TGZ-N.	Lucke <i>in</i> Mitchell, 1989.
Thomale GD.	Lucke (1971) <i>in</i> Fast, 1978.
Zak.	Borriss (1969) <i>in</i> Fast, 1978.

**Tab. 3: milieux asymbiotiques rencontrés.**

Aux CJB, les milieux asymbiotiques choisis et utilisés les plus fréquemment sont: Kew-A, TGZ et Knudson C modifié. Le premier est souvent pris comme milieu témoin car il s'est avéré être très bon pour la germination asymbiotique des graines. Le second contient du charbon actif et est, de ce fait, noir. On le prépare en versant un flacon tout prêt (acheté dans le commerce) dans un erlenmeyer et en ajustant au volume souhaité (1 litre). Le troisième est recommandé par Mitchell (1989) et comme les expériences du laboratoire des CJB ont débuté avec comme données de base, les référence diffusées par ce texte, Knudson C modifié a été choisi comme troisième variante de milieu.

Les cultures asymbiotiques sont moins contraignantes à gérer que celles qui sont mycorhizées car leur croissance est généralement plus lente (Mitchell, 1989). Cette dernière dépend fortement du genre et de l'espèce d'orchidée, ainsi que du traitement effectué au semis. La conséquence en est que des stades de développement très hétérogènes sont observables pour un semis de même date. Mais comme les protocormes ne sont pas en concurrence avec la mycorhize, leur repiquage est moins urgent et peut se faire à un stade moins précis. Mieux vaut, toutefois, ne pas trop attendre pour effectuer cette opération car elle est alors rendue plus délicate si les protocormes sont trop proches les uns des autres (par leur grossissement) et que leurs rhizoïdes sont entremêlés (fig. 33, p 55). A cause de la lenteur de développement de ces

derniers, la densité du repiquage peut être plus grande (3 à 4 fois plus de protocormes par récipient qu'en symbiotique) (Mitchell, 1989).

Aux CJB, on ne repique pas différemment les deux types de protocormes, on en met 3 à 5 par boîte de Pétri, sans distinction. Par contre, il est vrai que les boîtes asymbiotiques ne sont pas contrôlées aussi fréquemment (car souvent, rien n'est observable) et leur repiquage ne sont pas prioritaires sur les mycorhizés. Le premier contrôle s'effectue environ 1 semaine après le semis car il faut vérifier qu'aucune infection ne se soit déclarée. C'est une rapide vérification qui se fait sans l'aide de la loupe binoculaire. Si une boîte est contaminée, il faut la sortir de la chambre de culture car, même si elle est scellée et donc hermétique, il est trop risqué de laisser une source d'infection dans le laboratoire. Le contrôle suivant a lieu deux semaines plus tard, mais cette fois avec la binoculaire car si les graines ont été semées alors qu'elles étaient encore très fraîches, il est apparu qu'elles pouvaient déjà avoir commencé leur germination (malgré les conditions de culture asymbiotiques). Après ces premiers contrôles, une fréquence de toutes les deux ou trois semaines est appliquée. Il est bon, alors, de vérifier, outre les infections, l'état des bandes de «Parafilm» qui scellent les boîtes de Pétri. Avec le renouvellement constant de l'air et le rayonnement des lampes, il arrive que celles-ci craquent sous la tension et la sécheresse. Ceci constitue, alors, une porte d'entrée et de sortie pour toutes les infections.

Une contamination se reconnaît de deux manières, suivant son origine (Vidalie *et al*, 1984). Si elle est de type fongique (fig. 34 et 35, p 56), un développement mycélien coloré, à texture feutrée est visible à la surface du milieu, son épaisseur et son volume sont très variables en fonction du champignon responsable. Si elle est de type bactérien, on aperçoit un voile d'aspect laiteux et brillant à l'intérieur et à la surface du milieu. Souvent, elle est plus difficilement décelable car elle a la même couleur que ce dernier. Mais il suffit d'incliner la boîte de Pétri de telle manière que la lumière tombe sur la surface du milieu différemment pour que l'on puisse voir briller l'infection.

Les boîtes ne doivent pas être trop secouées car, même si les milieux sont solides, les protocormes peuvent bouger et donc s'abîmer. D'autre part, il reste souvent une fine couche d'eau de condensation qui, en bougeant, déplace les graines; on court alors le risque qu'elles ne soient plus en contact avec le milieu. Si, en plus, une infection se trouve dans la boîte, et que le Parafilm est troué, on disperse cette dernière.

Mise à part la plus grande régularité à apporter lors du contrôle des semis ainsi que le repiquage à un stade très précis à effectuer, toutes les précautions de maintenance décrites ci-dessus s'appliquent également aux semis symbiotiques dont il est question dans le prochain chapitre.

#### 2.2.4. Méthode symbiotique.

Les milieux utilisés dans ce type de culture sont beaucoup plus simples que ceux décrits ci-dessus. Hadley (1982) *in* Arditti, (1982) a, en effet, remarqué qu'il est avantageux de semer les graines qui seront mycorhizées sur des milieux ne contenant pas ou très peu de nutriments (ne pas inclure les 1-2% de sucres habituellement mis, tout au plus, avoir 0.1% de glucose). La raison en est que, sinon, la mycorhize se développe trop vigoureusement par rapport à l'embryon et risque ainsi de le tuer [Hadley (1982) *in* Arditti, 1982; Mitchell, 1989] (fig. 36 et 37, p 57). Leur composition est basée sur de l'avoine et de l'agar, et parfois l'ajout de levure.

La constatation du développement incontrôlé de la mycorhize n'a, cependant, pas empêché les divers expérimentateurs de faire des essais sur d'autres milieux. Ces derniers sont souvent les mêmes que pour la culture asymbiotique, à l'exception du taux de sucres et de

quelques ajouts d'ingrédients «indéterminés» (extrait de pomme de terre, amidon, autres formes de sucres que le glucose...) [Hadley (1982) *in* Arditti, 1982]. On peut les résumer sous forme de tableau (Tab. 4):

Milieu:	Références:
Basic Oats Medium, «BOM».	Mitchell, 1989.
Knudson B.	Smith, 1967.
Knudson C.	Knudson, 1946. Breddy, Black, 1954. Arditti, 1982. Ballard, 1987.
Modified Oats Medium, «MOM».	Clements <i>et al</i> , 1985. Rasmussen, 1992. Zettler, Mcinnis, 1992.
Oat Meal Agar, «OMA».	Dixon, 1987 <i>in</i> Zettler, Mcinnis, 1992.
Oat medium.	Clements, Ellyard, 1979. Arditti, 1982.
Pfeffer.	Harvais (1972) <i>in</i> Arditti, 1982. Downie, 1940, 1941. Harvais, Hadley, 1967. Hadley, Williamson, 1971.
Pfeffer 1% cellulose agar.	Hadley, 1969. Arditti, 1982. Alexander <i>et al</i> , 1984.
Sans nom, a été utilisé pour les genres <i>Cymbidium</i> L. <i>sp</i> , <i>Cattleya</i> Lindl. <i>sp</i> , <i>Dendrobium</i> Sw. <i>sp</i> , <i>Phalaenopsis</i> Blume <i>sp</i> , <i>Vanda</i> Jones ex R. Br. <i>sp</i> .	Westerman, 1959.
War M1.	Warcup, 1973. Warcup (1973) <i>in</i> Clements, Ellyard, 1979. Arditti, 1982.
Zak medium.	Clements, Ellyard, 1979. Arditti, 1982.

**Tab. 4: milieux symbiotiques.**

Aux CJB, le seul milieu utilisé pour les semis symbiotiques est le BOM décrit par Mitchell (1989). Comme il a été expliqué ci-dessus, tous les travaux effectués au laboratoire sont basés sur ce texte. De plus, la simplicité de préparation, le coût faible de ce milieu ainsi que son efficacité en font le support idéal pour commencer des expériences dans un laboratoire qui en est à ses débuts.

#### 2.2.5. Conditions de lumière et de température.

En général, on peut retenir que la germination des graines s'effectue à l'obscurité et à des températures variant entre 20 et 25°C (Fast, 1978), avec une période de froid (à 2-5°C pendant 1 à 3 mois) (Fast, 1978) au préalable pour les genres nécessitant une vernalisation [pour les espèces à feuillage d'été dans le nord de l'Europe, les genres *Cypripedium* L. *sp*,

*Dactylorhiza* Nevski *sp*, certains *Orchis* L. *sp* et la plupart des espèces à tubercule(s)] (Rasmussen, 1995).

Les températures de culture du protocorme et de la plantule peuvent être plus élevées que celles de la germination, mais elles restent dans la fourchette indiquée ci-dessus (fig. 38, p 58). Quant à l'éclairage, il est habituel d'exposer les plantules à la lumière dès le verdissement de leur pousse (Fast, 1978). Chez *Cypripedium reginae* Walt., il faut attendre l'apparition de la racine, soit une douzaine de semaines [Harvais (1973) *in* Fast, 1978].

La température et la lumière revêtent une grande importance dans les cultures symbiotiques car on peut freiner le développement de la mycorhize et favoriser celui du protocorme en jouant sur ces facteurs (fig. 39, p 58).

Dans la littérature, on rencontre beaucoup de conditions de culture différentes pour la germination et la croissance des orchidées terrestres. Afin d'en avoir un aperçu plus explicite, elles ont été rassemblées sous la forme des trois tableaux suivants.

Avant le semis, période de vernalisation (Tab. 5):

Lumière:	Température:	Références:
Aucune.	-10°C pendant 1 à 3 mois.	Linden, 1980 pour différents genres d'orchidées terrestres nord-européennes. Zettler, Mcinnis, 1992 pour <i>Platanthera integrilabia</i> (Correll) Luer.
Aucune.	2 à 4°C pendant 10 à 12 semaines.	Fast, 1978.
Aucune.	4 à 5°C pendant 10 à 12 semaines.	Georges, 1996.
Aucune.	5°C pendant 2 mois.	Ballard, 1987 pour <i>Cypripedium reginae</i> Walt..
Aucune.	5°C pendant 3 mois.	Rasmussen, 1995 pour les genres à feuillage d'été et du nord de l'Europe.
Aucune.	5°C pendant 4 à 12 semaines.	Rasmussen, 1992 pour <i>Epipactis palustris</i> (L.) Crantz, avec une incubation à 20°C au préalable.
Aucune.	6°C pendant 4 à 8 semaines.	Van Waes, Debergh, 1986 pour 23 genres d'orchidées terrestres européennes.

**Tab. 5: conditions avant le semis.**

## Au semis, pour la germination (Tab. 6):

Lumière:	Température:	Références:
Aucune.	25°C.	St-Arnaud <i>et al</i> , 1992 pour <i>Cypripedium acaule</i> Aiton. Harvais, 1973 pour <i>Cypripedium reginae</i> Walt..
Aucune.	20 à 25°C.	Harvais, Hadley, 1967 pour <i>Coeloglossum viride</i> (L.). Hartman et <i>Orchis purpurella</i> (T. & T. A. Stephenson) Soó, l'optimum pour <i>O. purpurella</i> étant de 23°C. Kano, 1968. Hadley, 1982. Georges, 1996.
Aucune.	20 +/- 3°C.	Clements, Ellyard, 1979 pour des genres australiens. Linden, 1980 pour différents genres d'orchidées terrestres nord-européennes. Van Waes, Debergh, 1986 pour 23 genres d'orchidées terrestres européennes.
Aucune.	20 +/- 2°C.	Arditti <i>et al</i> , 1985 pour <i>Cypripedium</i> L. sp, <i>Platanthera hyperborea</i> .
Aucune.	22°C pendant 11 mois.	Zettler, Mcinnis, 1992 pour <i>Platanthera integrilabia</i> (Correll) Luer.
Aucune.	20 à 22°C pendant 6 à 16 semaines.	Mitchell, 1989.
Aucune.	22°C.	Smith, 1973 pour <i>Dactylorchis purpurella</i> et <i>Bletilla hyacinthina</i> R. Br.
Aucune.	20°C pendant 2 à 3 semaines.	Hadley, Williamson, 1971 pour <i>Dactylorhiza purpurella</i> (T. & T. A. Stephenson) Soó.
Aucune.	20°C.	Rasmussen, 1992 pour <i>Epipactis palustris</i> (L.) Crantz.
Aucune.	17 à 22°C pendant 3 à 4 mois.	Ballard, 1987 pour <i>Cypripedium reginae</i> Walt..
Aucune ou photopériode de 16 h de lumière / 24 h avec des lampes «Grolux» de 40 W à 30 cm au-dessus de la surface de l'agar.	20 +/- 2°C.	Arditti <i>et al</i> , 1985 pour <i>Platanthera saccata</i> .
Aucune ou photopériode de 16 h de lumière / 24 h avec de la lumière fluorescente blanche.	23 +/- 1°C.	Mead, Bulard, 1975 pour <i>Orchis laxiflora</i> Lam. et <i>Ophrys sphegodes</i> Miller en culture asymbiotique.

Lumière:	Température:	Références:
Lumière diffuse.	20°C pendant 3 mois.	Warcup, 1971 pour différentes espèces de <i>Dactylorhiza</i> Nevski sp australiennes et <i>Diuris</i> sp, en conditions symbiotiques.
Lumière diffuse.	20 à 25°C.	Georges, 1996.
Photopériode de 14 h de lumière (150 ft-candles) / 24 h.	22°C / 18°C suivant la photopériode.	Warcup, 1973 pour différentes espèces de <i>Thelymitra</i> sp et <i>Diuris</i> sp en conditions symbiotiques.
Photopériode de 16 h de lumière / 24 h, avec des lampes de 40 W (Grolux) à 45 cm au-dessus des cultures.	Température ambiante.	Harrison, 1977 pour <i>Cattleya aurantiaca</i> (Batem. Ex. Lindl.) P. N. Don.
Idem mais à 30 cm au-dessus des cultures ou à l'obscurité.	22 +/- 2°C.	Arditti <i>et al</i> , 1985 pour <i>Cypripedium</i> L. sp., <i>Platanthera saccata</i> , <i>Platanthera hyperborea</i> .
Photopériode de 16 h de lumière / 24 h.	20 +/- 1°C.	Clements <i>et al</i> , 1985 pour 23 espèces d'orchidées terrestres européennes.

**Tab. 6: conditions au semis.**

## Remarques:

- les différentes durées enregistrées pour obtenir la germination des graines dépend très fortement du choix de mycorhizer ou pas. En effet, si la culture est inoculée, la germination s'effectue dans les quelques semaines qui suivent le semis; alors que si les graines sont laissées seules, elle met plusieurs mois à se réaliser.
- des genres d'orchidées non européennes ont été introduits dans les tableaux car relativement peu de données précises sont disponibles sur les conditions de culture d'orchidées terrestres européennes. Pour découvrir les optima de la culture de ces plantes, il faut donc veiller à faire des essais préalables. Ces derniers sont assez spécifiques aux espèces.
- des orchidées épiphytes ont également été citées. Ces données sont à prendre avec beaucoup de précautions car la germination de ces espèces n'est pas gênée par la lumière, ce qui est rarement le cas des orchidées terrestres dont la germination se passe normalement à l'obscurité, dans le sol. Rasmussen (1995) explique que l'obscurité favorise le développement des rhizoïdes, or, les mycorhizes pénètrent principalement par cet organe dans les protocormes. Et comme les protocormes se développant bien sont ceux issus de cultures symbiotiques, ce stade d'hétérotrophie à l'obscurité des orchidées terrestres semblerait être essentiel pour leur bon développement futur (Mead, Bulard, 1975; Rasmussen, 1995). La germination sans apport de lumière paraît donc indispensable.
- les températures pour les cultures symbiotiques sont plus basses que pour les cultures asymbiotiques, la mycorhize pourrait sinon avoir un développement trop important. En général, elles se situent entre les 10 et 20°C [Fast (1982) in Arditti, 1982]. Harvais, Hadley (1967), après avoir testé différentes températures pour la germination et la croissance d'orchidées mycorhizées [*Orchis purpurella* (T. & T. A. Stephenson) Soó], ont, effectivement déduit que 11°C était l'optimum pour la symbiose. Au-delà (17, 23 ou 29°C), soit la relation devenait parasitisme de la part du champignon, soit la stimulation était nulle.

Après la germination, quand les plantules sont apparentes ou après le stade de protocorme (Tab. 7):

Lumière:	Température:	Références:
Aucune.	20 +/- 3°C.	Linden, 1980.
Aucune.	20°C.	Rasmussen, 1992 pour <i>Epipactis palustris</i> (L.) Crantz.
Aucune.	25°C.	St-Arnaud <i>et al</i> , 1992 pour <i>Cypripedium acaule</i> Aiton.
Photopériode de 16 h / 24 h.	20 +/- 3°C.	Clements, Ellyard, 1979 pour des genres terrestres australiens.
2 à 5 lux jusqu'au verdissement de la plantule, puis photopériode de 12 h / 24 h avec 100 à 2000 lux.	20°C, puis 18°C / 12°C pendant la culture en photopériode.	Linden, 1980.
Photopériode de 16 h / 24 h à 5000 lux.	25°C.	St-Arnaud <i>et al</i> , 1992 pour <i>Cypripedium acaule</i> Aiton.
Photopériode de 16 h / 24 h.	20°C / 10°C.	Zettler, Mcinnis, 1992 pour <i>Platanthera integrilabia</i> (Correll) Luer.

**Tab. 7: conditions après la germination.**

Les conditions de culture appliquées aux CJB sont au nombre de quatre:

- une température de 6°C et une obscurité complète pour la chambre froide, cette dernière est utilisée pour les semis subissant une vernalisation;
- une thermopériode de 12 heures à 16°C et l'autre à 12°C avec une obscurité constante, cette chambre de culture (n°1) sert essentiellement à stocker les semis mycorhizés;
- une thermophotopériode de 12 heures à 16°C à la lumière et l'autre à 12°C à l'obscurité, cette chambre (n°2) sert à tester les semis symbiotiques dont la mycorhize pose des problèmes (en général, une vigueur trop forte peut avantageusement être freinée par ce biais). Les repiquages au stade de plantule sont également exposés dans cette chambre, cela leur permet de s'habituer à la lumière (fig. 39, p 58);
- une température constante de 20°C à l'obscurité, cette chambre (n°3) sert à entreposer les semis asymbiotiques.



**Fig. 31 Solutions-mères et préparations du commerce conservées au frigo du CJB.**

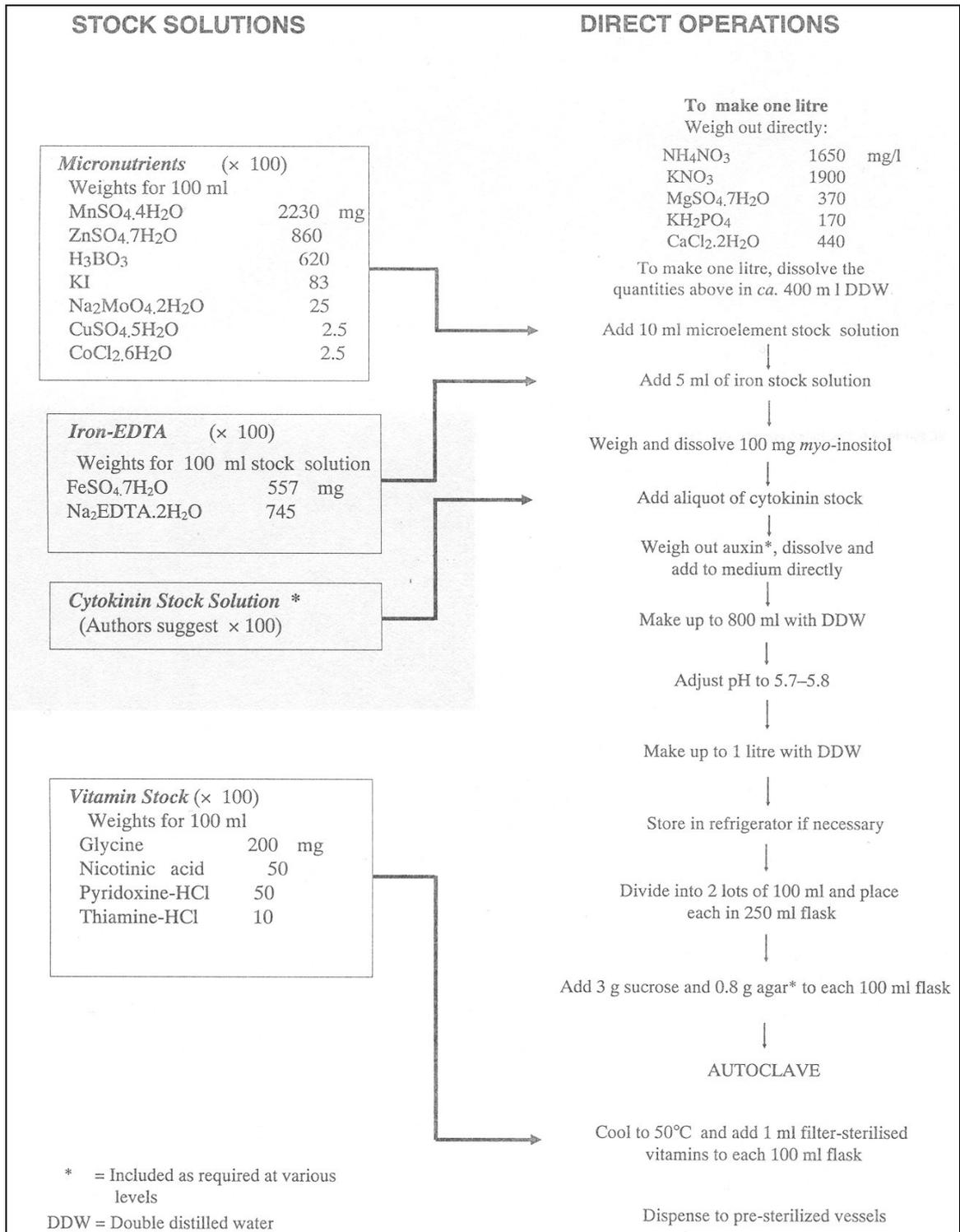
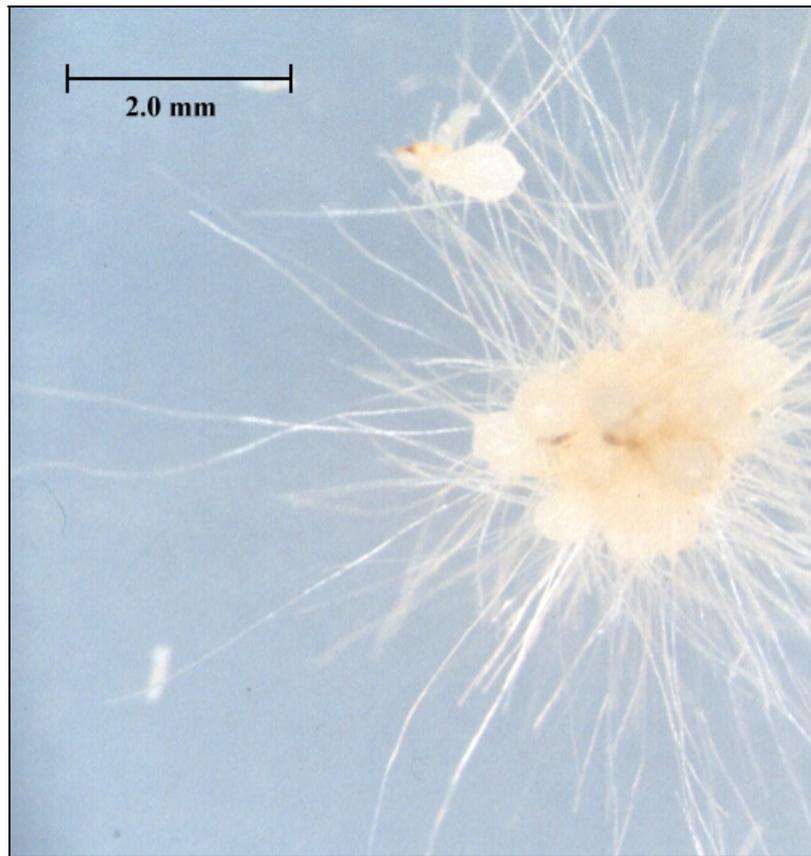
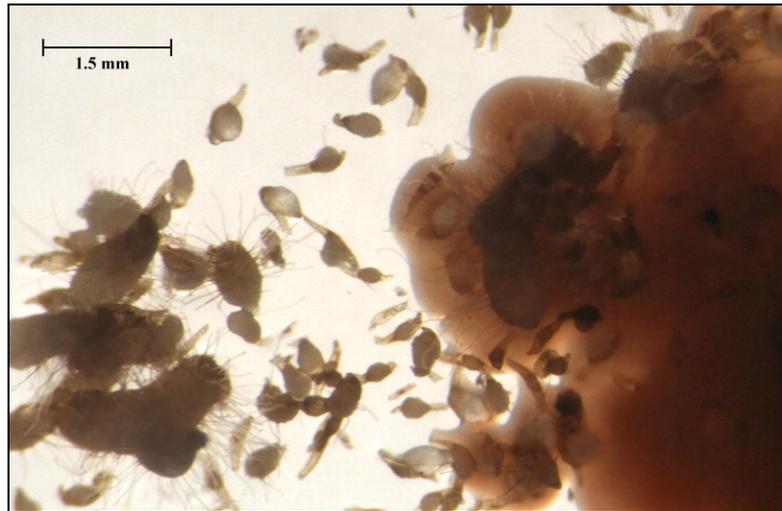


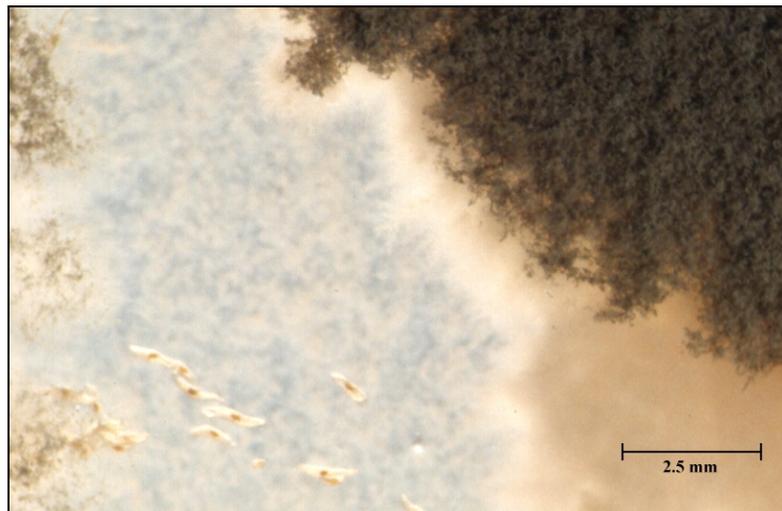
Fig. 32 Méthode générale de préparation de milieux.



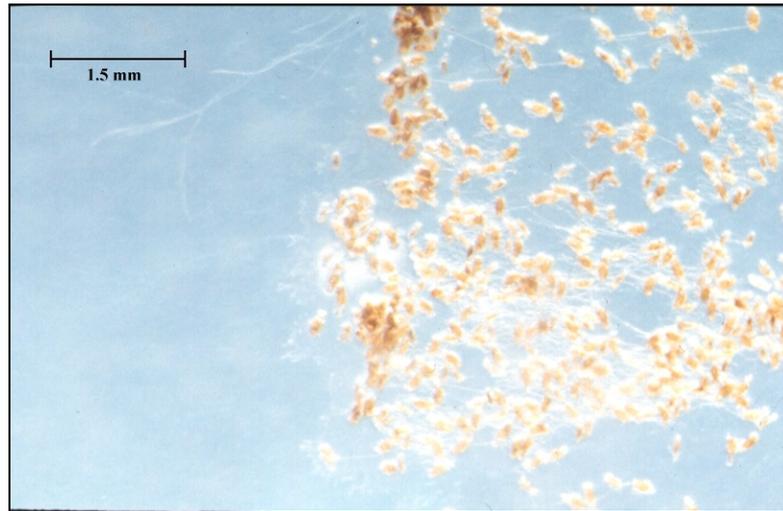
**Fig. 33 Empilement de protocormes rendant difficile le repiquage (*Dactylorhiza maculata*).**



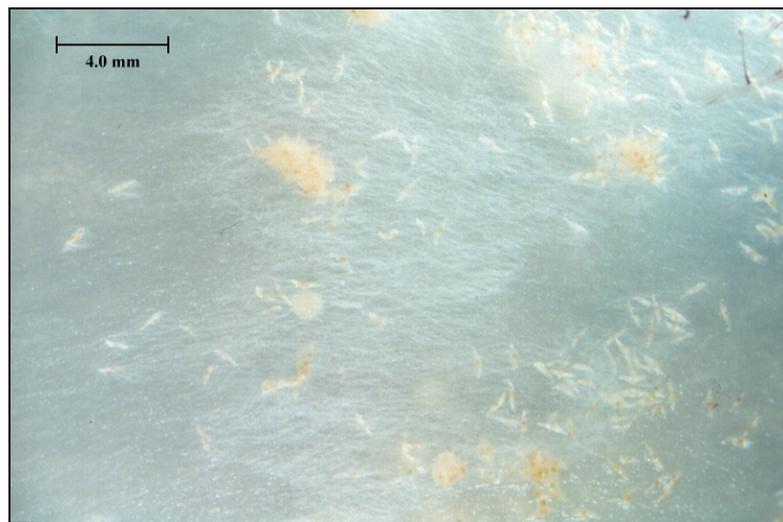
**Fig. 34** Infection bactérienne dans un semis en germination (*Cypripedium parviflorum*).



**Fig. 35** Infection fongique dans un sémis d'*Epipactis palustris*.



**Fig. 36 Mycorrhization un peu trop vigoureuse (à laisser en observation).**



**Fig. 37 Mycorrhization un peu trop vigoureuse (à laisser en observation).**



**Fig. 38** Chambre de culture aux CJB pour les semis mycorhizés.



**Fig. 39** Chambre de culture pour semis mycorhizés avec des souches trop vigoureuses.

### 3. La culture des mycorhizes.

#### 3.1. Introduction.

Pour le «Petit Larousse Illustré» (1998), une mycorhize est l'association d'un champignon inférieur avec les racines d'une plante (chêne, hêtre, orchidacées). Cette définition très générale tient cependant compte d'une dispute existant au sein de la mycologie. Souvent, il est dit que la mycorhization est un état de symbiose (au sens d'une «association étroite de deux ou plusieurs organismes différents, mutuellement bénéfique, voire indispensable à leur survie», Petit Larousse Illustré, 1998) entre la plante et son champignon. Or, comme on a pu le constater dans les chapitres précédents, cette relation est bien plus complexe qu'il n'y paraît et elle oscille entre symbiose et parasitisme. C'est d'ailleurs ce qui constitue la base de la classification des champignons selon Lewis (1973). Mais avant de voir cette dernière, il est intéressant de prendre connaissance avec la taxonomie plus «classique».

L'ensemble des champignons se caractérise, selon Bessey (1965), par des «plantes» non-vasculaires, sans chlorophylle, dont les structures végétative et reproductive ne permettent pas de les classer parmi les autres groupes d'êtres vivants (algues, plantes supérieures, bactéries ou *Mycetozoa*). Les *Mycetozoa* sont assez controversés et l'auteur ne les inclut pas parmi les champignons, mais comme ils ont souvent été décrits comme appartenant à ce monde, ils font souvent partie des classifications sous le nom de Myxomycètes. On les inclura donc dans les descriptions suivantes.

En fonction de la forme de l'appareil végétatif, on distingue les *Myxomycota* et les *Eumycota* [Ainsworth (1973) in Webster, 1980]. Les premiers sont constitués de plasmodes ou de pseudoplasmodes qui sont des masses gélatineuses de plus ou moins grande dimension (mesurant quelques microns à quelques centimètres) (Webster, 1980; Tracol, Montagneux, 1981). Les seconds sont unicellulaires ou filamenteux, ils sont constitués d'hyphes dont le terme collectif est le «mycélium» (Webster, 1980).

Les *Eumycota* sont eux-mêmes subdivisés en *Mastigomycotina*, *Deuteromycotina*, *Zygomycotina*, *Ascomycotina*, *Basidiomycotina* [Ainsworth (1973) in Webster, 1980]. Ensuite, suivant la constitution du mycélium, on distingue les Oomycètes et les Zygomycètes (appartenant respectivement aux *Mastigomycotina* et aux *Zygomycotina*) qui ont des hyphes non-septés, et les Ascomycètes, Basidiomycètes et les Deutéromycètes (faisant partie des *Ascomycotina*, *Basidiomycotina* et des *Deuteromycotina* respectivement) dont les hyphes sont septés (Webster, 1980). Certains champignons ne sont connus que sous leur forme mycélienne, la forme sexuée n'ayant jamais été observée ou n'existant peut-être même pas, on les nomme les champignons imparfaits et ils sont regroupés dans les Deutéromycètes (Webster, 1980) (fig. 40, p 77).

Dans cette taxonomie, on retrouve les mycorhizes d'orchidées terrestres sous les Basidiomycètes (Smith, Read, 1997). Ce sont donc des champignons à mycélium cloisonné, qui forment comme structures macroscopiques des plages de mycélium (massifs d'hyphes plus ou moins parallèles et peu différenciés), des rhizomorphes (agrégations d'hyphes bien différenciés qui ressemblent à des racines) ou des sclérotés (agrégations d'hyphes pseudo-parenchymateuses qui assurent la fonction de survie) (Webster, 1980).

Leur appareil reproducteur sexué est caractérisé par la formation de basides contenant des basidiospores (Webster, 1980; Tracol, Montagneux, 1981). Les basides sont la forme de fructifications «dans laquelle l'extrémité d'un filament végétatif renflée en massue émet un

nombre fixe (quatre, rarement deux) de prolongements (stérigmates) et s'en détache, constituant des basidiospores. La basidiospore, en germant, donne un mycélium cloisonné à cellules contenant un seul noyau à  $n$  chromosomes. A un moment donné, la membrane séparant deux cellules disparaît, de sorte que ces deux cellules n'en constituent plus qu'une seule contenant un synkaryon à  $2n$  chromosomes (cellule-œuf, d'après Maire). A un moment donné, dans une cellule (cellule-mère de la baside), les deux noyaux du synkaryon s'unissent avec réduction chromatique (myxie). Les basides peuvent être cloisonnées ou non» (Gatin, 1924) (fig. 41, p 77).

Comme il a été évoqué auparavant, d'autres classifications existent. Celle de Lewis (1973) est basée sur le comportement écologique et nutritionnel des champignons. Elle comporte cinq groupes qui sont: les saprotrophes obligatoires, les nécrotrophes facultatifs, les nécrotrophes obligatoires, les biotrophes facultatifs et les biotrophes obligatoires.

Les champignons y sont classés suivant un gradient dans le concept de «symbiose» au sens de De Bary (1887). Selon ce dernier, la symbiose serait une relation de vie commune entre l'hôte et le champignon (De Bary, 1887). Il incluerait donc dans ce concept aussi bien les associations mutuellement bénéfiques que les associations parasitiques (Webster, 1980). Lewis (1973) y a ajouté la notion de contact intime et permanent entre les deux individus. Ainsi, les saprotrophes obligatoires ne pourraient absolument pas mener une vie symbiotique car, leur mode de vie étant saprophyte, ils ne tireraient leurs composés carbonés que de matières organiques non vivantes et en décomposition (Lewis, 1973). A l'opposé, les biotrophes obligatoires ne se nourriraient qu'à partir de tissus vivants ce qui les rangerait parmi les «parasites» et ferait de leur relation avec l'hôte une «symbiose» [au sens de De Bary (1887)]. Les nécrotrophes seraient des individus se nourrissant de tissus morts mais qui vivraient tout de même en symbiose [au sens de De Bary (1887)], ce qui les différencierait des saprotrophes (Lewis, 1973). Toutes les variantes dans l'intensité de la symbiose se trouveraient entre les deux extrêmes que sont les saprotrophes et les biotrophes (fig.42, p 78).

Les mycorhizes d'orchidées terrestres sont plus difficiles à ranger dans cette classification. En effet, les rôles sont inversés: l'orchidée est l'individu qui se nourrit de la mycorhize (en tous cas, au stade de protocormes pour les genres chlorophylliens ou tout au long de leur vie pour les genres non-chlorophylliens) et non l'inverse (Lewis, 1973). On ne peut donc pas parler de symbiose mutuellement bénéfique (biotrophie) comme c'est le cas des autres types de mycorhizes (ectotrophes et vésiculaires-arbusculaires qui appartiennent aux deux derniers groupes de la classification nommée ci-dessus). Ce serait plutôt l'orchidée qui représenterait le parasite nécrotrophe et le champignon l'hôte (Lewis, 1973).

Cette constatation amène à se poser la question: «où la mycorhize se procure-t-elle ses matières carbonées, puisqu'elle est chimio-hétérotrophe (qui se procure ses matières carbonées aux dépens d'un autre individu)?». C'est ainsi que l'on a mis en évidence l'épiparasitisme: c'est une association tripartite où l'orchidée se nourrit du champignon qui, lui-même, est en association nécrotrophique ou biotrophique avec un troisième individu (Lewis, 1973; Hadley *in* Arditti, 1982; Dijk, 1988; Rasmussen, 1995; Smith, Read, 1997).

Dijk (1988) et Smith, Read (1997) ont une autre classification qui est basée sur le caractère septé ou non du champignon, le type d'association avec les tissus de son symbionte (endo-, ectendo- ou ectomycorhizique) et sa famille d'associés (Ericales, Monotropaceae, Orchidaceae,...). Ils distinguent les mycorhizes vésiculaires-arbusculaires, les ectomycorhizes, les ectendomycorhizes, les mycorhizes arbutoïdes, monotropoïdes, ericoïdes et d'orchidées. Cette classification prétend être pratique d'utilisation, c'est-à-dire qu'elle se veut être descriptive et mettre en avant les problèmes auxquels il faut apporter une solution. Au sein de cette dernière, les mycorhizes d'orchidées sont caractérisées par des hyphes septés, par

l'appartenance aux Basidiomycètes et par une colonisation qui se fait de manière intracellulaire (Smith, Read, 1997).

Une dernière classification, nettement moins précise que les précédentes, peut encore être décrite. Elle est basée sur l'histologie des tissus infectés. Il a été constaté que les mycorhizes pouvaient se trouver dans les cellules et être digérées de deux manières différentes. Elles s'appellent la ptyophagie et la tolypophagie (fig. 44, p 79).

La première ne concerne pratiquement que les espèces tropicales [Burgeff (1936) in Rasmussen, 1995] et sans chlorophylle [Burgeff (1959) in Hadley, 1982]. L'observation de l'ultrastructure des tissus permet de mettre en évidence que les extrémités d'hyphes individuels se mettent à se déformer pour finalement être complètement lysées. Cela permet la vidange du contenu cellulaire des hyphes dans les organelles des cellules de l'orchidée appelées «ptyosomes» [Burgeff (1936) in Rasmussen, 1995; Burgeff (1959) in Hadley, 1982]. Ce processus prend place à l'intérieur des cellules-hôtes d'une couche spéciale appelée «couche de phagocytose» (Gatin, 1924) [Burgeff (1959) in Hadley, 1982]. Il semblerait avoir lieu en continu et apporterait donc en permanence des composés utiles à la croissance de l'hôte.

La tolypophagie est rencontrée dans la plupart des autres espèces, donc aussi dans les orchidées terrestres de Suisse. L'endophyte forme dans l'hôte {dans une couche de cellules nommées «hôtes» [Burgeff (1959) in Hadley, 1982]} des chignons avec ses hyphes. Ces derniers, appelés pelotes, ne sont lysés qu'après leur complète formation {dans une couche de «cellules de digestion» [Burgeff (1959) in Hadley, 1982]}. Parfois, quelques pelotes fonctionnent comme organe de stockage à l'intérieur de certaines cellules, elles accumulent du glycogène, des protéines et des lipides avant d'être digérées [Burgeff (1959) in Hadley, 1982]. La tolypophagie a lieu par vagues successives de formation de pelotes, de lyses et de réinfections (Rasmussen, 1995).

L'appartenance des mycorhizes d'orchidées terrestres aux Basidiomycètes semble être bien acceptée par la plupart des chercheurs car beaucoup d'auteurs citent le genre *Rhizoctonia* comme forme imparfaite (asexuée) du champignon (Hadley in Arditti, 1982; Dijk, 1988; Rasmussen, 1995; Smith, Read, 1997). Il faut savoir que, lorsqu'on isole des mycorhizes à partir de tissus de plantes pour les cultiver *in vitro*, ce sont des hyphes asexués qui sont produits à partir des fragments prélevés. On n'obtient que difficilement la forme sexuée du champignon. Parfois cependant, certains ont pu induire la croissance de la forme parfaite (donc sexuée) en culture [Warcup, Talbot (1971) in Arditti, 1982], ce qui constitue un élément essentiel dans l'identification précise du champignon, au sein de la taxonomie classique (Rasmussen, 1995). Les genres auxquels appartiennent les mycorhizes d'orchidées terrestres sont: *Thanatephorus* (*Corticium*), *Ceratobasidium*, *Tulasnella*, *Sebacina* (Hadley in Arditti, 1982; Dijk, 1988; Rasmussen, 1995), *Ypsilonidium* (Smith, Read, 1997).

Il semblerait pourtant qu'une partie des endophytes d'orchidées ne soient pas des *Rhizoctonia*, c'est en particulier le cas de ceux isolés à partir de tissus de plantes non-chlorophylliennes [*Galeola septentrionalis*, *Epipogium aphyllum* Sw., *Neottia nidus-avis* (L.) Rich., *Corallorhiza* Gagnebin sp, *Limodorum abortivum* (L.) Sw.] (Rasmussen, 1995). Ces champignons seraient indispensables à ces orchidées hétérotrophes, en tous cas au stade adulte, mais leur importance pour les semis *in vitro* n'est pas encore connue. Des mycorhizes différentes de *Rhizoctonia* ont bien pu être isolées à partir de tissus de plantules récoltées sur le terrain [*Neottia nidus-avis* (L.) Rich., Bernard (1899, 1900) in Rasmussen, 1995; *Corallorhiza odontorhiza*, Rasmussen, Whigham (1993) in Rasmussen, 1995], mais il reste encore à découvrir si la symbiose peut s'établir sur des semis *in vitro*. Les tentatives réalisées jusqu'ici sur *Corallorhiza trifida* Châtel. sembleraient soutenir la thèse que ces champignons sont aussi bénéfiques dans ce type de cultures (Downie, 1943).

Le genre auquel il est souvent fait référence, est celui d'*Armillaria* (forme parfaite) [Terashita (1985) *in* Rasmussen, 1995], il est caractérisé par la formation d'hyphes dans lesquels le passage d'une cellule à une autre est resserré. D'autres champignons présentant la même caractéristique (aussi sur des espèces d'orchidées non-européennes, mais ceci ne constitue pas forcément une barrière pour la germination puisque la spécificité orchidée-mycorhize n'est toujours pas une donnée confirmée) ont également été rencontrés: *Marasmius coniatius*, *Xerotus javanicus*, *Hymenochaete sp*, *Fomes sp*, *Favolaschia sp* (Smith, Read, 1997).

On constate donc, que l'identification des mycorhizes d'orchidées terrestres reste encore un domaine où beaucoup de nouvelles connaissances peuvent être acquises, en particulier grâce aux nouvelles techniques de laboratoire. En effet, la RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) et les méthodes moléculaires d'identification devraient permettre une meilleure détermination des mycorhizes puisqu'on ira la rechercher au niveau génétique. L'échec à faire fructifier les cultures *in vitro* et ainsi à nommer les champignons sera résolu (Rasmussen, 1995; Smith, Read, 1997).

La culture de mycorhizes devient une nécessité, lorsqu'on se lance dans les semis symbiotiques d'orchidées *in vitro*. En effet, initialement, les graines ne contiennent pas le champignon. La croissance des plantes mycorhizées est nettement accélérée et ces dernières sont beaucoup plus vigoureuses. C'est un facteur indispensable pour réintroduire les orchidées dans leur milieu naturel afin qu'elles puissent faire face à la concurrence des autres végétaux. Mais avant d'aborder ce sujet, il faut d'abord expliquer comment se passe la culture des mycorhizes. Cette dernière se compose des étapes suivantes: le prélèvement dans la nature, l'isolation, les tests d'efficacité, la culture et la conservation. Les besoins ainsi que les facteurs influençant la croissance des mycorhizes seront ensuite décrits dans un chapitre à part (3.6.).

### 3.2. Le prélèvement dans la nature.

Cette étape est délicate du point de vue de la conservation et de la protection de l'environnement car elle présente le risque d'abîmer et de faire disparaître des plantes qui sont déjà, rares, sans que l'on ait la certitude que le prélèvement soit «rentable» du point de vue mycorhizique. De plus, elle pourrait pousser des amateurs passionnés mais n'ayant pas toutes les connaissances nécessaires à faire leurs propres prélèvements et donc à contribuer à accélérer la disparition de l'orchidée de sa station.

Mitchell (1989) rappelle que cette opération ne doit être réalisée qu'après avoir obtenu l'autorisation des organismes de contrôle pour les espèces répertoriées et protégées, ou des propriétaires du terrain pour les espèces non-protégées. Ces règles s'appliquent évidemment à la Grande-Bretagne, mais en Suisse, on peut se référer à Reinhard *et al*, (1991) ou directement à l'organe qui s'occupe de la protection de l'environnement. Selon Mitchell (1989), les prélèvements ne provoquent pas nécessairement la mort de la plante pour autant que l'on prenne soin de ne couper qu'un bout de racine et que l'on remette le site dans l'état dans lequel on l'a trouvé. Afin, également, d'optimiser le prélèvement, il faut veiller à couper un bout de tissu où il y a le maximum de chance de rencontrer la mycorhize et au moment où elle est la plus présente [voir les chapitres sur la relation mycorhizique (1.4.) et sur la mycorhization (2.1.7.)].

Contrairement à certains auteurs (Harvais, Hadley, 1967; Warcup, Talbot, 1967, 1971), aux CJB on ne prélève jamais de plante entière mais seulement une racine sur toute sa longueur. L'avantage d'avoir la racine en entier est que l'on est sûr de trouver la mycorhize, en effet, on ne sait pas précisément quelle partie est infectée (Mollison, 1943; Mitchell, 1989). Souvent, seules quelques portions de l'organe sont envahies. Du fait du petit nombre de racines, il est sage de n'en enlever qu'une par plante. On procède comme suit: on gratte doucement au pied de

la rosette jusqu'à arriver au niveau des racines, on en découvre une sur toute sa longueur (du pseudo-bulbe/tubercule/rhizome jusqu'au méristème) et on la coupe. Les tissus racinaires sont bien blancs et très cassants, c'est pourquoi on doit défaire la terre avec beaucoup de précautions. On choisit donc un moment où la terre n'est pas trop dure, quelques temps après une pluie, par exemple. La racine est coupée au scalpel et elle est déposée, pour la durée du transport, dans un tube à essai sur un coton humidifié. Elle ne doit surtout pas dessécher puisqu'on risquerait alors de tuer la mycorhize.

Une fois le prélèvement réalisé et ramené au laboratoire, on isolera le champignon le plus rapidement possible. S'il devait attendre, on peut conserver le tube, au frigo à 6°C, pendant quelques jours. Warcup (1981) n'est pas en accord avec cette marche suivie. Il prétend que la conservation, pour le transport, dans un environnement humide serait défavorable aux tissus car le développement de bactéries, levures et autres microorganismes gênerait l'isolation ultérieure. Il conseille même, de plutôt garder les tissus au sec sauf s'il s'agit de racines très fines. Quant à l'isolation, il affirme qu'elle peut bien avoir lieu 7 à 10 jours après la date du prélèvement.

D'autres méthodes de prélèvement existent, Weiss (communications personnelles, novembre 2000) applique la technique du piégeage comme il l'a apprise avec M. Gorkhill au laboratoire de Kew. Celle-ci consiste à enfoncer, à plusieurs endroits au pied de rosettes, des cadres (par exemple les cadres utilisés comme support de diapositives) dans lesquels sont fixés des petits sachets (en tissu pour sérigraphie, plastique tissé à mailles très fines) contenant des graines ou des protocormes asymbiotiques. Lorsque la mycorhize vient pour infecter l'orchidée en place à cet endroit, elle contamine également les pièges. Il suffit alors de ressortir ces derniers et d'isoler la mycorhize à partir des graines ou protocormes contenus dans les sachets.

Evidemment, la réussite dépend de beaucoup de facteurs. La plante au pied de laquelle on enfonce les cadres en est un important. Weiss la choisit de telle façon qu'elle ait un maximum de chances d'attirer la mycorhize: elle est donc petite, au stade de plantule la plus jeune possible, voire en train de germer et en pleine période de végétation. On peut également planter les cadres autour d'une plante ayant fleuri la saison précédente et sur laquelle on voit encore la capsule. La chance que des graines soient tombées au pied de celle-ci est relativement grande et il y en a sûrement qui sont en train de germer. Un autre appât très intéressant est celui représenté par des pseudo-bulbes/tubercules/rhizomes rongés par des animaux. En effet, l'orchidée n'ayant plus de réserves, elle serait obligée de se replier sur l'aide de la mycorhize pour subvenir à ses besoins. Il se pourrait alors qu'elle émette un «signal» qui attirerait le champignon afin qu'il réinfecte ses tissus (observation et hypothèse faites par Weiss).

La période à laquelle sont enfoncés les pièges joue également un rôle important. On l'a vu, il faut que ce soit pendant un pic de croissance végétative. La profondeur et l'emplacement des pièges font aussi partie de ces facteurs. En effet, on veillera à les planter à différentes profondeurs de manière à exploiter toute la couche de terre susceptible de contenir la mycorhize: il s'agit d'une tranche partant du niveau de la surface du sol jusqu'à la profondeur où se trouve l'organe souterrain de réserve de la plante.

On enfouira les pièges assez proche des racines de l'orchidée, voire près de racines appartenant à d'autres genres de plantes. En effet, Weiss a constaté que la mycorhize se trouvait souvent associée à d'autres plantes (en particulier, des graminées), ce qui n'est pas en contradiction, dans le cadre de l'épiparasitisme, avec les observations d'autres chercheurs.

Enfin, le nombre de pièges enfoncés revêt aussi son importance. Weiss conseille d'en mettre trois à quatre par pied. Il faut, en effet, tenir compte du fait que l'on doit effectuer des contrôles (un par mois, environ) et donc ressortir des pièges. Ceux-là ne sont alors plus

utilisables puisqu'on sort les graines ou protocormes des sachets pour les décortiquer dans l'étape suivante qu'est l'isolation.

### 3.3. L'isolation.

Ce travail consiste à amener le champignon qui se trouve dans son milieu naturel, donc entouré de toute une microflore, vers les conditions de culture *in vitro* où il est seul. Le but est de pouvoir identifier la mycorhize et de la réutiliser dans des semis que l'on souhaite symbiotiques. Toute la difficulté de cette étape réside dans l'élimination des autres microorganismes sans perdre le champignon. En résumé, il existe deux manières de procéder: soit on met en culture sur des milieux gélosés des tronçons de racines désinfectées en surface, soit on extrait les pelotes des tissus sous la loupe binoculaire et on les met en culture. La première technique est la moins précise car il faut réaliser beaucoup de subcultures pour pouvoir isoler un champignon, sans que l'on soit sûr que ce dernier est bien la mycorhize (Smith, Read, 1997). La seconde, en revanche, permet de mettre directement des hyphes de la mycorhize effectivement observés (sous forme de pelotes) dans le fragment de plante. C'est cette dernière voie qui est décrite ci-dessous et qui est suivie aux CJB.

Comme le matériel à partir duquel on travaille provient du sol et que l'on suppose que la mycorhize se trouve bien à l'intérieur des tissus, la première opération consiste à nettoyer l'extérieur de l'échantillon à l'eau. On élimine le plus possible toutes les particules de terre et les éventuelles spores ou sclérotés (organes de conservation de certains champignons du sol) qui pourraient se trouver collées sur la racine (Davet, Rouxel, 1997). Ce travail peut se faire sous l'eau courante mais il est mieux d'utiliser déjà de l'eau distillée.

Quand la racine semble assez propre, on la coupe en petits tronçons avec des outils stérilisés (trempage dans l'alcool suivi d'un flambage), dans une boîte de Pétri contenant un peu d'eau distillée. On veut ainsi prévenir le dessèchement des tissus qui pourrait nuire à la mycorhize (dû à la sécheresse de l'air ou à la chaleur produite par la lampe de certaines loupes binoculaires). Afin d'éliminer encore un maximum de microorganismes non désirés, on essaie, à l'aide d'une pince et d'un scalpel stériles, d'enlever l'écorce de la racine. Ce travail demande beaucoup de minutie car il faut enlever un minimum de tissu dans l'épaisseur de la racine, au risque de voir la mycorhize partir avec les déchets. Cette dernière se trouve, en général, plutôt dans le cortex de la racine que dans la moelle (Rasmussen, 1995).

Ensuite, la racine ainsi «épluchée» est transférée vers une autre boîte avec de l'eau propre. On y procède à des coupes fines dans le sens de la longueur du tronçon, de manière à pouvoir observer par transparence le contenu des cellules et y repérer des pelotes. Celles-ci sont reconnaissables par leur coloration jaunâtre lorsqu'elles sont en phase de digestion (Mitchell, 1989; Rasmussen, 1995). Ces coupes fines sont ensuite transférées dans une autre boîte avec de l'eau distillée propre et contrôlées avec précaution sous la binoculaire pour sélectionner celles qui contiennent la mycorhize.

Avec des instruments toujours stérilisés entre chaque nouveau bain, on les dépose dans une nouvelle boîte avec de l'eau propre où l'on va procéder au broyage/dilacération des tissus afin d'en libérer les pelotes. A l'aide d'une pipette en verre dont on aura fait fondre le bout pour le casser et ainsi obtenir un embout plus fin, on prélève (par capillarité) le maximum de pelotes que l'on transvase dans une boîte propre. Il ne reste alors plus qu'à couler un peu de milieu (FIM) liquéfié à 30°C sur les prélèvements et à homogénéiser le tout pour bien répartir les pelotes. Le milieu doit être assez chaud pour ne pas former d'«écailles» (provoquées par un début de solidification) empêchant la bonne observation des hyphes, mais suffisamment refroidi pour ne pas endommager la mycorhize. Cette étape se réalise sous la hotte à flux laminaire pour

maintenir le milieu le plus propre possible. Lorsque le tout a figé, la boîte est scellée et stockée à la température ambiante, à l'abri de la lumière.

Ensuite viennent les contrôles quotidiens de l'évolution des pelotes afin de prélever celles qui poussent et les débarrasser des éventuels autres microorganismes restants. Ce travail se réalise en déposant le carré, dans lequel la pelote en développement se trouve, sur le plastique d'une boîte où seule la moitié contient du milieu ou dans une boîte spécialement conçue pour ce travail (avec trois compartiments). Ainsi, la mycorhize peut continuer sa croissance, mais les bactéries qui ont besoin de l'eau comme support à leur déplacements, ne peuvent pas atteindre le milieu (Rasmussen, 1995). On a, de cette manière, isolé physiquement la mycorhize. Dès que cette dernière a atteint la moitié coulée, on en découpe un petit carré que l'on dépose dans une nouvelle boîte remplie de FIM figé. Toutes ces dernières étapes se réalisent bien évidemment en conditions aseptisées et des contrôles sont effectués tous les jours pour noter la croissance du champignon jusqu'à ce qu'il atteigne le bord de la boîte. Ces observations sont utiles car elles permettent déjà de se faire une idée de la vigueur de la mycorhize (vitesse de croissance, densité des hyphes) et ainsi de savoir dans quelles conditions futures il faudra la placer pour la conserver.

La marche suivie ci-dessus est entièrement inspirée de la méthode de Mitchell (1989) (fig. 45, p 80). Weiss (communications personnelles, novembre 2000) s'y prend aussi de cette manière, à la différence qu'il se sert de protocormes (puisque ce sont ses pièges à mycorhizes) et qu'il ne recherche pas au préalable si les cellules sont infectées par des pelotes. Les nettoyages (environ 5 bains) se font dans l'eau distillée. S'il y a des protocormes de grosse taille (diamètre supérieur à 1 mm), ces derniers subissent un bain de maximum 30 secondes dans de l'eau de Javel. Les petits protocormes (ceux dont l'enveloppe a juste éclaté et qui possèdent juste quelques rhizoïdes) sont directement posés sur des carrés de milieu, sur le plastique d'une boîte dont seulement la moitié a été coulée. Ainsi, la mycorhize, si elle est présente, est directement isolée (par le même principe que celui décrit ci-dessus). Les gros protocormes (ceux ayant dépassé le stade des rhizoïdes et dont on commence à voir la pousse) sont broyés, hachés au scalpel stérile dans une goutte d'eau distillée, puis recouverts de FIM tiède. Il faut, dans ces cas là, encore réaliser les isolations dans des boîtes coulées à moitié jusqu'à ce que la mycorhize soit propre.

Les méthodes décrites jusque là ont été adaptées et tirées de ce qui avait déjà été réalisé par d'autres auteurs. Afin d'en avoir un aperçu, on peut en résumer quelques-unes sous forme du tableau suivant (Tab. 8):

Auteur:	Méthode et remarques:
Curtis, 1939.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• choix de racines saines</li> <li>• rinçage à l'eau du robinet</li> <li>• observation préalable sur quelques coupes pour sélectionner les racines mycorhizées</li> <li>• rinçage de ces racines-là à l'eau distillée, stérile</li> <li>• bain désinfectant pendant 5 minutes dans une solution à 1% de HgCl<sub>2</sub></li> <li>• rinçage dans l'eau distillée stérile</li> <li>• dépôt de 5 coupes de 1 cm (réalisées au scalpel) sur du milieu PDA (Potato Dextrose Agar)</li> <li>• boîtes retournées et placées à 25°C dans un incubateur (réalisation de toutes ces opérations sous la hotte)</li> </ul>

Auteur:	Méthode et remarques:
Breddy, Black, 1954.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• choix de jeunes racines de la nouvelle croissance</li> <li>• rinçage à l'eau du robinet</li> <li>• immersion dans bain de 2% de formaldéhyde ou de 1.5% de peroxyde d'hydrogène pendant 3 minutes</li> <li>• rinçage dans l'eau distillée</li> <li>• coupes fines réalisées au rasoir et à la pince (stérilisés) dans une goutte d'eau distillée</li> <li>• observation sur une lame mince stérile, au microscope</li> <li>• si présence de la mycorhize, dépôt de la coupe ou frottis (à l'aide d'une pince) sur une boîte contenant du milieu</li> </ul>
Downie (1959) <i>in</i> Smith, 1966.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• choix de tissu racine</li> <li>• rinçage à l'eau du robinet</li> <li>• tronçons de 5 mm de long</li> <li>• désinfection de surface avec une solution à 0.1% de HgCl<sub>2</sub> dans 20% d'éthanol</li> <li>• 4 à 5 rinçages dans de l'eau distillée, stérile</li> <li>• dépôt des coupes sur du milieu PDA acidifié (à l'aide d'acide phosphorique) au pH de 4.5-5.0</li> <li>• incubation à 22.5°C</li> <li>• prélèvement de cubes d'agar dès l'apparition d'hyphes et subculture sur le même milieu</li> </ul>
Harvais, Hadley, 1967.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• choix de racines adventives ou racines issues du tubercule</li> <li>• désinfection de surface des bouts de racine dans 0.1% de HgCl<sub>2</sub> pendant 2 minutes</li> <li>• 3 rinçages à l'eau distillée stérile</li> <li>• portions de 2 mm coupées en conditions aseptisées et déposées sur PDA</li> <li>• incubation à 25°C</li> </ul>
Clements, Ellyard, 1979.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• choix de la portion d'hypocotyle se trouvant au-dessus des racines pour <i>Pterostylis</i> R. Br.; racines adventives pour <i>Thelymitra</i> Forst.</li> <li>• rinçages sous l'eau du robinet</li> <li>• observation de tranches minces sous le microscope binoculaire au grossissements de X 12 ou X 25</li> <li>• extraction des pelotes hors des tissus, à l'aide de lames de scalpel</li> <li>• culture des pelotes dans des boîtes de Pétri contenant du milieu FIM selon Warcup <i>in</i> Clements, Ellyard, (1979) (FIM contenant de la streptomycine et du sucre)</li> <li>• incubation à 17-25°C, à l'obscurité</li> <li>• parfois, subcultures nécessaires pour obtenir la propreté de la mycorhize</li> </ul>

Auteur:	Méthode et remarques:
Warcup, Talbot, 1967, 1971. Warcup, 1973, 1981.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• observation des racines sur les plantes entières, afin de détecter le mycélium externe de <i>Rhizoctonia</i></li> <li>• prélèvement de bouts de mycélium externe et mise en culture</li> <li>• si présence du champignon à l'extérieur, suite des opérations avec rinçage à l'eau des racines (dans plusieurs bains)</li> <li>• coupe en tronçons de 3 à 5 mm de long et dépôt dans une goutte d'eau stérile</li> <li>• dilacération des tissus avec deux aiguilles afin de libérer les pelotes</li> <li>• coulage de milieu tiède (contenant de la streptomycine) par-dessus la solution ainsi obtenue (incubation non précisée)</li> </ul>
Clements <i>et al</i> , 1985.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• choix de racines ou protocormes</li> <li>• rinçage des racines à l'eau</li> <li>• réalisation de coupes longitudinales dans les sections prélevées dans la partie médiane de la racine</li> <li>• observation sous le microscope pour trouver les pelotes</li> <li>• prélèvement des tissus contenant des pelotes et dépôt dans une goutte d'eau stérile, désionisée dans une boîte de Pétri</li> <li>• dissection des tissus avec un scalpel et une aiguille</li> <li>• élimination de tous les déchets, puis coulage de FIM par dessus</li> <li>• culture à température ambiante</li> </ul>
Rasmussen <i>et al</i> (1990) <i>in</i> Rasmussen, 1995. Rasmussen, 1992.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• rinçage du matériel sous l'eau du robinet, avec du savon bactéricide</li> <li>• rinçage dans l'eau stérilisée</li> <li>• incision des tissus sous l'eau stérilisée</li> <li>• extraction des pelotes hors des cellules avec l'aide d'un scalpel ou d'aiguilles</li> <li>• transfert des pelotes uniquement (dans une goutte d'eau stérile) avec une micropipette sur un milieu gélosé</li> </ul>

**Tab. 8: méthodes d'isolation des mycorhizes.**

Il reste quelques remarques à ajouter, en ce qui concerne les différentes méthodes décrites ci-dessus.

Premièrement, le matériel végétal utilisé est généralement composé de racines car les plantes adultes abritent la mycorhize préférentiellement dans ces organes [surtout les orchidées terrestres à chlorophylle (Burgess, 1939, Mitchell, 1989, Rasmussen, 1995)]. Il faut prioritairement rechercher les pelotes dans la zone du cortex se situant sous les poils épidermiques, près de l'apex de la racine [Bernard (1909) *in* Rasmussen, 1995]. Ces tissus prennent une coloration jaunâtre quand les pelotes sont digérées, et les vivantes se trouvent assez proches de la surface de l'épiderme (Rasmussen, 1995).

Les organes souterrains de réserve contiennent rarement la mycorhize sauf les rhizomes encore très juvéniles. Chez ces derniers, le cortex externe se prête le plus facilement aux isolations et pour *Liparis lilifolia* A. Rich., c'est la base des feuilles, à l'insertion, qui semblerait aussi être infectée (Rasmussen, 1995). Les tubercules, malgré la présence de foyers d'infection dans les couches superficielles [tubercules globuleux et palmés observés par Fuchs, Ziegenspeck (1925) in Rasmussen, 1995], ne sembleraient pas permettre les isolations. Les cormes, quant à eux, sont généralement exempts de mycorhizes (Rasmussen, 1995).

L'idéal reste cependant d'effectuer cette opération d'isolation à partir de protocormes prélevés sur le terrain, car on est alors certain que la mycorhize extraite est celle qui a permis la germination et/ou la croissance de la graine. Dans les organes de plantes adultes, beaucoup d'autres champignons peuvent être abrités, ce qui implique des étapes intermédiaires d'isolations. De plus, les cellules des protocormes sont beaucoup plus larges et infectées de manière homogène (Rasmussen, 1995).

Deuxièmement, comme il y a une saison à laquelle les pelotes sont activement digérées par l'orchidée, il peut s'avérer difficile d'en trouver des vivantes à cette époque. Certaines espèces d'orchidées n'en présentent parfois même pas. Il arrive aussi que des pelotes extraites ne se développent pas en culture, malgré le fait que les hyphes soient encore fonctionnels (Burgess, 1939). Ceci est particulièrement le cas des *Cypripedium* L. où il semblerait que les hyphes subissent une rapide modification physiologique, dès leur pénétration dans les tissus de la plante, ce qui les empêcherait de croître ultérieurement. Le seul remède à cet obstacle est de mettre en culture un très grand nombre de pelotes afin d'augmenter la probabilité de rencontre d'hyphes encore capables de se développer. L'élimination systématique de pelotes en cours de digestion est également à effectuer [Bernard (1909) in Rasmussen, 1995].

Troisièmement, beaucoup d'expérimentateurs se sont servis de désinfections de surface afin d'éliminer les microorganismes non désirés. Or, la racine est un organe qui absorbe facilement, ce qui pourrait mener à la pénétration du désinfectant dans les tissus superficiels, susceptibles justement de contenir l'endophyte intéressant. On risque alors de le voir dépérir et d'isoler un champignon qui n'aurait absolument pas joué de rôle dans la mycorhization (Warcup, 1981; Rasmussen, 1995).

Quatrièmement, il ne faut pas perdre de vue que toute isolation, en particulier celles réalisées à partir de racines, donne peut-être le développement d'un champignon mais il n'est pas prouvé que ce soit la mycorhize ayant permis la germination, ou ayant joué un rôle dans la vie ultérieure de l'orchidée (Rasmussen, 1995). De plus, la culture sur milieu BOM révèle parfois la présence d'autres champignons non mycorhiziques et/ou de bactéries qui, en FIM restent indécélables. C'est pourquoi les tests en culture symbiotique, qui constituent l'étape suivante, sont essentiels pour pouvoir déclarer l'efficacité de la mycorhize.

### 3.4. Les tests d'efficacité.

Le but de la culture de mycorhizes est de permettre une meilleure germination des graines d'orchidées, aussi bien en quantité qu'en qualité. Lorsqu'on a isolé un champignon, son identification taxonomique étant trop compliquée et coûteuse, il est plus simple de le tester empiriquement afin de connaître s'il appartient aux mycorhizes d'orchidées. Ces tests consistent tout simplement à mycorhizer des semis. Ces derniers sont, dans un premier temps réalisés avec des graines appartenant à l'espèce à partir de laquelle on a isolé le champignon, et dans un deuxième temps, avec des espèces, voire des genres différents. Il est, en effet, aussi très intéressant de découvrir si le champignon est de nature plutôt polyvalente ou s'il est spécifique de l'espèce.

Aux CJB, on sème les graines voulue sur deux types de milieu: le BOM et le Kew-A. Le premier constitue le test en tant que tel, on y ajoute un cube de FIM avec la mycorhize fraîchement isolée; et le second joue le rôle de témoin. On peut ainsi se rendre compte, au cas où la germination reste absente, si cela est dû aux graines ou à l'inefficacité de la mycorhize. Pour obtenir encore plus de renseignements sur le champignon en test, on a l'habitude de se servir d'un deuxième semis en BOM que l'on inocule avec une mycorhize dont l'association est connue comme bénéfique (on l'appelle le «deuxième témoin»). Ainsi, si dans cette boîte les graines restent telles quelles, on peut en déduire que la mycorhize en test n'a pas réussi à faire germer les graines, non pas parce qu'elle est incompatible, mais peut-être pour les mêmes raisons que la mycorhize connue. Ce deuxième témoin permet d'éviter de jeter une mycorhize sans avoir expérimenté de manière plus détaillée son association. En effet, rien ne permet d'affirmer que les deux champignons ont les mêmes besoins, mais si aucun ne provoque la germination, la cause se trouve peut-être ailleurs (erreur dans le réglage des conditions climatiques).

Les semis sont ensuite stockés comme il est expliqué dans le chapitre des «conditions de culture» (2.2.5.) des orchidées (dans la chambre n°1, pour les semis mycorhizés), et contrôlés comme il convient pour chacun des types de culture [voir «méthode asymbiotique» (2.2.3.) et «méthode symbiotique» (2.2.4.)]. La durée d'observation varie beaucoup suivant le genre d'orchidée semée, la maturité des graines et la mycorhize testée. En général, on conserve le plus longtemps possible les boîtes (non-infectées) car il s'est déjà produit que la germination s'accomplisse longtemps (un an) après le semis, dans des boîtes mises en attente.

Les observations sont faites à la loupe binoculaire. On les note le plus précisément possible car, aussi bien pour la mycorhize que pour l'orchidée, peu de connaissances spécifiques sont actuellement disponibles. Ce qui est certain, c'est que suivant le milieu sur lequel se trouve le champignon, il se comporte différemment. Sur du FIM, qui est un milieu approprié pour l'isolation (Fungal Isolating Medium) et la conservation, le développement est lent et peu expansif. Cette caractéristique est due au faible taux (Clements, Ellyard, 1979), voire à l'absence (Mitchell, 1989) de sucres (Mitchell, 1989). Sur le BOM par contre, la mycorhize peut se comporter très violemment et avoir une croissance incontrôlable provoquant sa fructification et la mort des graines. C'est pourquoi il est bon de semer plusieurs boîtes de test et de les exposer à des conditions différentes afin d'en déduire les optimales. Toutes ces données permettent, par la suite, de classer la mycorhize suivant une «échelle de vigueur» propre au laboratoire, d'établir des fiches de cultures complètes concernant un genre, voire une espèce d'orchidée et de contribuer ainsi à l'amélioration des connaissances dans ce domaine.

Mitchell (1989) et Weiss (communications personnelles, novembre 2000) procèdent de la même manière qu'aux CJB, mais d'autres auteurs décrivent des tests dans des conditions différentes. Les facteurs qui varient sont soit le milieu de culture, soit la durée d'incubation, soit les conditions de température et de lumière.

En ce qui concerne les milieux, certains auteurs se sont servis de substrats destinés normalement à la culture asymbiotique ou des milieux différents de ceux basés sur la farine d'avoine, spécialement conçus pour la culture avec une mycorhize. On rencontre, par exemple: le milieu Sb de Burgeff (1936) (Curtis, 1939), celui de Pfeffer additionné de dextrose (Downie, 1940, 1941; Harvais, Hadley, 1967), un milieu contenant de l'extrait de levure et de la cellulose agglomérée décrit par Hadley (1970), le milieu contenant les minéraux Czapek-Dox [voir Davet, Rouxel (1997) pour la composition], additionnés d'extrait de levure (Difco) et 2% de cellulose en poudre (Whatman Column Chromedia CF11) au lieu du sucrose (Warcup, 1971, 1972), les milieux M1 selon Warcup (1973) et de Zak (Clements, Ellyard, 1979), les milieux M1, M2 et «Weak Oatmeal Medium» décrits par Warcup pour des orchidées australiennes

(Warcup, 1981) et les milieux Knudson C modifié selon Arditti (1982), de Vacin et Went (1949), de Mead et Bulard (1975), BM<sub>2</sub> de Van Waes et Debergh (1986) (Rasmussen, 1992).

Deux caractéristiques générales rencontrées dans ces substrats sont le remplacement de sucres solubles par des insolubles afin d'éviter le développement incontrôlé de la mycorhize et l'addition d'extrait de levure pour un apport en vitamines requis par certaines mycorhizes exigeantes. Selon Dijk (1988), l'extrait de levure permettrait de subvenir à des besoins spécifiques (acides aminés, vitamines, azote nitrique) de certaines mycorhizes qui seraient hétérotrophes pour ces derniers.

La durée d'incubation appliquée est une donnée très hétérogène dans la littérature rencontrée car elle s'étend de quelques jours (10 à 20) (Clements, Ellyard, 1979), quelques mois (3 à 6) (Warcup, 1971; Curtis, 1939; Hadley, 1970; Rasmussen, 1992) jusqu'à 11 mois (Zettler, Mcinnis, 1992). Cela est bien sûr lié à beaucoup de facteurs: le genre de graines semées (en particulier, si elles nécessitent une vernalisation), leur prétraitement, l'efficacité de la mycorhize, les conditions de température, de lumière et de nutrition influençant le développement du champignon. En fait, beaucoup d'expérimentateurs n'avaient pas de durée prédéfinie pour leurs essais mais ils ont tout simplement attendu jusqu'à ce que la germination se produise. Par contre, ils ont fait des observations régulières afin d'avoir des données scientifiques qui puissent être intégrées plus tard dans un programme statistique.

Les conditions de température et de lumière sont, contrairement aux facteurs cités précédemment, assez homogènes. En effet, l'incubation se fait toujours autour de 20°C (Hadley, 1970; Warcup, 1971; Clements, Ellyard, 1979; Rasmussen, 1992), 22°C (Smith, 1967; Zettler, Mcinnis, 1992) ou 25°C (Downie, 1940, 1941, Harvais, Hadley, 1967) et à l'obscurité.

### **3.5. La culture et la conservation.**

Une fois la mycorhize testée et validée pour son efficacité sur la germination, il faut pouvoir la conserver à plus long terme afin d'en disposer au moment voulu. On distingue, de ce fait deux types de stockages: le court terme, qui permet d'avoir toujours quelques boîtes à disposition pour les mycorhizations de semis; et le long terme, qui a plutôt comme but de constituer une banque de mycorhizes dans laquelle on conserve les souches dont sont issues les boîtes destinées à la mycorhization. A cause de la différence d'objectif de ces deux types de stockages, les techniques de culture appliquées ne sont pas les mêmes.

Le stockage à court terme se réalise directement avec les boîtes dans lesquelles on a isolé la mycorhize ou avec des boîtes contenant des repiquages des premières. Le milieu utilisé aux CJB et par beaucoup d'auteurs (Clements, Ellyard, 1979; Clements *et al.*, 1986; Mitchell, 1989; Rasmussen, 1992; Weiss, communications personnelles novembre 2000) est le FIM (fig. 46, p 81). En général, un milieu d'isolement pour champignons est composé d'une source de carbone, d'une source d'azote et de divers sels minéraux (Davet, Rouxel, 1997). Ce type de milieu peut être solide ou liquide, et il est parfois additionné d'antibiotiques comme la streptomycine (Davet, Rouxel, 1997) et de peu de sucre (Clements, Ellyard, 1979). Il se caractérise par une composition purement minérale et relativement pauvre (Hadley, 1983) pour maintenir la croissance de la mycorhize à une vitesse modérée, afin que les repiquages ne soient pas trop fréquents.

FIM (Fungal Isolating Medium) (Warcup) pour 1 l de milieu:

NaNO <sub>3</sub>	0.3 g ou Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4 H <sub>2</sub> O	0.5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g	
MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0.1 g	
KCl	0.1 g	
Extrait de levure	0.1 g	
(Sucrose	5.0 g)	
(Sulphate de streptomycine	0.05 mg)	
(Agar	8.0 ou 10.0 g)	

Ce milieu permet la conservation de la mycorhize pendant environ 2 mois, fréquence à laquelle les repiquages pour le maintien du stock de court terme sont réalisés. Les boîtes de champignon sont placées dans une chambre de culture à 20°C, à l'obscurité. La température ambiante peut tout à fait convenir à condition qu'elle ne fluctue pas. Aux CJB, cela n'étant pas le cas, il a fallu les stocker dans un lieu avec un contrôle de température.

Actuellement, le FIM semble être le milieu le plus utilisé pour le maintien des cultures de mycorhizes. Cela est peut-être lié au fait que sa préparation est simple [pas besoin de préparer des «ingrédients organiques indéfinis» (jus d'ananas, extrait de pomme de terre...), ingrédients sous forme de sels faciles à conserver] et qu'il est transparent. Cette dernière caractéristique est en effet très appréciable, car elle permet très rapidement, de voir où la mycorhize se trouve et si elle a poussé. Les infections bactériennes, difficilement repérables en BOM ou tout autre milieu plus opaque, sont avec le FIM tout de suite localisées. Cela évite bien des contaminations ultérieures de semis qui seraient causées par l'inoculation mycorhizique du milieu.

Dans la littérature, on rencontre, cependant, d'autres substrats. Downie (1940, 1941) et Smith (1966, 1967) décrivent leurs expériences sur du milieu PDA (Potato Dextrose Agar). Weiss, quand il travaillait avec M. Clemençon (communications personnelles, novembre 2000), spécifie aussi avoir conservé les mycorhizes sur du PDA ou du «Malt-Agar» [voir dans Davet, Rouxel (1997) pour la composition], mais il a abandonné ces milieux à cause de leur opacité. Quant à Breddy, Black (1954), ils se sont servis de Knudson C avec 0.5% d'amidon de pomme de terre pour l'inoculation de leurs expériences de déterminations. Deux autres milieux rencontrés sont ceux de «Pfeffer-0.1% Dextrose-Agar» ou de «Dox-Yeast Agar Medium» (pour les mycorhizes plus exigeantes en nutriments). Ils ont servis à faire une subculture préalable à des inoculations, à partir de mycorhizes en culture de longue durée (Hadley, 1970).

L'élaboration d'une banque de mycorhizes demande une méthode de travail différente ainsi que l'utilisation de milieux plus adaptés à la conservation de longue durée. Il y a, en effet, beaucoup d'auteurs qui prétendent qu'à long terme, les mycorhizes perdent de leur vigueur, voire dégénèrent (Hadley, 1983; Mitchell, 1989; Rasmussen, 1995).

En ce qui concerne les milieux, Hadley (1970) nomme le PDA et le PCA (Potato Carrot Agar). Mitchell (1989) et Weiss (communications personnelles, novembre 2000) utilisent, quant à eux, toujours le FIM. Le premier auteur stocke ses mycorhizes dans des tubes à essais dont le bouchon se visse (fermeture plus hermétique), et il coule et fait figer le FIM sous une pente de 40-45° (probablement pour créer une surface d'inoculation plus grande que la simple section du tube à essais). Il applique comme conditions, une température de 4°C et l'obscurité.

Weiss garde ses mycorhizes de deux manières: il a toujours une boîte contenant le champignon et des protocormes sur du FIM et une boîte où d'autres sont sur BOM. Son explication à l'utilisation de protocormes est que la mycorhize resterait dans un état qui serait

beaucoup plus actif. Elle ne risquerait ainsi pas de perdre son efficacité ou de disparaître. Même si sur FIM les protocormes se développent très lentement (à cause de la pauvreté du milieu), la mycorhize est bien conservée dans les tissus. De plus, au cas où les cubes du milieu ne permettraient plus d'inoculer un semis (parce que les hyphes seraient morts), il resterait toujours la possibilité de réisoler le champignon à partir des tissus des protocormes. Les récipients qu'il utilise sont élaborés de telle manière qu'il y ait une aération possible (les mycorhizes respirent). Ce sont des bouteilles posées à plat dans lesquelles le milieu est coulé dans cette position et fermées par un bouchon dont le centre est remplacé par un bout de coton stérilisé, afin de permettre les échanges gazeux. Il existe aussi d'autres récipients spécialement conçus pour cet usage, dans le commerce. Les boîtes de Pétri ne sont, selon lui, pas adéquates à cause du manque d'aération (très petit volume disponible, pas de renouvellement de l'air) et du risque d'infections liées au dessèchement et au déchirement du Parafilm. Les bouteilles sont ensuite conservées dans une chambre de culture à l'obscurité, à une température se situant entre 12 et 16°C (il y a un gradient selon la hauteur dans sa chambre).

La conservation de champignons dans un milieu liquide constitue une alternative intéressante et pourrait représenter une solution pour les laboratoires possédant le matériel adapté. La procédure est la suivante: on prélève un cube du milieu inoculé que l'on veut repiquer pour la conservation et on le mixe avec le milieu liquide. Au moment des repiquages pour la conservation à court terme, on prélève un peu de la solution et on coule du milieu (tiède) qui se fige par-dessus. Cette méthode a été utilisée sur du «Mowme» (Moser Wunder Medium) et observée par Weiss lorsqu'il travaillait avec Cleménçon.

Outre cette technique peu conventionnelle, Weiss a évoqué le projet de conserver ses mycorhizes, non pas avec des protocormes, mais avec d'autres plantes (des graminées, en particulier). Comme il a observé que la conservation de la mycorhize était optimale dans les jeunes plantules d'orchidées et que, dans la nature, le champignon était souvent en contact étroit avec des racines d'autres végétaux, il en est venu à se demander s'il ne serait pas plus simple de garder la mycorhize dans la plante qui lui sert de deuxième hôte. Ceci constitue peut-être une très bonne solution, puisque les orchidées n'étant pas partout présentes dans leur milieu, le champignon doit bien être en contact avec un autre type de végétal pour subvenir à ses besoins (Weiss, communications personnelles, novembre 2000). C'est une utilisation très intéressante de ce qui a été décrit comme l'épiparasitisme ci-dessus (chapitre 3.1.).

Aux CJB, on s'est aussi rendu compte de la perte d'efficacité (sur l'aptitude à stimuler la germination) des mycorhizes stockées en FIM pendant de longues durées. Jusqu'à récemment, on les conservait juste en FIM, en procédant à des repiquages à intervalles réguliers. Or, comme des souches ont été perdues, il a été décidé qu'à partir de ce moment, chacune se trouverait sous deux formes dans le laboratoire: une souche en FIM pour tous les semis à mycorhizer et une souche dans du BOM avec des protocormes (fig. 47, p 81). Ainsi, si la boîte de mycorhize en FIM s'infecte ou s'il y a perte de vigueur, on peut toujours prélever un cube dans la boîte en BOM ou même réisoler le champignon à partir des protocormes s'y trouvant. Afin de rafraîchir la culture en BOM une fois par an, on procédera à une réisolation de la mycorhize en utilisant des semis symbiotiques (donc des protocormes différents de ceux de la boîte de conservation) qui ont donné des résultats satisfaisants. Les conditions que l'on applique dans la chambre de culture aux CJB sont les mêmes que pour la conservation de court terme: une obscurité totale et une température alternant entre 12 et 16°C.

### **3.6. Besoins et facteurs influençant la culture des mycorhizes.**

Ce chapitre a pour but de faire une synthèse des facteurs et besoins, dont certains ont pu être rencontrés tout au long de la culture des mycorhizes, et qui sont à même de l'influencer. La

lumière et la température constituent, sans aucun doute, les premiers auxquels on pense. Mais tout aussi importants sont les nutriments, en particulier le type de sucres, la forme sous laquelle les éléments sont apportés et leur concentration. Le CO<sub>2</sub> et les phytoalexines représentent des facteurs auxquels on ne pense pas toujours mais qui peuvent aussi influencer la croissance des champignons.

Lorsque l'on commence une culture de mycorhizes, on se soucie en premier lieu de programmer la chambre de culture dans laquelle on va garder les souches. Les deux variantes que l'on doit alors fixer sont la lumière et la température. Comme on l'a vu précédemment, les mycorhizes d'orchidées terrestres sont généralement conservées à l'obscurité et à une température se situant autour des 20 à 25°C (Davet, Rouxel, 1997). En fait, il suffit de connaître le climat qui règne dans le lieu d'origine des mycorhizes pour essayer de le reproduire le plus fidèlement possible au laboratoire. En effet, les mycorhizes des orchidées terrestres d'Europe sont des champignons généralement saprophytes et vivant dans le sol (Dijk, 1988). Cela indique donc, qu'elles apprécient les lieux plutôt sombres (puisqu'elles se trouvent dans les couches superficielles du sol) bien qu'elles puissent aussi supporter la lumière (puisque certaines orchidées poussent dans des lieux très ensoleillés). Mais, étant donné qu'elles sont enfouies, la quantité de lumière reçue reste tout de même faible, on leur préférera donc une conservation à l'obscurité. La lumière peut jouer le rôle de facteur limitant et permet, dans le cas des mycorhizes trop virulentes, de les maintenir à un rythme de croissance plus modéré.

Les températures à appliquer sont déduites de la même manière, en observant le climat régnant dans leur lieu d'origine. Ce facteur peut, tout comme la lumière, être utilisé comme stimulant ou limitant dans la croissance des champignons. Au laboratoire des CJB, on utilise effectivement ces deux facteurs limitants pour maintenir certaines mycorhizes en culture sans qu'elles ne fructifient (ce qui les rendrait inutilisables pour les mycorhizations).

Suivant l'«échelle des vigneurs» citée plus tôt, on entrepose certains de ces champignons soit à la lumière, soit au frigo. Mais cette manière d'agir ne présente-t-elle pas un danger en ce qui concerne l'authenticité du matériel vivant? En effet, il se pourrait bien que le développement de mycorhizes dans des conditions différentes de celles de leur habitat naturel ne soit pas entravé, mais qu'en est-il de leur évolution au cours du temps? Ne verrait-on pas le champignon s'adapter à ces nouvelles conditions et peut-être ainsi perdre l'aptitude à vivre en symbiose avec l'orchidée? Comme le but est de reproduire aussi fidèlement que possible la germination et la croissance naturelles des orchidées afin de les réintroduire, le maintien des mycorhizes dans leur climat originel semble être une condition indispensable pour les travaux de recherche du laboratoire des CJB.

Les sources de carbone et d'azote sont les deuxièmes types de facteurs que l'on peut prendre en considération et modifier au laboratoire. Selon Davet, Rouxel (1997), la source de carbone est généralement constituée d'un glucide facilement hydrolysable. Dans la littérature, il est habituel de trouver le glucose ou dextrose comme apport carboné, mais on rencontre fréquemment aussi des milieux tels que le PDA, ceux à l'extrait de malt, ou à la farine d'avoine (Davet, Rouxel, 1997), qui sont basés sur l'amidon (Smith, Read, 1997).

Quant à Smith (1966), elle a réalisé des expériences avec de la cellulose et fait référence à la capacité qu'ont beaucoup de champignons à décomposer la pectine (Pérombelon, Hadley, 1965; Smith, Read, 1997). Ces deux derniers sont des sucres insolubles dans l'eau et nécessitent donc l'utilisation d'enzymes pour le devenir. Or, certains champignons, en particulier les saprophytes (et donc aussi les mycorhizes), possèdent l'appareil enzymatique nécessaire, ce que d'autres microorganismes n'ont pas. Le développement des bactéries et autres champignons inintéressants peut donc être ralenti considérablement lorsque la source de matière carbonée est de nature insoluble.

De plus, selon Hadley (1969), l'apport de sucre insoluble (cellulose) permettrait une meilleure maîtrise de la symbiose par l'orchidée; symbiose qui n'emprunterait alors plus le chemin du parasitisme par la mycorhize (fig. 48, p 82). Le type de sucre apporté pourrait donc jouer, à la fois, le rôle de facteur de sélectivité dans le milieu d'isolation de la mycorhize (Davet, Rouxel, 1997), et celui de «régulateur de symbiose». Puis, l'étape de l'isolation passée, la concentration de la matière carbonée peut être utilisée comme facteur limitant: suivant la richesse en sucre, le développement de la mycorhize est plus ou moins stimulé. C'est la raison pour laquelle les substrats pour mycorhizes sont spécifiquement pauvres (Hadley, 1982, 1983, Mitchell, 1989).

La forme d'apport de l'azote, ammoniacale ou nitrique, est, selon Dijk (1988), Davet, Rouxel (1997) et Smith, Read (1997), indifférente pour les champignons à l'exception des *Mucoraceae*. Or les mycorhizes n'appartiennent pas à ce groupe de champignons (Webster, 1980) donc l'apport de l'une ou de l'autre forme ne devrait pas modifier leur comportement. Peu d'expériences semblent avoir été décrites sur l'utilisation des différentes formes d'azote qui existent, peut-être est-ce justement dû à cette indifférence.

Par contre, Davet et Rouxel (1997) font allusion au rapport C/N de la biomasse fongique. Ce dernier serait de l'ordre de 9 à 12 et aurait la caractéristique d'être plus élevé que celui des bactéries. D'après ces auteurs, le fait d'élever ce rapport aurait pour conséquence d'induire la production de sclérotés, ce qui est une méthode pour permettre l'identification de champignons. Sachant que certaines mycorhizes d'orchidées sont trop virulentes en laboratoire et qu'elles fructifient (ce qui est un inconvénient), la modification de ce rapport pourrait constituer une solution pour obtenir une mycorhize plus facile de maintenance.

Malgré l'avantage que représente la modification de facteurs extérieurs pour une meilleure conservation et utilisation des mycorhizes, la remarque faite pour la température et la lumière est ici également valable. Il faut rester extrêmement prudent quand on expérimente avec les facteurs externes car la mycorhize pourrait être poussée à évoluer dans un sens tout à fait inadapté à son milieu d'origine, ce qui la rendrait inintéressante pour la réintroduction des orchidées obtenues symbiotiquement *in vitro*.

Les autres éléments minéraux majeurs (phosphore, potassium, magnésium et soufre) sont apportés sous forme de sels et la modification de leur concentration permet, comme chez les plantes, d'exacerber certaines caractéristiques chez la mycorhize. Ainsi, si un élément est apporté en excès par rapport aux autres, son effet peut être le même que si la mycorhize avait été exposée à une température plus élevée (Weiss, communications personnelles, novembre 2000).

A ce sujet, Weiss a évoqué qu'il serait intéressant de faire des expériences au champ. On y apporterait des engrais à des proportions différentes afin d'observer comment l'orchidée réagirait et, ainsi, déduire la réaction de la mycorhize. Il pense, en effet, qu'il ne faut pas dissocier les deux symbiotes, dans ce genre d'expériences. Chacun d'eux suit un cycle particulier suivant les saisons et, même si la mycorhize n'est pas toujours présente à l'intérieur des tissus de l'orchidée, des produits (antibiotiques ou autres) et/ou des exsudations sont libérés par l'un et/ou par l'autre, dans la solution du sol. Or, on ne sait pas quel effet ces molécules pourraient avoir, mais il serait tout à fait envisageable qu'elles aient une action stimulante ou inhibitrice sur l'un ou l'autre des symbiotes. Ce serait, en quelques sortes, la création d'un «microclimat» dans le sol, par l'interaction existant entre les deux symbiotes (Weiss, communications personnelles, novembre 2000). Il est évident qu'une meilleure connaissance de cette interaction permettrait de mieux maîtriser la culture de la mycorhize en laboratoire, tout en restant proche de l'état naturel.

Les éléments mineurs sont essentiellement représentés par le cuivre, le manganèse, le molybdène, le fer et le zinc. Comme ils font généralement partie des impuretés contenues dans la gélose et les principaux constituants, il n'est pas indispensable d'en ajouter (Davet, Rouxel, 1997), mais leur présence est obligatoire car ils entrent dans la constitution des enzymes. Leur excès aboutirait au même type de réactions que celui observé pour les éléments majeurs. Ainsi, le manganèse apporté en dose excessive aurait un effet limitant sur la croissance de certains champignons (Weiss, communications personnelles, novembre 2000). Peut-être qu'avec ces éléments aussi, en modifiant la balance entre les différents ingrédients, on arriverait à «dompter» une mycorhize et rendre sa maintenance plus aisée (toujours en prenant en considération le risque pour l'environnement exposé ci-dessus), mais actuellement peu d'informations ont été trouvées à ce sujet.

Comme la culture de mycorhizes se passe dans des conditions où le volume est restreint et qu'en plus il est hermétique, la phase gazeuse, et donc le CO<sub>2</sub>, est un facteur dont il faut tenir compte, en culture *in vitro*. En effet, la mycorhize d'orchidée vit dans des environnements généralement aérobies et, de ce fait, elle respire (Rasmussen, 1995). Une saturation de l'atmosphère en gaz carbonique peut donc se révéler néfaste pour son développement. Peu d'informations concernant la concentration de CO<sub>2</sub> maximale que la mycorhize (seule) puisse supporter sont disponibles. Mais comme dans le sol le taux approche les 3 à 4% [Stiles (1960) *in* Rasmussen, 1995], on pourrait imaginer qu'au-delà de cette valeur, le champignon ait une croissance ralentie ou soit induit à produire des organes de conservation (comme réaction de défense). Si l'on veut maintenir le champignon vivant et sous une forme utilisable en laboratoire, il semblerait donc indispensable que des échanges gazeux puissent se faire.

De plus, le CO<sub>2</sub> étant plus lourd que l'oxygène, la mycorhize est doublement désavantagée, puisqu'elle ne se développe pas en hauteur. Un mouvement de l'atmosphère à l'intérieur du récipient semblerait donc nécessaire si l'on compte conserver la mycorhize sans la repiquer sur une longue période. C'est la raison pour laquelle Weiss (communications personnelles, novembre 2000) utilise ses bouteilles spéciales avec un bouchon en coton [comme ceux dont il est fait référence dans Kano (1968)].

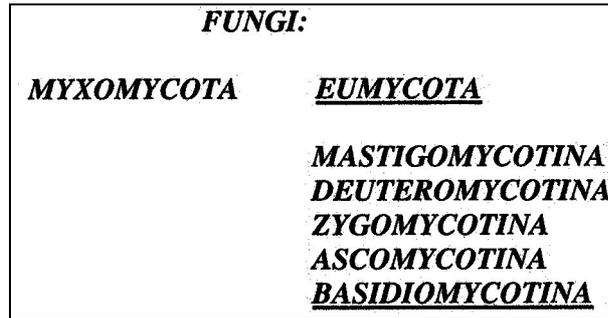
Peut-être est-ce là une des raisons qui ont mené à la perte de certaines souches au laboratoire des CJB. Les champignons y étant conservés dans des boîtes de Pétri, le volume disponible pour la phase gazeuse y est très faible et comme on scelle ces dernières avec du Parafilm pour des raisons d'aseptie, les mycorhizes ont peut-être périclité par simple étouffement.

Comme pour tous les autres facteurs cités ci-dessus, on peut voir ici aussi l'intérêt que pourrait jouer le gaz carbonique comme facteur limitant dans la maintenance de mycorhizes trop vigoureuses. Mais pratiquement, cela semble plus difficile car il faudrait posséder un dispositif qui permette l'augmentation et la mesure du taux de CO<sub>2</sub>, de telle manière que la mycorhize ne meure pas mais soit ralentie dans son développement; tout ceci étant adapté aux conditions *in vitro*.

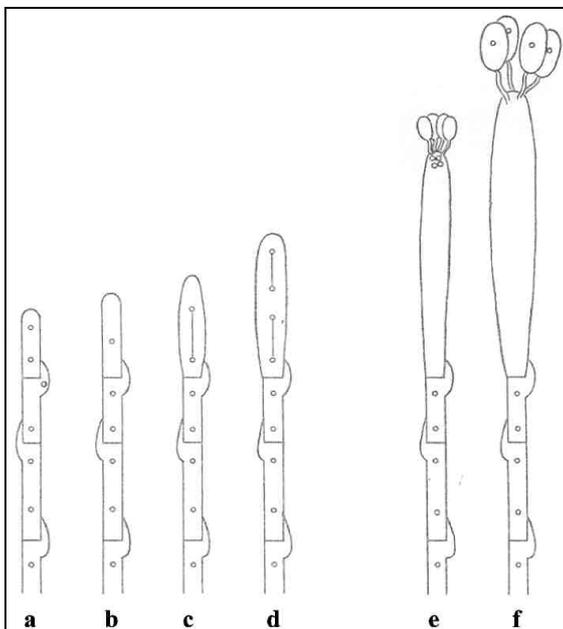
Comme il a été évoqué plus tôt à propos de la localisation de la mycorhize dans les tissus d'orchidées, les organes souterrains de réserve ainsi que les parties aériennes de la plante ne sont que très rarement infectés. En ce qui concerne la tige, les feuilles et la fleur, il semblerait que la présence de chlorophylle en soit la cause (Burgess, 1939). Mais pour les pseudo-bulbes/tubercules/rhizomes, il a été mentionné dans la littérature la présence de molécules à action fongicide [Bernard (1911) *in* Rasmussen, 1995; Arditti, 1982; Hadley, Pegg *in* Pritchard 1989]. Ces substances sont des phénanthrènes et font partie des phytoalexines (Hadley, Pegg *in* Pritchard, 1989). Elles sont produites par les tissus de l'orchidée lorsque ceux-ci entrent en contact avec la mycorhize. Il s'en suit un arrêt de la croissance des hyphes, suivi de la

dégénérescence et de la mort du mycélium (Rasmussen, 1995). La production de phytoalexines ne semble pas être localisée seulement dans les organes cités ci-dessus, mais ce qui fait la différence entre les tissus qui ont pu être infectés et ceux qui ne le sont pas, est la concentration dans laquelle elles sont synthétisées (Burgess, 1939).

Bien que n'intervenant pas dans la composition habituelle des milieux de culture pour mycorhizes, ces substances présentent peut-être un intérêt pour la maintenance du champignon dans les conditions de laboratoire. Si on arrivait à synthétiser ces phytoalexines, il serait alors possible, en les intégrant aux milieux de culture, de mieux maîtriser la croissance des mycorhizes. On utiliserait ainsi la faculté qu'ont les orchidées à contrôler leur propre infection, à des fins de laboratoire. Comme pour les facteurs mentionnés auparavant, il ne s'agirait pas non plus de trop s'éloigner des concentrations que le champignon rencontrerait normalement, dans la nature. On risquerait sinon de le voir développer une résistance et devenir complètement inadéquat pour sa relation avec l'orchidée.



**Fig. 40** Classification selon Ainsworth (1973)  
in Webster, 1980.

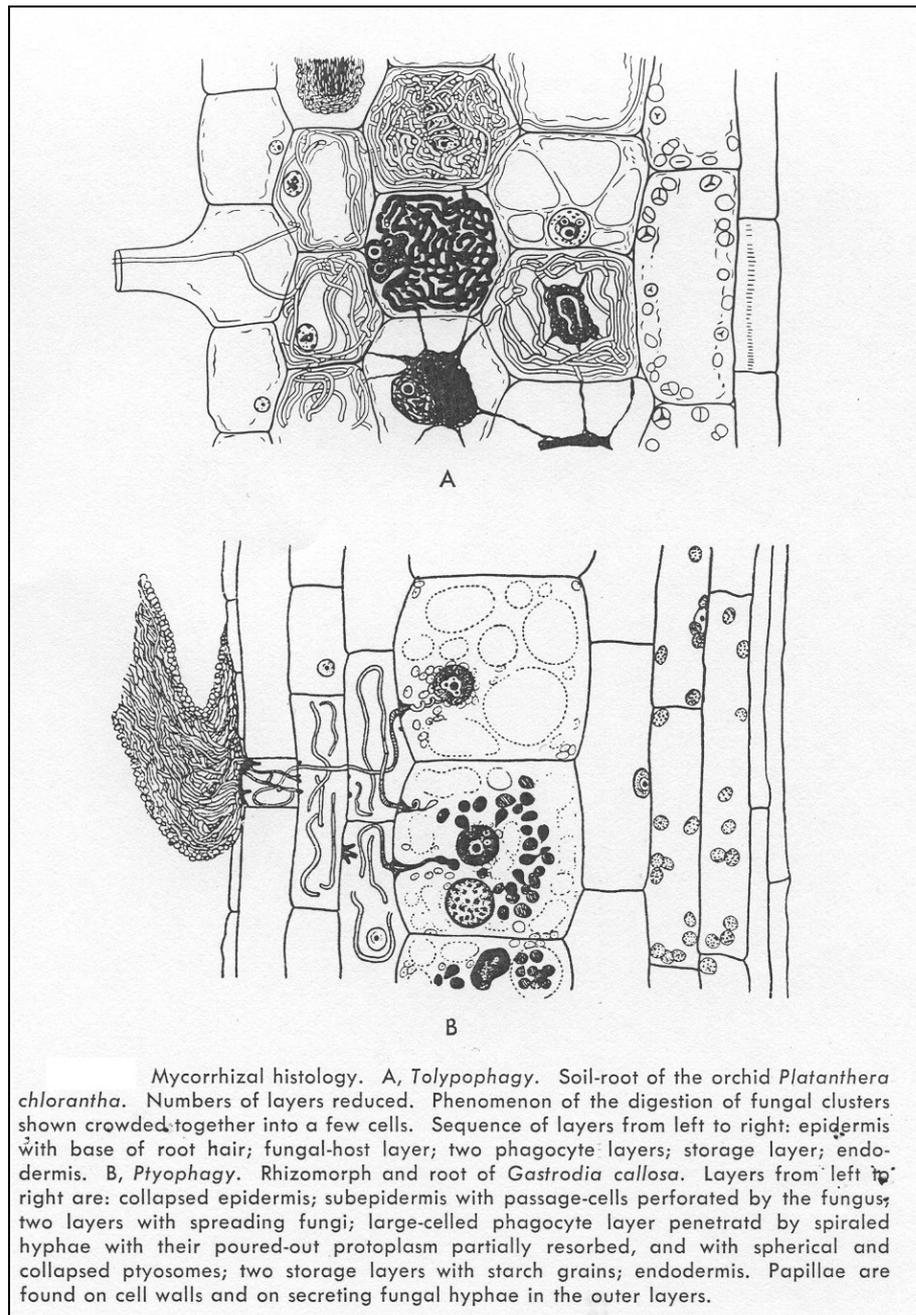


- a: Cellule terminale de l'hyphe, le dicaryon.
- b: Fusion des 2 noyaux pour former le noyau diploïde.
- c et d: Divisions méiotiques (2), dans la cellule qui s'élargit.
- e: Formation des protubérances à l'extrémité de la baside.
- f: Formation d'une membrane autour du cytoplasme et du noyau, séparant ces derniers du stérigma. Les spores sont mûres.

**Fig. 41** Développement de la baside et des basidiospores.



**Fig. 42 Classification des champignons selon leur comportement écologique et nutritionnel.**



**Fig. 44 Classification selon l'histologie des tissus infectés.**

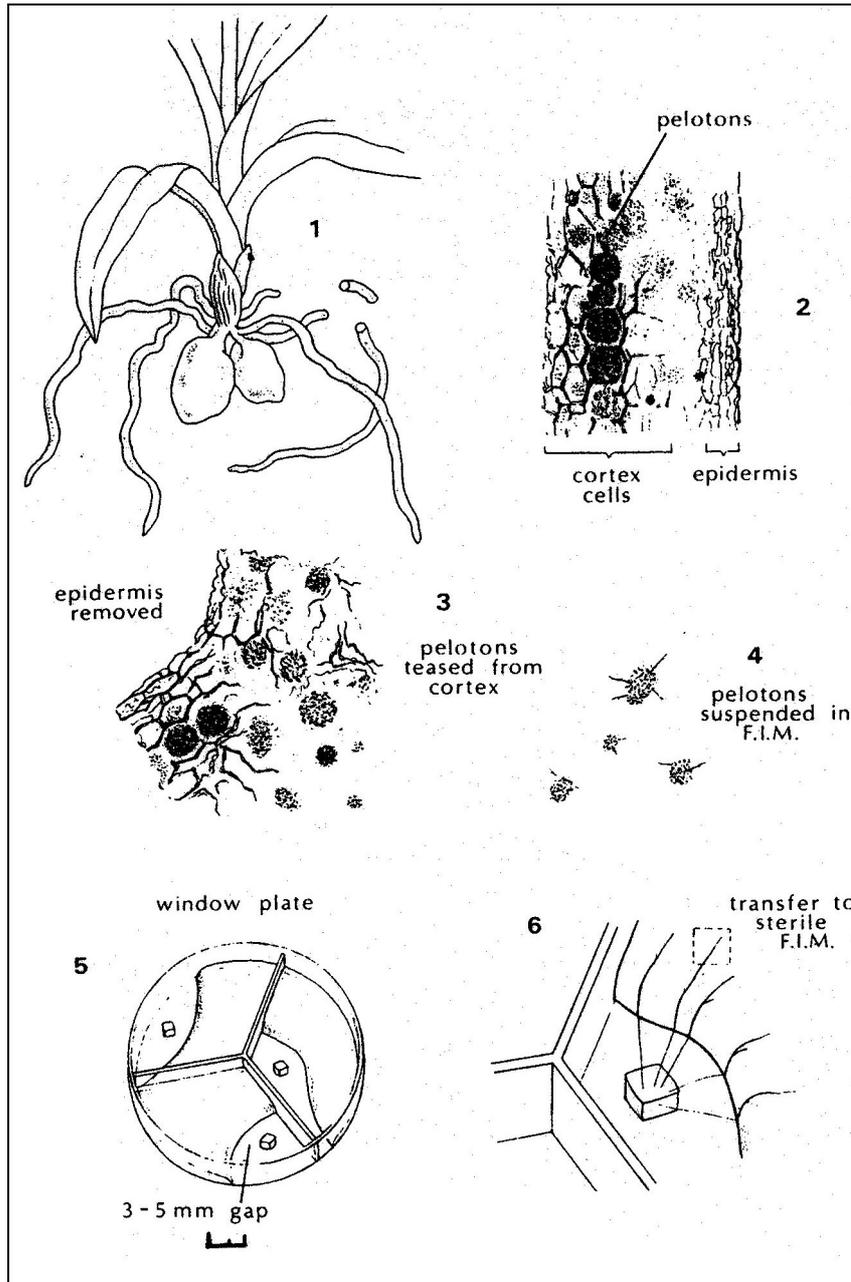
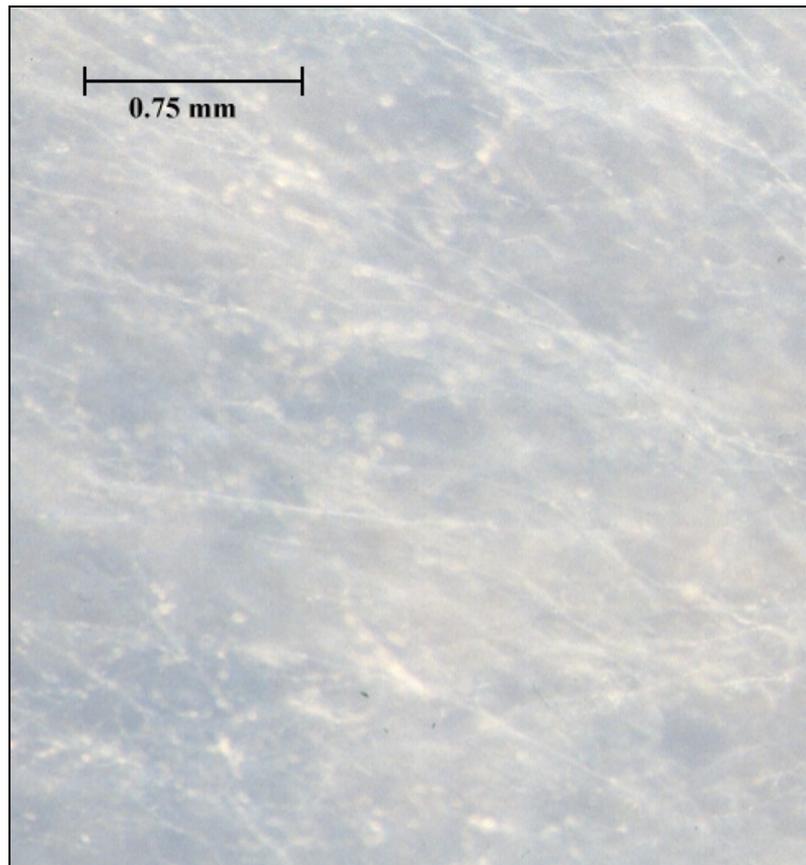


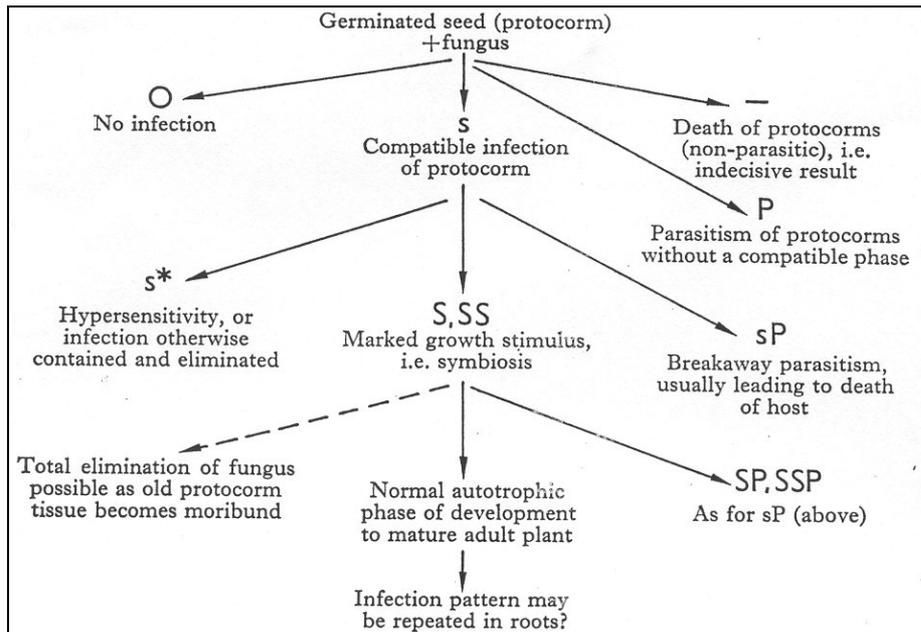
Fig. 45 Isolation de mycorhizes.



**Fig. 46** Conservation à court terme dans du FIM.



**Fig. 47** Conservation à long terme dans un protocorme.



**Fig. 48** Voies possibles dans l'association mycorhize-orchidée.

## **4. Résultats et discussions.**

### **4.1. Introduction.**

Cette partie du travail de diplôme a pour but de rendre compte des résultats obtenus au laboratoire pendant ses trois années d'existence (1998, 1999, 2000). Contrairement à ce qui se fait habituellement (recherche bibliographique avant la planification des essais), l'ordre chronologique des étapes de cette monographie est différent. Les résultats ont été obtenus au fur et à mesure des envois et des réceptions de matériel végétal et des cultures ont dû être débutées en toute hâte à cause de l'urgence des situations (réception de matériel risquant de pourrir et ne pouvant pas attendre). Cet état, inhérent à la nature du laboratoire (laboratoire de conservatoire botanique), a pour conséquence que les expériences n'ont pas pu être réalisées de façon systématique, ce qui rend l'interprétation des résultats de manière statistique impossible. De ce fait, seules des interprétations qualitatives ainsi que des tendances seront données ici.

En guise de synthèse, quatre fiches de culture d'orchidées terrestres reflèteront ce qui a pu être obtenu comme connaissances nouvelles avec les expériences. Les discussions des résultats pour chaque espèce seront intégrés dans ces fiches afin de traiter plus spécifiquement chaque orchidée. Un tableau sur les mycorhizes, résumant les connaissances obtenues grâce aux essais, les suivra.

## 4.2. Fiches de culture.

### *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó.

Etymologie:

*dactylo-*: doigt; *-rhiza*: racine; *maculata* = tâché (Delforge, 1994).

Synonymes:

*Dactylorhiza transsilvanica* (Schur) Aver. (Delforge, 1994), *Orchis maculata* L. (Reinhard *et al*, 1991).

Phénologie-physiologie:

apparition de la rosette au printemps (Rasmussen, 1995).

Période de floraison:

VI-VIII (Reinhard *et al*, 1991; Delforge, 1994).

Cette donnée est très approximative et s'applique à toute la Suisse, voire l'Europe. Etant donné la spécificité climatique de chaque station, il est mieux d'aller régulièrement observer l'état des plantes afin de ne pas manquer la floraison. Dans le cadre de la réalisation de fiches de cultures permettant l'obtention optimale de belles plantes, il est essentiel de se rendre sur place pour pouvoir effectuer la pollinisation manuelle des fleurs. C'est à partir de ce moment que l'on compte le nombre de jours écoulés qui indiquent l'état de maturité des graines. En l'an 2000, un programme de relevés de dates de floraison a débuté et ces orchidées ont été vues en fleur le 10.V.2000. Ce même jour, elles ont été pollinisées en vue de produire les graines qui ont été semées dans le courant de l'été.

Récolte des graines:

date inconnue pour la plupart des graines provenant de l'extérieur des CJB (Aachen D., Zakopane P., Trondheim N., Rotterdam NL., Akureyri IS., Cheshire G.-B., Porrentruy CH., Finlande).

En général, ce sont des graines sèches car elles sont envoyées par la poste. Elles sont soit emballées dans des petits sachets, soit encore contenues dans leur capsule et emballées dans une boîte en plastique. Lorsque l'on débute un laboratoire de culture *in vitro*, ces envois sont satisfaisants pour réaliser les premiers semis. Mais, une fois la méthode de germination déterminée et démontrée comme étant efficace, il est indispensable de mieux connaître l'âge précis des graines (comme il a été décrit ci-dessus). Ceci explique la proportion grandissante, au fil des années, de graines récoltées dans les environs des CJB pour les semis du laboratoire et les précautions (demandes de précisions concernant les dates de pollinisation et de récolte, les noms exacts...) de plus en plus grandes quant à la réception de matériel de provenance extérieure.

pour les graines récoltées dans les environs des CJB:

- Dully (CH) : 10.VIII.1998.
- Blécheins (CH) : 17.VII.1998, 17.VIII.1998, 18.IX.1998, 30.VI.2000.
- CJB (CH) : 5.VII.1999, 23.VI.2000, 21.VII.2000.

A partir de ce printemps 2000, pour les graines immatures, non seulement la date de prélèvement est notée, mais également celle de la pollinisation. On pourra ainsi déterminer très précisément le stade optimal de maturité des graines auquel il faut les semer pour obtenir une germination maximale.

### Prétraitements:

PT1, PT2 et PT3.

Les deux derniers traitements n'ont été appliqués que dans la dernière série d'expériences (année 2000). La désinfection à l'hypochlorite de calcium semble être tout à fait satisfaisante pour les graines sèches de cette espèce.

En ce qui concerne les graines contenues dans leur capsule fermée, la désinfection s'est constamment effectuée par trempage dans l'éthanol suivi du flambage du matériel. Mais, pour les essais futurs, cette méthode va être abandonnée à cause du dessèchement trop violent des graines lors de la combustion de la capsule. On compte maintenant, faire tremper les capsules dans la même solution d'hypochlorite de calcium que les graines sèches (PT1).

Des essais seront également réalisés en suivant la technique de Weiss (communications personnelles, novembre 2000). Celle-ci consiste à tremper la capsule dans plusieurs bains (alcool suivi d'eau de Javel puis encore une fois dans l'alcool) avant de la flamber. Dans cette méthode, il y a deux subtilités qui permettent de contourner le problème du dessèchement cité ci-dessus. D'une part, comme la capsule est humidifiée avec de l'eau de Javel, les tissus internes ne se dessèchent pas au flambage ce qui préserve les graines. D'autre part, en prenant soin, au moment du prélèvement en nature, de couper un bout de la tige portant la capsule, on évite l'apparition de fentes (minuscules et donc non visibles) et ainsi l'infection de l'intérieur de la capsule.

### Semis:

les milieux utilisés sont le BOM (semis mycorhizés), KEW-A (semis témoins) et TGZ.

La méthode de culture (symbiotique ou asymbiotique) ne semble pas jouer de rôle dans la vitesse de germination car au bout de 1 mois, on voit aussi bien des protocormes dans le KEW-A, le TGZ que dans le BOM inoculé.

Le milieu KEW-A semble être un très bon substrat pour la germination. De très beaux protocormes sont obtenus par la méthode asymbiotique, mais le but premier des essais au laboratoire reste l'obtention de plantes mycorhizées. Les semis en KEW-A et TGZ gardent comme principal rôle celui de témoin tout en permettant d'avoir des protocormes à disposition lors de la conservation de mycorhizes ou de repiquages de démonstration aux public.

les graines utilisées étaient sèches et quatre essais ont été réalisés avec des graines «immatures» (lots prélevés en VII.1998, VII.1999, VI.2000 et en VIII 2000).

Le nombre d'essais réalisés avec des graines immatures est encore trop faible par rapport aux semis faits à partir de matériel sec pour pouvoir en déduire le stade optimal du semis (3 essais avec des capsules vertes sur un total de 12 séries d'essais comportant cette espèce).

De plus, une confusion dans les termes de «immature» et «capsule verte» a rendu les expériences peu précises concernant la maturité des graines. En effet, des capsules contenant des graines récoltées encore vertes mais laissées en attente d'être semées ont été utilisées. Or, rien ne permet d'affirmer qu'une fois détachées du pied mère, elles ne continuent pas leur évolution. Lorsqu'elles sont enfin semées (quelques mois plus tard, par exemple), elles ont peut-être largement dépassé leur stade d'immaturité et doivent alors être considérées comme mures (la maturité s'annonce «par un changement de couleur, par le détachement de la plante mère et l'ouverture des valves, pores ou autres, pour laisser les graines s'échapper, acte que l'on nomme déhiscence», Nicholson, 1981).

A l'avenir, des graines pourront porter la dénomination de «immatures» quand elles seront issues de capsules effectivement vertes et fermées, seront semées le jour même de la récolte et, si possible, seront datées par rapport à leur fertilisation. Cette dernière donnée impliquera que la pollinisation soit faite manuellement. Ce n'est qu'en remplissant toutes ces conditions que l'on pourra parvenir à déterminer un âge optimal pour le semis des graines immatures de cette espèce.

#### Durée de germination:

pas encore déterminée précisément car l'observation des protocormes se fait en fonction des contrôles effectués. Mais des protocormes ont été mis en évidence à partir de 1 mois jusqu'à 4 mois après le semis.

Afin de mieux déterminer cette caractéristique, il faudrait contrôler les boîtes de semis à des intervalles de temps plus réguliers que ce qui a pu être fait jusqu'à maintenant. Le manque de personnel, d'expérience et de temps ont empêché cette observation systématique, mais l'élaboration d'un calendrier devrait permettre de combler cette lacune.

L'acquisition d'une certaine expérience ainsi que la réussite à établir un protocole adéquat pour la germination des graines sont également des conditions prérequisées pour déterminer de façon optimale le laps de temps nécessaire pour faire évoluer la graine vers le protocorme. Maintenant, avec l'expérience des trois premières années du laboratoire, la durée de germination va pouvoir être explorée de manière plus systématique et être mise en relation avec la maturité des graines (fig. 49, p 89), les prétraitements effectués et la mycorhize apportée.

#### Repiquage:

effectué à partir de 1 mois jusqu'à 10 mois après le semis.

L'observation principale pour la réussite du repiquage est qu'il ne devrait avoir lieu qu'en présence de protocormes bien différenciés (rhizoïdes bien visibles et testa disparu). En effet, des semis de la première série d'expériences avaient été repiqués au stade où l'embryon avait grossi mais était encore entouré de son testa. Cela a abouti à l'arrêt de l'évolution des graines en protocormes suivi de leur dépérissement.

En plus de cette observation, on remarque que les jours qui suivent le repiquage, les protocormes brunissent (tissus et rhizoïdes). Cela semblerait provenir du dessèchement provoqué par le flux laminaire, même si celui-ci est réduit au minimum. Heureusement, le nouveau développement de rhizoïdes (pas trop nombreux chez cette espèce, comparée à d'autres) ainsi que la suite de la croissance des protocormes dans les semaines qui suivent, attestent de la survie de ces derniers. On peut donc déjà affirmer que le repiquage est optimal quand les protocormes sont apparents mais qu'ils n'ont pas encore trop développé de rhizoïdes.

D'un point de vue pratique, cette opération est également délicate sur cette espèce parce qu'à côté du fait qu'il faut veiller à ne pas brûler le matériel végétal avec les instruments sortis du stérilisateur, les embryons supportent très mal le transfert, quel que soit l'instrument utilisé (pince ou cuillère).

Jusqu'à maintenant, seul un repiquage était fait pendant la culture *in vitro*, mais on compte en réaliser deux sur les essais à venir. Cette opération supplémentaire permettra d'obtenir des plantules plus grandes qui seront moins vulnérables à leur sevrage. Le moment optimal où réaliser cette étape intermédiaire restera donc à être testé.

Mycorhization:

elle a eu lieu soit après le semis en BOM (directement ou jusqu'à un mois plus tard), soit, avec des protocormes issus de TGZ et âgés de 3 mois, repiqués en BOM. Les mycorhizes testées ont été: F 336, F 414, F 423, F 424, F 500, B 1, DFV 1, HHBb, JBG O'holo, JBG AO, OMF 112, OMF 121, Penthes, *Dactylorhiza maculata*.

Les mycorhizes ayant donné des résultats sont: F 336, F 414 (fig. 50, p 89), DFV 1 (fig. 52, p 90), B 1, JBG O'holo, OMF 112, OMF 121 (fig. 51, p 90).

Cette espèce d'orchidées semblerait être assez tolérante quant au genre de mycorhize l'inoculant, mais on doit émettre quelques réserves concernant les résultats du laboratoire des CJB. En effet, il ne faut pas perdre de vue que cette orchidée a souvent été semée ici et que, pour cette raison, le nombre d'essais réalisés sur cette espèce est supérieur à celui d'autres genres. Par manque de données (car inexistantes), on ne peut pas faire de statistiques sur les résultats obtenus au laboratoire pendant ses trois années d'existence.

Mais sur la dernière série de semis (réalisée les 23.VI, 3 et 4.VIII.2000) où des données supplémentaires ont été inscrites, on peut calculer une ébauche de statistique entre le nombre de boîtes semées avec cette orchidée et le nombre total de boîtes: 31/503. Or, si l'on compte le nombre d'espèces différentes, et qu'on le rapporte au nombre total de boîtes, on obtient le nombre de boîtes que chaque espèce devrait avoir en essai. Il y a 28 genres et espèces dans cette série de semis, donc chaque genre devrait avoir 503:28 boîtes en essai, soit un nombre de 18 environ. Comme *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó est en test dans 31 boîtes, cela prouve bien que cette espèce est plus représentée dans les essais. On peut, par extrapolation, supposer que dans les essais précédents ce fut le même cas et donc que la tolérance apparente de cette espèce n'est peut-être due qu'à sa grande fréquence d'apparition dans les expériences.

L'opération de mycorhization réalisée au repiquage, trois mois après le semis en KEW-A, ne semblerait pas gêner le développement des protocormes. On a pu, en effet, sur les 2 semis réalisés de cette manière, obtenir 21 pots de plantes au sevrage (en IX.2000). Il reste maintenant à attendre le développement des plantules au printemps prochain pour en déduire le taux de réussite.

Sevrage:

il a lieu 4 à 14 mois après le semis. Le substrat utilisé est le mélange décrit dans le chapitre «sevrage» (2.1.8.). Dernièrement, du sable mélangé à du sol d'où provenait la mycorhize a servi pour la plantation de protocormes (lots sevrés en III.2000, en attente de résultats).

Le semis sevrés au bout de 4 mois sont généralement des boîtes dans lesquelles des infections se sont développées. Ils permettent de ne pas jeter des protocormes qui ne seraient pas abîmés (car l'infection ne détruit pas les tissus) et d'essayer de sauver ces plantes en créant une concurrence naturelle (provenant de l'environnement extérieur) à l'infection.

Jusqu'à présent, le compost du secteur des rocailles des CJB, a tout à fait convenu mais on a comme projet de tester de nouveaux mélanges. En effet, comme on veut réintroduire les orchidées dans leur milieu naturel, il est indispensable de le faire avec une mycorhize qui provient du même endroit. Or, comme le champignon est parfois assez spécifique du milieu dans lequel il vit, il faut adapter le substrat aux besoins de ce dernier afin qu'il ne disparaisse pas.

Comme cette espèce d'orchidées produit sa rosette de feuilles au printemps, il faudrait la sevrer juste avant qu'elle ne commence à reprendre sa croissance végétative, c'est-à-dire en fin d'hiver. Pour les graines semées en été, cela correspond à une durée comprise entre 8 et 10 mois après la date du semis. Les sevrages qui se sont faits après un plus grand nombre de mois correspondent aux graines sèches semées en hiver. Ce dernier type d'essais se fera de moins en moins puisqu'on veut se rapprocher au maximum des conditions naturelles et qu'on aimerait semer des graines dont l'âge exact est connu (donc pollinisées manuellement). Mais ils ont permis de réaliser deux séries d'essais par année ce qui a contribué à accélérer l'acquisition d'une méthode de germination propre au laboratoire.

Aucune plante de *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó n'a encore été plantée en pleine terre aux CJB et celles qui ont été sevrées en pot sont essentiellement issues de germinations en milieu asymbiotiques et repiquées avec mycorhization (F 336, F 414, OMF 121, DFV 1, B 1). Le comptage effectué le 12.XII.2000 a permis de dénombrer 4 pots sevrés en 1998, 8 en 1999 et 95 en 2000. Malheureusement, il n'était pas possible de déterminer le taux de réussite puisque les plantes étaient dans leur phase de repos.



**Fig. 49** Protocorme issu de semis immature (*Dactylorhiza maculata*, Kew-A).



**Fig. 50** Protocorme mycorhizé (*Dactylorhiza maculata*, F 414).



**Fig. 51** Protocorme mycorhizé (*Dactylorhiza maculata*, OMF 121).



**Fig. 52** Protocorme mycorhizé au repiquage (*Dactylorhiza maculata*, DFV 1).

**Ophrys apifera Hudson.**

## Etymologie:

*ophrus*: sourcil; *apifera*: porteuse d'abeille (Delforge, 1994).

## Synonymes:

*Ophrys arachnites* Mill., *O. aquisgranensis* Kaltenb., *O. ripaensis* Porta, *O. botteronii*, *O. jurana* Neuberger, *O. trollii* Hegetschw., *O. friburgensis* (Freyhold) Nägeli, *O. bicolor* Nägeli (Delforge, 1994), *O. rostrata* Ten., *O. pseudo-apifera* Cald. (Reinhard *et al*, 1991).

## Phénologie-physiologie:

apparition de la rosette à l'automne (Rasmussen, 1995).

Période de floraison:

IV-VII (Reinhard *et al*, 1991; Delforge, 1994).

Comme pour le genre précédent, la floraison s'étale sur une assez longue période suivant les endroits où se trouvent les stations. Aux CJB, les hampes d'*Ophrys apifera* Hudson sont en fleur fin mai, début juin. C'est donc à cette époque que la pollinisation manuelle des individus a lieu (observations et expérimentations qualitatives personnelles, mai-juin 2000). Pour l'année 2000, la pollinisation a effectivement été réalisée dans les derniers jours du mois de mai (29.V.2000) et les premiers du mois de juin.

Récolte des graines:

graines sèches:

- CJB: 27.VI.1997, 5.VII.1999 (pour tous les semis n'ayant pas eu lieu autour de cette date, c'est-à-dire la série de II.2000), 21.VII.1999, 11.VII.2000.
- Roches, Fourches (NE, CH): 2.VII.1999, 20.VII.1999. Ces lots ont été utilisés pour plusieurs séries de semis (VII.1999, II.2000, VIII.2000). Quand les capsules ont été reçues aux CJB, elles étaient déjà sèches, les graines étant de ce fait considérées comme mures.
- CERN (CH): 2.VI.1998, les capsules étaient vertes au moment de la récolte mais comme une partie a été conservée pendant 3 mois avant d'être semée, les graines devaient avoir dépassé le stade d'immaturité au moment du semis.
- Founex (CH): 19.VIII.1999.
- Caen (F), Limoges (F): date de récolte inconnue.

graines immatures:

- CERN (CH): 2.VI.1998. Ces capsules vertes ont été semées 1 mois ½ après leur récolte, ce qui permet encore de les considérer comme immatures {la maturité serait atteinte au bout d'environ 3 mois pour le genre *Cypripedium* L. [seule donnée connue, Carlson (1940) *in* Rasmussen, 1995]}. En effet, comme aucune indication supplémentaire n'est apportée et que le CERN se trouve non-loin des CJB (5-10 km), on peut supposer que la floraison a eu lieu approximativement à la même période qu'aux CJB. C'est donc vers la fin mai que les hampes ont probablement été pollinisées naturellement. Si elles ont été semées fin juillet, la durée écoulée entre les deux moments est de 2 mois.
- CJB: 5.VII.1999, date de récolte inconnue, 23.VI.2000. Le premier lot de graines n'a eu que 2 jours d'attente à subir entre sa récolte et son semis. La deuxième série de semis avec des capsules fermées a été réalisée fin juillet 1999, et comme aucune indication de date de récolte n'est donnée, on supposera que les graines étaient encore immatures. Quant à la troisième série, elle a été semée le jour même de sa récolte. Comme la pollinisation avait été effectuée autour du 29.V.2000, l'âge des graines au semis peut être estimé à 26 jours.

### Prétraitements:

PT1, PT2 et PT3.

Au tout début, seul le PT1 a été appliqué aux graines sèches. Il semblerait très bien convenir à la préparation d'*Ophrys apifera* Hudson puisque c'est encore, au laboratoire, le prétraitement le plus utilisé actuellement pour cette orchidée. Mais des essais ont été faits avec les deux autres types de traitements (série de graines semées en VII.1999 et I, II.2000). Par manque de données assez précises et assez nombreuses lors des premiers essais, il est difficile de se prononcer sur l'effet des différents prétraitements.

On peut cependant, sur les trois dernières séries citées ci-dessus, faire le rapport entre le nombre de boîtes infectées (puisque la désinfection est un des buts du prétraitement) et le nombre total de boîtes que comporte chaque traitement. En ce qui concerne le PT1, 5 boîtes sur les 8 se sont infectées; le PT2, aucune des 2 n'a été contaminée et le PT3 présente 4 infections sur les 9. Ces résultats, exprimés sous forme de pourcentages, donnent des taux d'infection de 62,5% pour le PT1, 0% pour le PT2 et 44,4% pour le PT3. Mais, en réalité, on ne peut pas se servir de ces chiffres car le nombre de répétition est vraiment trop faible.

Par contre, on peut comparer les PT1 et PT3 entre eux car ils ont pratiquement le même nombre de boîtes totales: il semblerait que le PT3 soit plus désinfectant que le PT1, ce qui paraît normal étant donné le passage dans un bain supplémentaire d'acide. En revanche, la comparaison avec l'efficacité du PT2 n'est pas possible du fait de la grande différence de nombre de semis ayant subi ce prétraitement (2 contre 8 et 9 pour les PT1 et PT3).

Ce dont il faut également tenir compte, est le fait que seuls les semis mycorhizés ont pu être utilisés, on ne peut donc pas distinguer avec certitude la provenance des infections constatées dans ces boîtes. Était-ce dû à l'utilisation de mycorhizes mal isolées, à des erreurs de manipulation à l'inoculation ou réellement causé par une mauvaise désinfection des graines?

A la lecture des données des essais, seuls ces semis permettaient les dénombrements faits ci-dessus. A l'avenir, il faudra donc veiller à préciser la prise de note des données au semis en distinguant bien les caractéristiques de chaque boîte (prétraitement, milieu, mycorhize, repiquage, nombre de boîtes avec chaque variante...). Finalement, la quantité et la précision des données à disposition actuellement ne permettent pas encore de tirer de conclusions quantitatives. On peut juste, qualitativement, conseiller les traitements PT1 et PT3 par rapport au PT2 et reproduire les essais en plus grand nombre afin d'acquérir plus d'expérience et d'améliorer la gestion des données du laboratoire des CJB.

### Semis:

les deux milieux les plus utilisés sont KEW-A et BOM.

Ils ont l'air de bien convenir à cette espèce puisque les germinations s'y déroulent normalement. Des essais ont été faits avec divers autres milieux [TGZ-N, Van Waes & Debergh (1986), Arditti *et al* (1985), Svante Malmgren simplifié (1992)] sur la série de graines immatures de VII.1999. Les résultats ne sont pas convaincants puisque aucune germination n'a, pour l'instant, pu être décelée. Malgré la germination des graines sur les deux premiers milieux cités, donc sur des témoins (le problème ne provient pas du matériel végétal), il manque des répétitions pour pouvoir déconseiller les derniers substrats. Il faudrait réitérer ces expériences et observer l'effet de ces milieux sur des graines sèches pour pouvoir tirer des conclusions concernant leur efficacité.

Il ne faut pas perdre de vue que la germination des graines était le premier objectif des essais du laboratoire. Pour l'instant, la conclusion qualitative que l'on peut déduire de ces expériences est que les milieux KEW-A et BOM ainsi que le PT1 conviennent parfaitement à la germination de cette espèce. Ces conditions sont maintenant appliquées systématiquement pour expérimenter les autres facteurs influençant la germination et la culture *in vitro* de cette orchidée. L'obtention de résultats en plus grand nombre ainsi que le traitement statistique de ces derniers constituent donc une des prochaines étapes des expériences au laboratoire des CJB.

Durée de germination:

elle s'étend de 1 à 4 mois.

Deux constatations peuvent être faites: l'une à propos des vitesses de germination en fonction des milieux utilisés et l'autre à propos de la maturité des graines. Premièrement, l'obtention de protocormes en 1 mois a pu être constatée aussi bien sur KEW-A que sur BOM mycorhizé. D'habitude, il n'est pas fréquent que des semis asymbiotiques germent en une durée aussi courte (Mitchell, 1989), c'est une des raisons qui fait que KEW-A constitue un excellent témoin pour les essais du laboratoire des CJB.

Deuxièmement, ce sont les graines issues de capsules encore vertes qui mettent le plus de temps à germer. Dans la littérature, Arditti *et al*, (1985) font le même constat avec l'espèce *Cypripedium acaule* Aiton, mais le contraire est observé par St-Arnaud *et al*, (1992). Ces derniers auteurs trouvent justement, que, *Cypripedium acaule* Aiton semé immature, germe de manière rapide et importante comparé au semis de graines matures. Peut-être, ces données contradictoires sont-elles dues aux différences de manipulation et de matériel? Le faible nombre d'essais réalisés jusqu'à ce jour n'est-il pas également à mettre en cause? Et jusqu'à quel point ces résultats sont-ils comparables avec ceux du laboratoire obtenus avec une espèce d'orchidée complètement différente?

Repiquage et mycorhization:

ils ont lieu 4 à 9 mois après le semis.

Le repiquage a lieu soit dans du BOM, soit dans le même milieu que le semis. En général, on essaie de repiquer un maximum de protocormes en conditions symbiotiques afin de tester des mycorhizes. Mais le problème rencontré chez *Ophrys apifera* Hudson est que cette espèce produit des rhizoïdes en densité élevée, donc au moment de l'ouverture de la boîte, ces derniers accélèrent le dessèchement des tissus (grande surface d'exposition au flux), provoquant ainsi de graves blessures aux protocormes (fig. 53 et 54, p 95). Fort heureusement, après quelque temps ces protocormes reprennent très bien leur croissance et de nouveaux rhizoïdes apparaissent. Curieusement, cette orchidée [parmi *Orchis simia* Lam., *Dactylorhiza sambucina* (L.) Soó, *maculata* (L.) Soó et *majalis* (Reichb.) P. F. Hunt & Summerhayes, et *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br.] représente l'espèce qui supporte le mieux les essais de mycorhizes réalisés au printemps 2000 (observations personnelles, mars 2000).

La mycorhization a été réalisée avec les souches A 17, F 336, F 414, F 419, F 422, F 424, F 500, F 501, F 550, OMF 112, OMF 121, OMM 125, OMB, HHBb, HHB 128, DFV 1, B 1, JBG O'holo, Penthes, Genthod, Soral, JBG AO, Sézegnin. On a constaté que F 500, OMF 112, et OMF 121 permettaient une bonne germination chez *Ophrys apifera* Hudson, alors que (Sézegnin, Soral, Penthes, F 422), HHB 128, (OMM 125) et DFV 1 ne donnaient pas une bonne symbiose (les résultats entre parenthèses restent encore à être confirmés car il se pourrait que la symbiose n'ait pas réussi à cause de la mauvaise isolation de la mycorhize).

Comme pour l'espèce d'orchidée précédente, le nombre de répétitions étant trop faible, on ne peut pas statistiquement affirmer la supériorité d'une mycorhize par rapport à une autre. Par

contre, ayant constaté que certaines se comportaient bien en symbiose, les derniers essais (année 2000) se sont concentrés sur l'inoculation avec ces champignons. Ce sont OMF 112, OMF 121, OMM, OMB, HHBb. De plus, ces mycorhizes proviennent toutes de la région genevoise, ce qui constitue également un argument important. En effet, idéalement, la réintroduction en nature devrait se faire avec du matériel provenant des environs de la station afin de ne pas déséquilibrer l'écosystème y régnant. L'inoculation de ces mycorhizes semble bien se passer car sur les 47 boîtes mycorhizées, seules 5 se sont infectées. Elles peuvent donc être considérées comme propres.

Sevrage:

par manque de données, on ne peut pas indiquer pour cette espèce la durée nécessaire à partir du semis (fig. 55, p 96).

On peut la calculer: en sachant que la rosette apparaît en automne, et que le moment optimal est au début de l'hiver, le temps écoulé entre les semis et le sevrage doit compter 4 à 6 mois. Si les plantules passent un cycle supplémentaire en culture *in vitro*, on arrive à une durée de 16 à 18 mois. Le seul essai des CJB pour lequel des données sont disponibles à propos de sevrage, est celui des semis datant du 7.VII.1999. Des protocormes ont été sevrés après 14 mois ½. Cela indique qu'ils sont sortis début octobre, soit quelques mois avant la période optimale. Probablement ces plantules étaient-elles issues de boîtes infectées.

Par contre, ce qui est très encourageant, est le fait qu'en XII.2000 un inventaire des plantes sevrées et en pots a été réalisé; on y a compté 32 pots d'*Ophrys apifera* Hudson dont l'empotage avait eu lieu le 22.X.1998. Ces plantes avaient été semées le 4.XII.1997 et provenaient donc de graines sèches. On constate donc qu'elles ont vécu près d'un an (10 mois) en conditions *in vitro* et un an ½ (18 à 18 mois ½) en conditions naturelles. Leur sevrage peut être considéré, après une telle durée, comme un succès puisqu'elles ont survécu à toutes les saisons et ont pu réaliser au moins un cycle naturel entier.

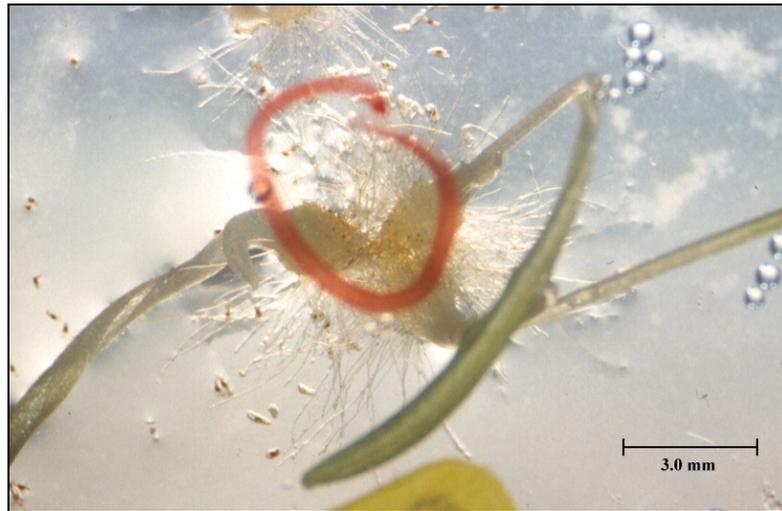
En 1999, seuls 4 pots avec des protocormes germés asymbiotiquement et repiqués avec la mycorhize OMF ont pu être produits alors qu'en 2000, rien n'a été sevré pour cette espèce.



**Fig. 53** Protocorme montrant des rhizoides recroquevillés  
(*Ophrys apifera*, Kew-A).



**Fig. 54** Protocormes dont le stade de repiquage est presque dépassé (*Ophrys apifera*, Kew-A).



**Fig. 55** Verdissement de la pousse indiquant le stade du sevrage (*Ophrys apifera*, Kew-A).

**Himmantoglossum hircinum (L.) Sprengel.**

## Etymologie:

*imanto-*: lanière; *-glôssa*: langue; *hircinum*: (à odeur) de bouc (Delforge, 1994).

## Synonyme:

*Loroglossum hircinum* (L.) L. C. M. Richard (Reinhard *et al*, 1991).

## Phénologie-physiologie:

production des feuilles basales à l'automne ou au début du printemps (Rasmussen, 1995). Pour la région genevoise, c'est à l'automne que l'on voit apparaître la rosette.

Période de floraison:

V-VII (Reinhard *et al*, 1991; Delforge, 1994).

Aux CJB, les hampes de cette orchidée ont été remarquées en fleur lors de l'observation du 10.V.2000. Pour les graines récoltées cette année, la pollinisation a donc été effectuée à cette date.

Récolte des graines:

graines sèches:

- di Antonio: année 1997, ces graines ont été données par la personne citée et la date de prélèvement n'est pas connue précisément. Ce lot a permis de faire les premiers semis du laboratoire des CJB.
- BIT (CH), Sécheron (CH): 18.VII.1998.
- Bernex (CH): 21.VIII.1998.
- Genthod (CH): 17.VI.1998.
- autoroute (?): 1.IX.1998.
- Nantes (F): date de prélèvement inconnue.
- Ripes, Roches (NE, CH): 2.VII.1999.
- Caen (F): date de prélèvement inconnue.
- Roches, Fourches (NE, CH): 20.VI.1999.
- CJB: 11.VII.2000.

graines immatures:

- Genthod (CH): 17.VI.1998.
- Soral (CH): 17.VII.1998.
- CJB: 5.VII.1999, 23.VI.2000, 30.VI.2000.

Prétraitements:

sur cette espèce, les trois types de traitements (PT1, PT2 et PT3) des graines sèches ont été testés.

Lors des premiers essais (VI et VIII.1998), toutes les graines subissaient le PT1, mais les semis ne germant pas, d'autres traitements ont été envisagés. La série de XII.1998 a été réalisée avec du matériel dont la désinfection consistait à le faire tremper pendant 20 minutes dans de l'eau de Javel diluée 10 fois. Suite à cette expérience, des protocormes sont apparus ce qui a peut-être prouvé la plus grande efficacité de ce traitement lorsqu'il s'agissait de provoquer la germination. Il faut cependant rester vigilant dans cette interprétation car peut-être seul l'état des graines a fait la différence.

Etant donné que ce traitement ne semblait pas assez fort pour éradiquer les sources d'infections sur les graines, l'eau de Javel a, par la suite, été utilisée à l'état pur (PT2, voir le chapitre 2.1.4.). Afin de tester un traitement plus fort que le PT1, tous les semis de 1999 ont été réalisés avec des

graines ayant subi le PT3. Le PT2 servait alors de témoin (en supposant qu'il était la cause de la meilleure germination lors de la série de XII.1998). Malheureusement, les résultats de germination espérés n'ont pas été atteints, quels que furent le traitement ou la maturité des graines.

Comme ces semis avaient été réalisés avec des graines issues de lots importants, ils ont pu être répétés en 2000 (2 séries en II et 2 en VIII.2000) en appliquant les PT1 et PT3. Cette fois-ci, la germination a été effective: sur les 8 boîtes semées dans une série de II.2000, 6 ont germé et dans l'autre série de II.2000, 3 sur les 5 boîtes contiennent des protocormes. Les semis de VIII.2000 sont en attente de résultats.

En ce qui concerne les capsules vertes (graines immatures), elles ont été trempées dans le  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  pendant 20 minutes (dont les trois premières se passent dans le bac à ultrasons) pour les séries récoltées les 17.VI et 17.VII.1998. Après le semis, le taux d'infection était tellement élevé que ce traitement a été renforcé par le trempage dans un bain d'alcool suivi d'un flambage (série récoltée en VII.1999). Mais comme ce dernier provoquait le dessèchement brutal des graines, la série de capsules récoltées en VI.2000 ont de nouveau été traitées au PT1. Aucun résultat positif n'a été constaté pour le moment. Les infections semblent moins importantes avec cette série, cela pourrait s'expliquer par le fait que pendant l'été 1998, la température du laboratoire a atteint des valeurs très élevées et les systèmes d'aspiration d'air n'étaient pas encore installés. L'expérience acquise lors des manipulations précédentes y a sans doute également contribué.

#### Semis:

comme pour l'espèce précédente, les milieux sur lesquels les graines ont été semées sont le BOM, le TGZ et le KEW-A. Une série de graines immatures (VII.1999) a été semée sur les autres milieux cités ci-dessus pour l'*Ophrys apifera* Hudson mais aucun résultat n'a pu en être tiré.

Les trois premiers milieux seulement ont permis la germination. Le KEW-A semble particulièrement efficace pour *Himantoglossum hircinum* (L.) Sprengel car la plupart des protocormes sevrés (17 boîtes de protocormes issus de KEW-A sur 19 sevrées depuis 1998) avaient été semés dans ce milieu, puis repiqués dans du BOM mycorhizé. Depuis cette constatation, tous les milieux sauf le BOM et le KEW-A ont été abandonnés.

#### Durée de germination:

elle a été constatée après une durée s'étalant de 3 semaines à 4 mois  $\frac{1}{2}$  (fig. 56, p 100). Des repiquages ont même été effectués après 15 mois mais cela n'indique pas forcément que la germination ait mis ce laps de temps pour se réaliser.

#### Repiquage et mycorhization:

le repiquage a lieu entre 2 mois jusqu'à 15 mois après le semis (fig. 57, p 100; 58 et 59, p 101).

Les longues durées écoulées entre semis et repiquage indiquent la présence de boîtes dans lesquelles la germination n'a probablement pas été vraiment marquée et que l'on a gardées en observation. Le repiquage devient alors nécessaire à cause de l'épuisement du milieu.

Pour une série de semis datant de VII-VIII.1999, un deuxième repiquage (soit 14 mois après le semis et 10 mois après le premier repiquage) a été réalisé afin de voir si un renouvellement du milieu pouvait donner une stimulation nouvelle aux graines. A l'heure actuelle, on n'a encore rien constaté de nouveau.

Là où la germination est réellement explicite, le repiquage est effectué dans les 2 à 4 mois ½ qui suivent le semis. Très souvent, pour cette espèce d'orchidées, il y a mycorhization à ce moment car ce sont les semis en KEW-A surtout qui produisent des protocormes.

Les mycorhizes testées sur *Himmantoglossum hircinum* (L.) Sprengel ont été les suivantes: F 336, F 414, F 419, F 423, F 424, F 500, F 501, B 1, A 17, Buchillon, Genthod, Grillet, Sézegnin, Soral, JBG O'holo, JBG AO, O. purpurea, HHBb, HHB 125, HHB 128, OMF.

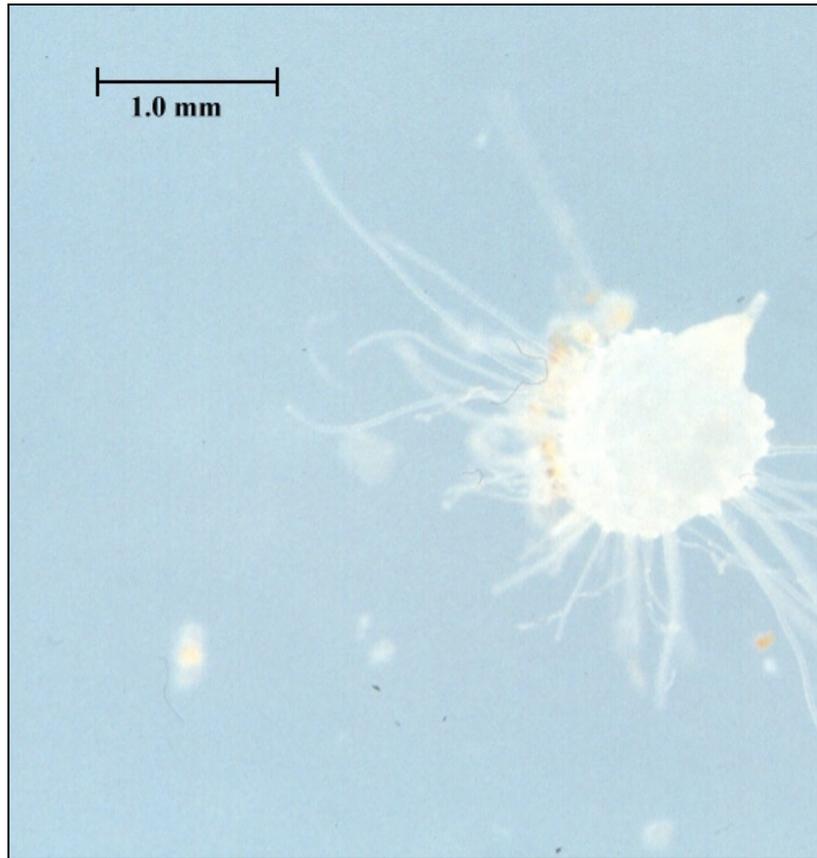
Comme relativement peu de germinations de cette espèce ont pu être constatées (comparées aux 2 précédentes) et que, de plus, ces dernières étaient en milieu asymbiotique, seules peu de mycorhizations réussies ont pu être observées. Ce sont F 423, F 424 et F 501. L'inconvénient de ces mycorhizes est que leur provenance n'est pas de la région genevoise. En effet, au début des expérimentations, les CJB se sont procurés auprès d'autres laboratoires des mycorhizes afin de pouvoir mettre en route les essais.

L'isolation de mycorhizes propres au laboratoire a demandé un certain temps, mais actuellement, des souches issues de tissus de *Himmantoglossum hircinum* (L.) Sprengel prélevés dans les environs font partie de sa collection. Ce sont toutes celles qui commencent par HHB et qui sont préférentiellement utilisées dans les derniers essais. Malheureusement, ces mycorhizes se comportent assez difficilement en culture *in vitro*, elles sont très vigoureuses et recouvrent entièrement de mycélium les graines ou les protocormes lorsqu'elles sont apportées. Les deuxièmes repiquages dont il est question ci-dessus sont justement inoculés avec ces champignons dans le but de réduire la vigueur de ces derniers grâce à la lumière.

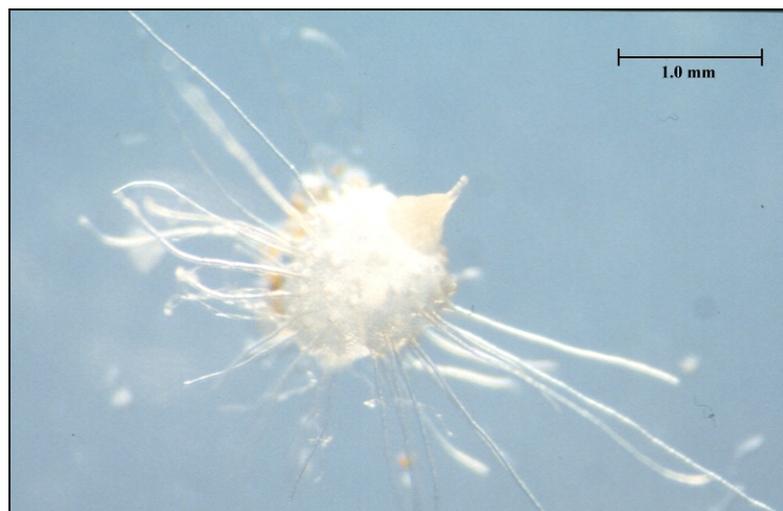
#### Sevrage:

celui-ci se fait entre 10 à 15 mois après le semis.

Comme les *Himmantoglossum hircinum* (L.) Sprengel produisent leurs feuilles à l'automne, il est préférable de les sevrer à cette époque. Mais au printemps 2000, certains protocormes (série de VI.1999) ont également été sevrés (5 pots dénombrés au 12.XII.2000). Leur germination avait eu lieu en KEW-A mais ils ont été mycorhizés avec Genthod, B 1 et OMF 121. Il ne reste plus qu'à attendre de voir si ces derniers ont bien survécu à l'opération. Pour l'année 1999, on a compté 11 pots sevrés, dont 4 provenaient de boîtes non-mycorhizées et les autres de boîtes inoculées avec A 17, F 423, JBG O'holo et Genthod (les deux dernières mycorhizes ayant été apportées au semis).



**Fig. 56** Protocorme, peu fréquent chez ce genre  
(*Himantoglossum hircinum*, Kew-A).



**Fig. 57** Protocorme prêt à être repiquer  
(*Himantoglossum hircinum*, Kew-A).



**Fig. 58** Stade idéal pour le repiquage, faible taux de germination, (*Himmantoglossum hircinum*, Kew-A).



**Fig. 59** Stade critique au repiquage (*Himmantoglossum hircinum*, Kew-A).

#### 4.3. Ebauche de fiche de culture de deux orchidées en danger.

##### *Orchis provincialis* D. C..

##### *Orchis papilionacea* L..

##### Etymologie:

*orkhis*: testicule;

- *provincialis*: de Provence,
- *papilionacea*: en forme de papillon.

##### Synonymes:

- *Orchis provincialis* D. C.: *O. leucostachys* Grisebach, *O. cyrill* Tenore (Delforge, 1994), *O. pallens* Savi (Reinhard et al, 1991)
- *Orchis papilionacea* L.: *O. rubra* Jacq., *O. p.* subsp. *rubra* (Murray) Sundermann, *O. p.* var. *rubra* (Murray) Brot. (Reinhard et al, 1991), *O. decipiens* Tod., *O. expansa* Tenore, *O. p.* var. *vexillifera* Terraciano, *O. p.* var. *grandiflora* Boissier, *O. p.* var. *heroica* (E. D. Clarke) Delforge, *O. p.* var. *bruhnsiana* Gruner, *O. cyrenaica* E. A. Durand & Baratte (Delforge, 1994).

##### Phénologie-physiologie:

apparition de la rosette en automne.

##### Période de floraison:

- *Orchis provincialis* D. C.: IV-V (Reinhard et al, 1991).
- *Orchis papilionacea* L.: IV-V (Reinhard et al, 1991).

##### Prétraitements:

les trois traitements ont été appliqués sur les graines sèches.

Il s'est avéré que *Orchis provincialis* D. C. supporte bien les PT2 et PT3, alors que le PT1 semblerait trop faible pour la désinfection et l'induction de la germination de ces semences. *Orchis papilionacea* L., par contre, paraît beaucoup plus sensible, seul le PT1 peut lui être appliqué. Les séries du 24.III.2000 et du 23.VIII.2000 ont de ce fait été traitées avec le PT1 pour *Orchis papilionacea* L. et le PT3 pour *Orchis provincialis* D. C..

##### Semis:

ils ont été faits sur les milieux KEW-A, TGZ et BOM pour les deux espèces.

Au début, seuls les semis asymbiotiques se sont révélés efficaces pour faire germer les graines, en particulier le KEW-A. Mais dans les séries d'*Orchis papilionacea* L. semées en III et en VIII.2000, deux boîtes mycorhizées avec OMF 121 ont pu être obtenues. Ce résultat est très encourageant pour deux raisons: premièrement, *Orchis papilionacea* L. a disparu de Suisse (Delforge, 1994) donc, si, *in vitro*, sa germination pouvait être réalisée, ce serait un grand pas en avant pour sa réimplantation; deuxièmement, la mycorhize efficace (OMF 121) est de la région genevoise ce qui est très important si on veut réintroduire cette espèce en nature. OMF 121 se révélerait être comme un champignon particulièrement intéressant car il a également permis la germination d'*Orchis provincialis* D. C. semés en III et VIII.2000.

Les deux autres inoculations sur cette espèce d'orchidée, F 414 et OMM 125, paraissent trop virulentes car après que les embryons aient pris un aspect enflé, ils sont recouverts d'une épaisse couche de mycélium. Ces amas prennent une couleur brunâtre laissant présager du pire pour leur avenir.

Les conditions appliquées aux semis mycorhizés ont été différentes des habituelles, on a, en effet, placé les boîtes à l'obscurité, à 20°C (qui sont les conditions pour les semis asymbiotiques). Ce choix a été fait de manière totalement arbitraire, un local de culture s'étant libéré au moment du semis: cela permettait d'avoir toutes les boîtes dans le même endroit. Par la suite, des problèmes d'infections sont survenus et ont contraint le déplacement de toute la culture dans un lieu plus propre. Afin de ne pas créer de choc thermique, les boîtes ont été entreposées dans la chambre de culture n°3.

#### Durée de germination:

La germination a été constatée lors de contrôles de culture 1 mois ½ après le semis pour une des boîtes mycorhizées d'*Orchis papilionacea* L. (fig. 60, p 104) et 4 mois ½ pour *Orchis provincialis* D. C. semé en KEW-A. Dans les deux dernières séries de l'année 2000, toutes les boîtes comportaient des graines germées en protocormes ou en cours de germination. Or le temps écoulé était de 4 à 4 mois ½ et il concernait les semis asymbiotiques dont le stade de développement semblait moins avancé.

#### Repiquage et mycorhization:

Jusqu'à maintenant, étant donné que seuls les semis asymbiotiques germaient (fig. 61, p 104; 62, p 105 et 65, p 107), ces deux opérations se faisaient ensemble. Elles avaient lieu entre 4 mois ½ et 10 mois après le semis et les milieux utilisés étaient KEW-A et BOM. Les mycorhizes avec lesquelles ces boîtes étaient inoculées, étaient F 414 et OMF. Malgré le fait que F 414 ne provienne pas de la région genevoise, elle avait été sélectionnée pour son efficacité souvent prouvée sur un grand nombre d'espèces.

A la date du 14.XII.2000, un comptage de toutes les boîtes repiquées a été réalisé afin de connaître l'état de la culture. Pour *Orchis provincialis* D. C., seuls les repiquages de semis datant du 7.VII.1999 ont été pris en compte. Sur 2 boîtes inoculées avec F 414, aucune ne semblait avoir donné de résultat positif. La souche OMF (sans autre spécification) se trouvait inoculée dans 4 boîtes; 3 semblaient contenir des protocormes assez sains (fig. 63 et 64, p 106). En ce qui concerne OMF 121, 121 a, 121 b, les proportions de boîtes où des protocormes semblaient être en voie de développement par rapport au nombre de boîtes total étaient de: 16/19 (OMF 121), 2/2 (OMF 121 a) et 2/3 (OMF 121 b). La souche OMF 112 avait quant à elle, un rapport de 4/7. La santé des protocormes a été évaluée de la sorte: tout ce qui était brun, recouvert de filaments mycéliens et qui ne possédait plus aucun tissu blanc, translucide et turgescent comptait comme du matériel mort. Toutes les boîtes «saines» contenaient au moins un protocorme avec des rhizoïdes blancs, raides et turgescents. La présence d'infections dans les boîtes n'a pas mené à leur élimination des comptages. Comme ces infections semblaient peu virulentes, il était en effet probables qu'elles furent originaires de la mycorhize. Les protocormes ne semblaient pas en souffrir.

Pour *Orchis papilionacea* L., très peu de repiquages ont été retrouvés, sur les 2 boîtes de 1999 [1 en KEW-A et 1 inoculée avec OMF (sans spécification)], aucune ne semblait encore contenir du matériel vivant. Quant aux boîtes de semis datant du 23.VIII.2000, le stade de développement des graines était plus avancé en conditions symbiotiques qu'asymbiotiques. Néanmoins, l'état dans lequel se trouvaient les protocormes, indépendamment de leur milieu, permettait leur repiquage.

#### Sevrage:

il n'a encore jamais été réalisé avec ces orchidées aux CJB.



**Fig. 60** Protocorme peu fréquent dans les essais des CJB (*Orchis papilionacea*, Kew-A).



**Fig. 61** Verdissement de la pousse (*Orchis papilionacea*, Kew-A).



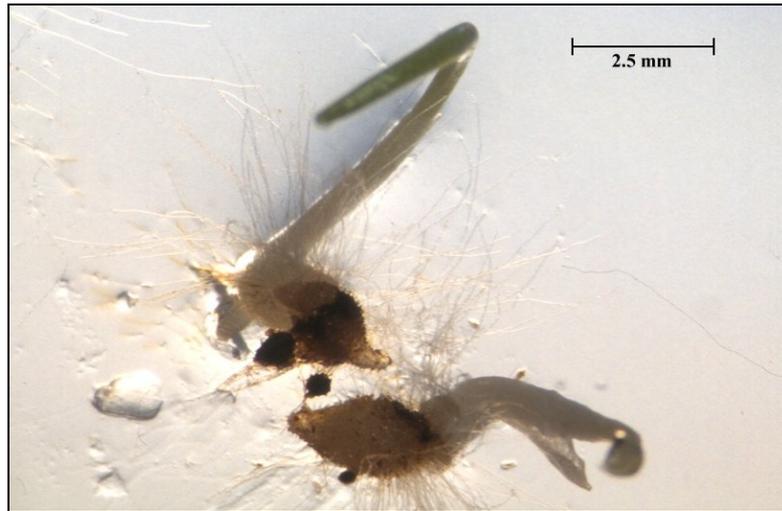
**Fig. 62** Protocormes déjà repiqués (*Orchis papilionacea*, Kew-A).



**Fig. 63** Protocorme mycorhizé (*Orchis provincialis*, OMF 121).



**Fig. 64** Protocorme mycorhizé au repiquage (*Orchis provincialis*, OMF 121).



**Fig. 65** Protocormes repiqués, montrant une pousse verte (*Orchis provincialis*, Kew-A).

**4.4. Tableau récapitulatif des résultats de mycorhizations (Tab. 9).**

Mycorhize:	Orchidée(s) compatible(s):
F 336	<i>Coeloglossum viride</i> (L.) Hartman <i>Dactylorhiza maculata</i> (L.) Soó <i>Epipactis palustris</i> (L.) Crantz <i>Gymnadenia conopsea</i> (L.) R. Br.
F 414	<i>Aceras anthropophorum</i> (L.) Aiton <i>Barlia robertiana</i> (Lois.) Greuter <i>Coeloglossum viride</i> (L.) Hartman <i>Dactylorhiza fistulosa</i> (Moensch) H. Baumann & S. Künkele, <i>fuchsii</i> (Druce) Soó, <i>maculata</i> (L.) Soó <i>Epipactis palustris</i> (L.) Crantz <i>Gymnadenia conopsea</i> (L.) R. Br. <i>Platanthera bifolia</i> (L.) Rich. <i>Leucorchis albida</i> (L.) E. H. F. Meyer
F 419	<i>Dactylorhiza fuchsii</i> (Druce) Soó <i>Gymnadenia conopsea</i> (L.) R. Br.
F 422	
F 423	<i>Himantoglossum hircinum</i> (L.) Sprengel
F 424	<i>Himantoglossum hircinum</i> (L.) Sprengel
F 500	<i>Dactylorhiza majalis</i> (Reichb.) P. F. Hunt & Summerhayes <i>Epipactis palustris</i> (L.) Crantz <i>Ophrys apifera</i> Hudson
F 501	<i>Himantoglossum hircinum</i> (L.) Sprengel
F 550	<i>Cephalanthera rubra</i> (L.) Rich. <i>Epipactis palustris</i> (L.) Crantz <i>Gymnadenia conopsea</i> (L.) R. Br. <i>Orchis purpurea</i> Hudson
A 17	<i>Dactylorhiza fuchsii</i> (Druce) Soó, <i>praetermissa</i> (Druce) Soó <i>Epipactis palustris</i> (L.) Crantz
B 1	<i>Dactylorhiza fistulosa</i> (Moensch) H. Baumann & S. Künkele, <i>maculata</i> (L.) Soó, <i>majalis</i> (Reichb.) P. F. Hunt & Summerhayes <i>Epipactis helleborine</i> (L.) Crantz, <i>palustris</i> (L.) Crantz <i>Leucorchis albida</i> (L.) E. H. F. Meyer <i>Orchis simia</i> Lam.
DFV 1	<i>Dactylorhiza maculata</i> (L.) Soó, <i>majalis</i> (Reichb.) P. F. Hunt & Summerhayes <i>Orchis simia</i> Lam.
JBG AO	
JBG O'holo	<i>Dactylorhiza maculata</i> (L.) Soó
O. purpurea	
D. maculata	
Genthod	<i>Neottia nidus-avis</i> (L.) Rich.
Penthes	
Sézeznin	
Soral	
O. morio Bécassière	
O. morio Buchillon	
HHBb	
HHB 125	
HHB 128	

Mycorhize:	Orchidée(s) compatible(s):
OMM 125	
OMF 112	<i>Bletilla striata</i> (Thunb.) Reichb. <i>Dactylorhiza fistulosa</i> (Moensch) H. Baumann & S. Künkele, <i>fuchsii</i> (Druce) Soó, <i>maculata</i> (L.) Soó, <i>sambucina</i> (L.) Soó <i>Epipactis palustris</i> (L.) Crantz <i>Gymnadenia conopsea</i> (L.) R. Br. <i>Ophrys apifera</i> Hudson <i>Orchis morio</i> L., <i>militaris</i> L., <i>simia</i> Lam.
OMF 121	<i>Bletilla striata</i> (Thunb.) Reichb. <i>Dactylorhiza fuchsii</i> (Druce) Soó, <i>maculata</i> (L.) Soó, <i>majalis</i> (Reichb.) P. F. Hunt & Summerhayes <i>Epipactis palustris</i> (L.) Crantz <i>Gymnadenia conopsea</i> (L.) R. Br. <i>Ophrys apifera</i> Hudson <i>Orchis morio</i> L., <i>militaris</i> L., <i>laxiflora</i> Lam.

**Tab. 9: mycorhizations effectuées aux CJB.**

Toutes ces mycorhizes ont été testées aux CJB mais celles dont la colonne des compatibilités est vide n'ont pas permis d'obtenir de résultat satisfaisant. Les premières commençant par F ne proviennent pas de la région genevoise et ont été, surtout au début de l'existence du laboratoire, beaucoup utilisées. C'était lorsque aucune mycorhize propre aux CJB n'avait encore été isolée.

Actuellement, le travail se centre de plus en plus sur les mycorhizes de la fin de la liste (à partir de JBG AO) dont la provenance est bien connue du laboratoire. Elles ont toutes été isolées à partir de tissus d'orchidées se trouvant dans la région genevoise. Certaines n'ont pas encore permis d'obtenir de germination (en particulier les HHB) car elles sont trop virulentes et recouvrent entièrement les graines lorsqu'on les inocule. Des essais pour mieux les maîtriser (lumière, températures plus basses) sont en cours de réalisation.

## 5. Discussions–conclusion.

### 5.1. Introduction.

La synthèse de la monographie a, déjà en partie, été traitée dans les fiches de culture. Il semblait, en effet, plus judicieux de discuter des résultats obtenus pour chaque espèce dans sa partie concernée. C'est pourquoi seules une conclusion et des remarques générales seront données ici pour ce qui touche des expériences. Par contre, l'obtention d'orchidées terrestres *in vitro* à partir de semences ouvre d'autres perspectives dont il n'a pas encore vraiment été question dans ce travail. Ce sont la production à but commercial et les réintroductions dans la nature avec pour but la préservation de la biodiversité. Ces thèmes seront donc abordés en guise de conclusion.

### 5.2. Remarques générales sur les résultats obtenus.

Cette synthèse des remarques générales sur les observations faites grâce aux expériences concerne le stade de maturité des graines, les types de prétraitements, les stades de la mycorhization, du repiquage et du sevrage.

Le laboratoire ayant tout juste débuté ses expérimentations (3 ans), les graines sèches représentent la plupart du matériel qui a été semé. Les réels essais pour déterminer le stade optimal auquel germent les graines de chaque espèce n'a vraiment débuté que dans le courant de l'année 2000. Ceci a été réalisé par la pollinisation manuelle ainsi que le comptage des jours suivant cette date. Malgré cette mise en route scientifique de l'expérience, les contrôles de germination n'ont pas pu être effectués assez systématiquement et assez rapidement après les semis, ce qui a empêché la détection à temps des éventuelles germinations ayant pu prendre place.

La nature même du laboratoire en tant que partie du conservatoire, rend difficile l'établissement d'un protocole et de son suivi systématique. La méthode de travail qui devrait être appliquée serait de polliniser manuellement, de prélever des graines à de dates précises et de les mettre directement en culture, puis de contrôler les semis, toutes les semaines qui suivent, voire à des intervalles de temps plus courts. Ce n'est, en effet, qu'en établissant un calendrier précis et en s'y tenant que la durée de germination pourra être déterminée et avec elle, le stade idéal du semis.

Dans l'état actuel des essais, les résultats obtenus au laboratoire ne permettent pas de confirmer ou d'infirmer que l'immaturité des graines faciliterait la germination d'orchidées terrestres *in vitro*. Beaucoup d'infections ont causé la perte du matériel immature et ce n'est que depuis les séries semées en l'an 2000 qu'une méthode de désinfection efficace a pu être appliquée. En ce qui concerne les graines utilisées aux CJB, les semis immatures seraient intéressants à tester sur les graines de *Cypripedium L. sp* (déjà fréquemment réalisé, comme on peut le constater dans la littérature), de *Cephalanthera Rich. sp* et de certains *Orchis L. sp* car ces orchidées n'ont encore rien donné comme germinations au laboratoire.

Mis à part le stade de maturité des graines, beaucoup d'autres questions restent en suspens à propos du semis des orchidées terrestres. Combien de temps peut-on conserver les graines sans qu'elles ne perdent leur pouvoir germinatoire (question essentielle pour un conservatoire)? Quelles sont les conditions idéales dans lesquelles il faut le faire? Et d'un point de vue plus fondamental, que se passe-t-il réellement dans la graine, comment se déroule la

germination? Pourquoi, avant de pouvoir germer, certaines entrent-elles en dormance (quel type de dormance)? Comment pourrait-on lever cette dernière? Les questions plus fondamentales semblent, au premier abord, dépasser le cadre des recherches d'un conservatoire; pourtant, les réponses permettraient de mieux élaborer le protocole de culture de chaque plante. C'est pourquoi, à côté de l'application de méthodes déjà approuvées, il reste intéressant d'explorer les autres facettes de chaque expérience afin d'élucider toujours un peu plus la germination des graines d'orchidées terrestres.

C'est en recherchant des prétraitements différents de ceux que l'on utilise déjà que l'on découvrira peut-être la réponse à la question des dormances. Pour l'instant, on a constaté que tous les traitements de graines, matures ou immatures, ne donnent pas forcément les mêmes résultats chez les différentes espèces. En effet, le pouvoir désinfectant des différents PT n'est pas le même suivant l'espèce d'orchidée testée; cela étant probablement lié à l'épaisseur du testa et à son imperméabilité, ou à la couche d'air se trouvant entre celui-ci et la carapace de l'embryon.

Mais l'utilisation préférentielle d'un des PT concernant la désinfection (la levée de dormance étant moins évidente) a été déterminée pour chaque espèce et constitue maintenant une donnée établie pour le laboratoire. Les semis de l'année 2000 ont, de ce fait, été réalisés avec des graines où cette variante n'a plus été testée sauf dans le cas d'espèces où beaucoup de graines devaient être semées.

La capacité des PT à lever une dormance est, par contre, moins claire car il n'est pas évident quel type de blocage empêche la germination. C'est ici qu'interviennent les semis immatures car ils permettraient, d'après la littérature (Fast *in* Arditti, 1982) d'utiliser des graines dont l'état physiologique serait antérieur à l'installation dans la dormance. Le PT sur ce genre de matériel n'a alors plus qu'un but désinfectant et il ressort des expériences du laboratoire que pour toutes les orchidées terrestres, excepté, le genre *Cypripedium* L. *sp.*, la meilleure façon de préparer les graines immatures à la culture *in vitro* est le PT1. Les «sabots de Vénus», ayant une épaisse capsule, peuvent, quant à eux, supporter le flambage comme aseptisation.

Malgré la détermination d'une méthode de désinfection satisfaisante pour les capsules vertes, la technique de Weiss va être testée avec les prochaines séries de semis car le laboratoire se doit de rester ouvert à de nouvelles méthodes afin d'améliorer continuellement son protocole de travail.

La mycorhization constitue le plus gros et important travail de recherches du laboratoire. Pour que les orchidées à réintroduire aient un pourcentage de réussite maximum au sevrage, elles doivent avoir vécu de manière aussi similaire que possible à leurs conditions naturelles et pouvoir gérer la pression concurrentielle de la flore du sol. Cela se fait indirectement par le biais de l'hétérotrophie puisque, après le fait qu'elles germent plus rapidement, les plantes mycorhizées sont beaucoup plus grosses et vigoureuses que celles qui proviennent de cultures asymbiotiques.

Mais alors, quel est le moment idéal pour mycorhizer? Est-ce avant les semis, comme ce qui se produit dans la nature (ces champignons étant généralement saprophytes et donc continuellement présents dans le substrat), pendant ou juste après? Encore une fois, les spécificités de chaque genre, les expériences n'étant pas en nombre suffisant et les répétitions pas assez systématiques, on ne peut pas affirmer quel est l'optimum.

Par contre, on a constaté que si elle avait lieu après la formation du protocorme, ce dernier pouvait, très souvent, se trouver bloqué dans son évolution. Serait-ce, parce qu'avec la

culture asymbiotique, le protocorme rentrerait dans une certaine voie de métabolisation des nutriments qui rendrait la digestion des hyphes impossible; cette incapacité entraînant à son tour le champignon à être trop fort par rapport à l'orchidée et à l'étouffer complètement? Ou est-ce lié au fait que le mode asymbiotique réduit la production de rhizoïdes des protocormes (Rasmussen, 1995), rendant ainsi l'entrée de la mycorhize dans les tissus plus faible et déséquilibrant de la sorte la digestion par rapport à l'infection? Autre possibilité encore, le développement asymbiotique provoquerait-il une modification de la formation des tissus au sein de l'embryon en atrophiant la fonction digestive, aboutissant de ce fait au parasitisme de la part du champignon? Peut-être ne faudrait-il mycorhizer les protocormes asymbiotiques qu'une fois toutes leurs réserves épuisées, les plaçant ainsi dans une situation de survie et donc propice à l'évolution vers la symbiose?

La capacité à produire des protocormes à partir de graines mycorhizées est un succès pour beaucoup de genres au laboratoire et, logiquement, l'étape suivante du travail consiste à déterminer les mycorhizes compatibles aux différentes espèces. Mais la production asymbiotique devrait continuer dans une moindre mesure afin de procurer du matériel qui pourrait servir à tester toutes les questions posées ci-dessus. Car c'est en comprenant ces blocages que l'on pourra mieux expliquer les liens existant entre la mycorhize et l'embryon ainsi que les événements physiologiques se déroulant lors de la germination.

Un autre stade à déterminer dans la mise en culture des graines d'orchidées terrestres est celui des repiquages. On a constaté au laboratoire que l'idéal était de choisir des protocormes bien formés mais sur lesquels la présence de rhizoïdes n'en est qu'à ses débuts. L'apparition de tissus brunis après l'opération en est ainsi réduite au minimum.

Le deuxième repiquage n'a pas encore bien été testé mais il fait partie des projets futurs. L'avantage en serait l'obtention de plantes plus vigoureuses et capables de mieux survivre au sevrage. Mais avec l'augmentation de la taille de la plantule, ainsi que du nombre de rhizoïdes, ne risque-t-on pas justement d'augmenter la quantité de blessures, et avec elle, l'affaiblissement de la plantule? Inversement, avec la reprise qui a été constatée lors de divers repiquages, peut-on s'estimer assez confiant et dire que le gain en résistance obtenu avec une plantule plus grosse est supérieur à la perte occasionnée par les blessures?

A côté des effets immédiats constatés sur les protocormes, le changement ou renouvellement de milieu permettrait peut-être une stimulation nouvelle de la croissance des tissus. En effet, l'atmosphère et la richesse du substrat dans une boîte de Pétri sont assez restreints et on ne sait pas exactement au bout de combien de temps ils sont épuisés. Or, en gardant les protocormes pendant plus de 3-4 mois dans la même boîte, ne les limite-t-on pas dans leurs apports? Il a souvent été constaté en horticulture, avec les plantes à organe souterrain de réserve, que le rempotage dans un pot à diamètre plus grand redonnait une stimulation à la croissance. Le fait de transférer et de desserrer les protocormes dans des récipients plus grand n'aurait-il pas le même effet *in vitro*? Toutes ces questions ne pourront être élucidées qu'avec la mise en route d'expériences dans les mois à venir car relativement peu d'informations sont encore disponibles à cet égard.

Comme les repiquages, le sevrage ne réussit pas tout le temps; non seulement à cause des conditions extérieures mais également à cause du stade auquel il est réalisé. En règle générale, plus le protocorme est gros, plus son sevrage a de chances de réussir (Fast *in* Arditti, 1982; Mitchell, 1989). Le second repiquage a donc pour but d'obtenir des plantules adéquates à ce passage à l'air ambiant. Mais il faut également tenir compte de la saison à laquelle est fait le sevrage, ainsi que du type de phénologie de la plante.

Aux CJB, la plupart de ces opérations ont été faites quand il y avait des boîtes infectées ou quand les protocormes devenaient trop volumineux pour leur boîte de Pétri (soit aux mois de II, III, IV, X.1999 et III, V, VIII, IX.2000). Aucun réel essai n'a été entrepris pour observer l'effet de la date de sevrage sur sa réussite. Cela est lié au fait que les protocormes sont prêts à des moments très différents, à cause du caractère de conservatoire du laboratoire. Par conséquent, il est difficile de donner des conclusions quant au stade optimal des plantules pour leur sevrage.

On peut cependant constater que sur les 206 pots sortis en 1999, 116 sont toujours présents dans les couches et que 285 des 289 pots sevrés en 2000 s'y trouvent également. Ces nombres sont à interpréter très délicatement car au moment du comptage (12.XII.2000), presque aucune rosette de feuilles (seule indication de la réussite du sevrage) n'était apparente (fig.66 et 67, p 124); des pots contenant des protocormes morts ont donc pu être compris dans le dénombrement. Mais l'entretien des couches est régulièrement fait, donc les pots «vides» l'été précédent ont théoriquement dû être enlevés. Pour faire un inventaire qui soit fiable, il faudra attendre l'arrivée du printemps. On pourra alors dénombrer les plantes sevrées à la période optimale selon Mitchell (1989) et voir si celles sorties à d'autres moments en auront souffert. Ces observations resteront cependant très qualitatives.

Il sera également possible, qualitativement, de se rendre compte de l'effet de la provenance (milieu de semis) des protocormes sevrés et de celui du moment de la mycorhization. L'étiquetage et donc la notation méticuleuse sur toutes les boîtes et récipients contenant des semis prouvent ici toute leur importance. En effet, cette dernière doit comprendre, selon le protocole du laboratoire des CJB: le numéro et la couleur du semis [les listes de graines semées à une même date portent la même couleur et chaque lot de graines différentes (provenance ou genre, espèce) porte un numéro différent], la date du semis et de toutes les opérations postérieures, la mycorhize. Quant au nom de l'orchidée, il est collé sous forme d'étiquette colorée sur la boîte lors d'un contrôle de germination lorsque le stade de développement d'infections est dépassé.

### 5.3. Production à but commercial.

La culture *in vitro* à des fins commerciales est de plus en plus fréquente actuellement (saintpaulias, orchidées exotiques trouvées chez les fleuristes, beaucoup de plantes vertes...). Cette méthode de production permet d'obtenir assez rapidement un nombre très important de plantes. Mais elle diffère de la multiplication des orchidées terrestres décrite dans cette monographie par le fait que c'est une reproduction végétative (boutures, en général) et non générative (semis) qui est pratiquée. L'avantage principal est une production très homogène puisque les plantes sont toutes des clones les unes des autres.

Néanmoins, le semis *in vitro* d'orchidées terrestres pourrait représenter une méthode de production intéressante au niveau de la sélection variétale. En effet, la quantité de graines produites par ces plantes étant généralement très importante, le semis serait de ce fait, une technique simple et bon marché pour obtenir un grand nombre de plantes présentant une vaste palette de diversités et de vigueur. La méthode de propagation végétative traditionnelle (division de bulbes ou de rhizomes) de ces dernières permettrait, par la suite, de produire le matériel homogène pour la vente. Peut-être même, que l'application d'une technique de culture *in vitro* végétative (culture de méristèmes, par exemple) rendrait la production plus importante que de façon horticole (Killgus, 1996) (fig. 74, p 128).

Actuellement cependant, la production d'orchidées terrestres n'en est pas encore au stade de la sélection variétale comme il en va des plantes horticoles classiques (plantes à

massifs, à fleurs, etc... avec des obtentions de lignées F1). Comme ces plantes ne concernent, pour l'instant, qu'un domaine très limité du jardinage (rocailles, jardins alpins), leurs faible représentation et utilisation permettent encore la vente de plantes n'étant pas exactement identiques (Beyrle; communications personnelles, janvier 2001). En effet, ces types de jardins ne sont pas comme des massifs de villes où des figures géométriques sont dessinées à partir de fleurs; imposant, de ce fait, l'utilisation de plantes dont les caractéristiques visuelles doivent être homogènes et connues à l'avance. C'est pourquoi, le semis de graines en laboratoire peut être utilisé comme méthode de propagation efficace et suffisante pour les orchidées terrestres (voir le fascicule «Les orchidées de jardin» de Hiller Jungpflanzen envoyé par l'Agence Horticole Bernau). La sélection qui est alors appliquée est basée sur le calibrage des organes souterrains de réserve, comme l'appliquent Mitchell et Beyrle dans leurs établissements (Beyrle; communications personnelles, janvier 2001) (fig. 70, p 126). Sinon, les techniques de multiplication végétative traditionnelles (et donc surtout en conditions *ex vitro*) restent un moyen beaucoup utilisé [par exemple pour le genre *Cypripedium* L. *sp* (Whitlow, 1983)].

A première vue, la commercialisation et la vulgarisation des orchidées terrestres semblerait être avantageuse car, avec un assortiment vaste proposé au public, on pourrait penser que les intéressés abandonneraient le prélèvement sauvage en nature (Fay, Muir, 1990). Mais, comme le fait remarquer Whitlow (1990), la banalisation de ces plantes est à double tranchant. La production à grande échelle permettrait de faire baisser les prix et donc de rendre ces plantes accessibles à tous. Cela créerait un besoin et une demande de la part des clients à laquelle il ne faudrait surtout pas faillir mais être à même de répondre. Dans le cas contraire, la situation des prélèvements sauvages serait encore aggravée. Mais la banalisation accompagnée d'une éducation adéquate permettrait aussi de rendre le public plus concerné par la protection de ces espèces en danger et ainsi d'éviter les destructions de stations par ignorance (Wood *in* Pritchard, 1989; Farrell, Fitzgerald *in* Pritchard, 1989; Warren *in* Pritchard, 1989; Tasker *in* Pritchard, 1989; Delforge, 1994). En fait, selon cet auteur (Whitlow, 1990), la commercialisation ne pourra jamais totalement enrayer les prélèvements dans la nature et le vandalisme, mais elle peut contribuer à les diminuer significativement.

Avec la production d'espèces d'orchidées rencontrées dans la nature, à grande échelle, les besoins du marché pourraient être satisfaits mais également ceux de la production de «salep» (produit utilisé en cuisine orientale et fabriqué à partir de tubercules d'orchidées) car c'est une des causes principales de prélèvements en nature dans certains pays (Turquie, notamment) (Bournerias, 1997). De plus, les stations disparues pourraient être recrées et celles en régression renforcées. Whitlow (1990) voit deux alternatives possibles pour répondre à la demande de la production commerciale d'orchidées terrestres:

- soit le matériel (graines) est systématiquement prélevé en nature, par des professionnels, sur les individus considérés comme supérieurs, afin de permettre la production à grande échelle de ces mêmes espèces. Les risques encourus alors sont de conserver toutes les difficultés inhérentes à la culture de ces plantes chez les producteurs et les clients, mais surtout d'augmenter le potentiel de mortalité au sein des stations naturelles;
- soit des hybrides entre espèces naturelles seraient créés spécialement pour le commerce. On verrait ainsi, l'offre au client rendue plus vaste et de qualité supérieure en ce qui concerne la vigueur des individus. De plus, les individus naturels ne seraient mis à contribution qu'une fois: pour la création des hybrides, ces derniers offrant par la suite le matériel nécessaire pour la production destinée à la vente.

Aujourd'hui en 2001, le deuxième cas de figure semble correspondre à la réalité. Le laboratoire de Beyrle (communications personnelles, janvier 2001), en Allemagne, produit depuis 1986 des plantons mycorhizés d'orchidées *in vitro* à partir de graines récoltées sur des pieds-mères appartenant à l'entreprise (Beyrle; communications personnelles, janvier 2001). Ces derniers sont de la même espèce que les plantes rencontrées en nature (fig. 68 et 69, p 125;

70 et 71, p 126 et 72, p 127). Mais depuis un an, des nouveautés sont proposées aux clients qui seraient intéressés: ce sont des hybrides interspécifiques en général (par exemple *Orchis coriophora* L. X *O. papilionacea* L.), mais il y a aussi de nouvelles espèces dans l'assortiment (voir la liste provenant du site internet). A la question sur la tendance du marché pour l'achat de ses marchandises, Beyrle explique qu'elle fluctue mais qu'il espère que, dans le futur, elle ira en augmentant. Ce laboratoire parvient à subsister uniquement par sa production d'orchidées et leur achat par des jardinerie en Allemagne.

Actuellement, seules quelques entreprises suisses vendent des orchidées terrestres de nos régions. Ce sont des pépinières et des producteurs de plantes vivaces qui se sont lancés dans cet essai innovant. Le créneau installé est le suivant: production dans des laboratoires de culture *in vitro* en Allemagne (entreprises spécialisées ou amateurs passionnés), vente des plantules à des intermédiaires (marchands grainiers ou producteurs qui ne font que du «jeune planton»), vente à des jardinerie, pépiniéristes ou producteurs de plantes vivaces et finalement, vente aux particuliers.

Ayant contacté les producteurs de plantons, il est apparu que l'achat, en Suisse, d'orchidées terrestres produites *in vitro* n'a commencé qu'il y a 5 à 6 ans en arrière (soit autour des années 1994-1995). Or, la durée nécessaire au dernier maillon de la chaîne pour obtenir des plantes qui soient vendables, est de 2 ans. Théoriquement, cela devrait faire 3 à 4 ans que ces plantes sont disponibles sur le marché, mais il est, aujourd'hui, très rare d'en rencontrer. La plupart du temps, les orchidées terrestres sont échangées ou vendues au sein de clubs privés de personnes passionnées par ces plantes. On ne les trouve donc pas dans les commerces habituels.

Les deux producteurs suisses romands derniers maillons de la chaîne, Schilliger («Schilliger Garden Centre SA») et Menneret («Pépinière de Vézenaz»), trouvés en faisant des recherches auprès des intermédiaires, n'ont jusqu'à ce jour, vendu que très peu de cette marchandise. En effet, l'un achète ses plantes toutes prêtes à la vente et ne s'est pas lancé dans la culture de celles-ci (risques trop élevés de pertes d'argent dues à l'entreposage, les soins et les maladies pouvant survenir), l'autre les a achetées l'année passée sous forme de plantons nécessitant encore 2 années de culture pour atteindre le stade de plantes finies. Il reste donc encore un an de croissance à ces dernières avant d'être mises sur le marché.

Malgré une certaine réticence à partager leurs données commerciales, ces commerçants ont permis de dresser un profil du marché suisse romand des orchidées terrestres. Les clients intéressés sont en général des amateurs avertis, ayant une certaine notion de l'orchidophilie et à qui la présence de ces plantes dans l'assortiment ne passe pas inaperçue.

Il faut notamment savoir que les prix de ces orchidées ne sont pas très attractifs, pour deux raisons: la relative faible production, comparée à d'autres plantes vivaces (100000 plantes/an sont produites par le laboratoire de Beyrle, communications personnelles, janvier 2000) et la spécialisation que demande le travail de laboratoire. La fourchette de prix que les clients peuvent rencontrer s'étale entre 30 et 50 francs suisses la plante. Le producteur, quant à lui, paie la plantule qui doit encore passer 2 à 3 ans en culture, entre 10 et 20 francs, alors que s'il l'achetait à la sortie du laboratoire, sa valeur oscillerait entre 5 et 10 francs (Menneret; Morel de chez Schilliger, communications personnelles, décembre 2000).

Les informations recueillies chez les intermédiaires «Wyss Samen und Pflanzen» (CH), «Hiller Jungpflanzen» (D) et «Agence Horticole Bernau» (F), en remontant le créneau de ventes des orchidées terrestres, permettent de dresser une image semblable du marché (plutôt européen, cette fois-ci): très peu de producteurs ne leur passent de commande pour ce type de plantes (fréquence de 1 sur 100, pour l'«Agence Horticole Bernau»), en général ce n'est même

qu'une seule entreprise cliente qui le fait (chez «Wyss Samen und Pflanzen»), et la quantité demandée est de l'ordre de la centaine (100 par «Schilliger», 250 par Menneret et 1000 chez «Wyss Samen und Pflanzen»).

Quant à la question comment les producteurs suisses romands voient l'avenir pour les orchidées terrestres, la réponse est plutôt défavorable. En effet, Menneret pense abandonner cette culture qu'il avait essayée uniquement par curiosité, car il ne voit pas comment il va pouvoir écouler son stock. Chez «Schilliger» par contre, on continuera chaque année à commander des orchidées terrestres prêtes à la vente mais dans un très petit nombre, juste pour pouvoir les présenter dans l'assortiment de la jardinerie (car sur les 100 plantes achetées par an, seules 30 à 50 d'entre-elles sont réellement vendues). Selon ces commerçants, les orchidées terrestres resteront des plantes pour des amateurs avertis du fait de leur trop grande spécialisation et de leur prix trop élevé.

L'assortiment disponible en Suisse est restreint aux genres *Dactylorhiza* Nevski *sp* [hybrides de *D. incarnata* (L.) Soó, *maculata* (L.) Soó, *majalis* (Reichb.) P. F. Hunt & Summerhayes et *purpurella* (T. & T. A. Stephenson) Soó] et *Epipactis* Zinn *sp* (hybrides de *E. gigantea* Douglas ex Hooker *sp*). La proportion de ventes pour chacun de ces genres est de 2/3 de *Dactylorhiza* Nevski *sp* pour 1/3 de *Epipactis* Zinn *sp* vendus (Morel de chez «Schilliger», communications personnelles, décembre 2000).

Le terme d'«hybride» étant employé, cela signifie que les graines pour effectuer les semis en laboratoire sont obtenues en contrôlant la fertilisation de ces plantes (pollinisation manuelle; Beyrle, communications personnelles, janvier 2001): *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soó X *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soó, par exemple. Ceci expliquerait pourquoi les orchidées proposées peuvent présenter quelques variations au sein de la même espèce (fig. 72, p 127).

Aux Etats-Unis où le commerce de ce type de plantes semble être plus commun, l'assortiment est plus large. En effet, on y trouve des *Platanthera* L. C. M. Richard *sp*, des *Calopogons* *sp* (Coleman, 1996), des *Disas* Bergius *sp* et beaucoup de différents *Cypripediums* L. *sp* (Coleman, 1996; roses, rouges ou blancs, Vincent Reynaud de chez «Wyss Samen und Pflanzen», communications personnelles, décembre 2000) mais ceci est peut-être aussi lié au fait qu'il en existe, là-bas, plus d'espèces indigènes. En Europe (sans prendre en compte la Suisse), l'offre d'orchidées terrestres comprend les genres *Bletilla* Richb. F. *sp*, *Cypripedium* L. *sp*, *Dactylorhiza* Nevski *sp*, *Disa* Bergius *sp*, *Goodyera* R. Br. *sp*, *Himantoglossum* Koch *sp*, *Liparis* Rich. *sp*, *Neottianthe* Schlechter *sp*, *Ophrys* L. *sp*, *Orchis* L. *sp* et *Serapias* L. *sp*. Mais ces données ont été trouvées sur internet, sur les sites de producteurs dits «de plantes finies» (en fait, le dernier maillon de la chaîne), et il est, malheureusement, difficile de déterminer si ces dernières proviennent de cultures *in vitro* ou de multiplication traditionnelle.

A sa connaissance, Beyrle (communications personnelles, janvier 2001) avance les noms de *Cypripedium* L. *sp* (USA, Canada, Allemagne et Suède), *Paphiopedilum* Pfitzer *sp* (dans le monde entier) et d'*Anacamptis* Rich. *sp*, *Orchis* L. *sp* et *Ophrys* L. *sp* (chez lui et peut-être en France et en Angleterre) en ce qui concerne la production *in vitro*. De ce fait, l'assortiment réellement issu de laboratoires et qui puisse être pris en compte pour l'étude commerciale menée ici, se borne aux deux genres *Dactylorhiza* Nevski *sp* et *Epipactis* Zinn *sp*. Grâce aux informations livrées par Beyrle (communications personnelles, janvier 2001), il semblerait en effet, qu'il existe deux types de marché pour les orchidées terrestres: le commerce pour le grand public avec l'assortiment restreint décrit ci-dessus, et celui au sein de la communauté d'amateurs où la diversité est nettement supérieure (voir la liste de plantes produites par son laboratoire).

Contrairement à ce que l'on pourrait penser, la mauvaise vente d'orchidées en Suisse n'est pas du tout liée aux difficultés culturales que le producteur pourrait rencontrer. En consultant le producteur Menneret, les fascicules envoyés par «Hiller Jungpflanzen» et l'article de Killgus (1996), on constate que c'est une culture simple, ne demandant que très peu de maintenance.

Les plantes mycorhizées sont livrées de mai à juin en pots T6 (godets de 6 cm de diamètre, dans le haut du récipient), à raison de 28 pots par plateau. Elles doivent être immédiatement repotées: en T10 à T12 pour *Dactylorhiza Nevski sp* et en T11 pour *Epipactis Zinn sp*. Cette fourchette de tailles permet un bon contrôle de l'humidité dans la motte et évite les surchauffes de cette dernière en période estivale.

Le substrat utilisé doit être bien aéré et riche en substances nutritives, trois variantes sont proposées par «Hiller Jungpflanzen»:

- mélange de substrat pour cultures en pots et d'argile expansée (jusqu'à 4 mm de diamètre) ou de «Seramis»
- mélange de terreau ou d'un autre substrat perméable et désinfecté avec 10% à 20% de tourbe et d'argile expansée chacune
- mélange de «Toresa-Special» [«Toresa» est un substrat de substitution à la tourbe, à base de fibres de bois; Beyrle (1996)] avec de l'argile expansée ou du «Seramis».

Beyrle, après de nombreux essais en collaboration avec «Intertoresa AG», recommande un substrat spécifiquement élaboré pour les orchidées mycorhizées appelé «Toresa Orchideenkultursubstrat» (voir son site internet). Mais plus généralement, il conseille que le substrat soit pauvre en sels, stable de structure, humifère, perméable à l'eau et à l'air. La valeur du pH doit se situer entre 6 et 7. Comme exemples, il propose:

- TKS 1 (substrat tourbeux fertilisé au degré 1 de l'échelle de Penningsfeld) et argile expansée moulue (grosseur comprise entre 0 et 2)
- «Toresa» et argile expansée moulue (grosseur comprise entre 0 et 2).

Les proportions de ces composantes sont de 1:1 pour les plantes de pelouses sèches, de 3:1 pour les plantes de lieux humifères et de 2:1 pour les autres orchidées. Il recommande également de repoter les cultures en pots tous les ans.

Schmidt, un autre producteur d'orchidées *in vitro*, utilise comme substrat un mélange qu'il a élaboré lui-même et qui est composé de poudre d'os, de tourbe et de gravier calcaire auquel du charbon de bois est additionné. Il s'en sert plus particulièrement pour le genre *Epipactis Zinn sp* produit dans son entreprise (Killgus, 1996).

Les plantes sont ensuite entreposées en couches froides ou sous châssis pour être maintenues en croissance afin qu'elles puissent former les nouveaux organes de réserve ainsi que les organes floraux. Le microclimat idéal pendant cette phase est une humidité constante de l'air et de la motte sans pour autant qu'il n'y ait d'excès d'eau ou de sécheresse. Pendant l'été, un ombrage contre les rayons directs du soleil s'avère en général nécessaire.

Quatre semaines après l'empotage, 1<sup>0</sup>/oo d'engrais complet peut être apporté toutes les 3 à 4 semaines, en veillant à ne pas dépasser les 0.75 kg d'engrais complet par m<sup>3</sup> de substrat. L'année suivant le premier hivernage, la fertilisation doit commencer avant le bourgeonnement, dès le mois d'avril. Beyrle recommande d'apporter 0.2 g/l d'engrais («Peters Excell», «Kristalon Red» ou autres) dans l'eau d'arrosage ou plus généralement 0.05% d'engrais pour orchidées (Beyrle, 1996) mais toujours pendant la période de croissance active des plantes (Beyrle, site internet, 2001).

L'hivernage se passe en couche froide ou avec une protection contre le froid (non-tissé ou nattes de paille). Il est important pendant cette phase que les plantes soient bien ancrées dans le sol et qu'elles soient protégées par un ombrage contre les rayons du soleil (ces derniers provoquent, en effet, des dégâts lorsque les feuilles sont gelées). Les *Epipactis Zinn sp* bourgeonnent dès mars et sont prêts à la floraison de mai à juillet, alors que les *Dactylorhizas Nevski sp* doivent encore être maintenus un hiver supplémentaire pour fleurir l'année suivante entre mai et juillet.

La culture ne présente pas beaucoup d'ennemis, si ce ne sont les limaces très friandes des feuilles d'orchidées (fig. 73, p 127) ou les nématodes. Plus rarement, il peut arriver que les plantes subissent une attaque de sciarides ou de pucerons. Contre les premiers ravageurs, on déposera des granulés anti-limace autour de la culture et on prendra soin d'utiliser un substrat désinfecté à chaque repotage; contre les seconds, on fera appel soit à des insectes entomophages soit à des insecticides. Quant aux maladies (cryptogamiques, bactériennes ou virales), aucune n'a été constatée pour le moment (Heinrichs, 1996).

L'entreprise de Menneret (communications personnelles, décembre 2000) a plus ou moins appliqué ces recommandations:

- emploi de substrat pour plantes acidophiles additionné de polystyrène expansé, de «Toresa» et d'«Osmocote» 12-14 mois (engrais en granulés à libération lente s'étalant sur une durée de 12 à 14 mois) à raison de 0.5 g/l lors de l'empotage,
- culture sur une surface composée d'un anticontaminant («Bidime», toile retenant seulement les composantes du sol mais pas l'eau et les sels minéraux) et d'une toile tissée,
- culture sous une ombrière.

Le succès minime que rencontrent les ventes d'orchidées trouve donc son origine plutôt dans le faible intérêt (par méconnaissance) porté par la clientèle de particuliers que dans un quelconque obstacle rencontré lors de la culture. A l'heure actuelle, ces plantes ne semblent pas (pour la Suisse romande) avoir de réelle prise sur le marché. Ailleurs, surtout dans les régions germanophones où l'aménagement de jardins de rocailles est plus populaire, les orchidées terrestres ont plus d'adeptes. Mais ce marché reste toujours restreint. Finalement, le domaine le plus concerné par la culture de ces plantes reste la recherche effectuée dans les institutions de conservation botanique.

#### 5.4. Conservation et réintroductions.

Tout le travail de recherches effectué au laboratoire des CJB sur les semis d'orchidées terrestres a trois finalités:

- la multiplication de ces plantes pour l'usage dans le Jardin Botanique lui-même,
- l'offre de matériel végétal pour les réintroductions futures dans la nature,
- l'approfondissement des connaissances scientifiques dans ce domaine.

A l'origine, le laboratoire des CJB a été créé pour permettre la multiplication de plantes difficiles ou impossibles à multiplier par des méthodes traditionnelles, en particulier celles qui se trouvaient dans le Jardin Botanique [comme c'est le cas à Kew; Fay, Muir (1990)] (fig. 74, p 128). En effet, malgré les soins méticuleux apportés par les jardiniers, il arrive parfois qu'une plante du Jardin Botanique disparaisse. Cela peut être dû à son vieillissement, à une maladie ou à un acte de vandalisme venant du public. Afin de ne pas voir diminuer la diversité qui existe au Jardin Botanique, il faut être à même de remplacer les individus disparus. Le laboratoire remplit ainsi une fonction essentielle dans le remplacement de ces plantes et dans le maintien des

collections. Indirectement, il contribue donc à la vulgarisation de la diversité qui règne au sein de la botanique (le rôle de ce type de jardins étant didactique).

Afin de mieux valoriser son infrastructure, le champ d'application du laboratoire a été étendu à la propagation de plantes pour la conservation. Or, depuis le 16 janvier 1991, la plupart des orchidées terrestres sont des plantes protégées en Suisse par la loi [Ordonnance sur la Protection de la Nature et du paysage (OPN) RS 451.1 dans Reinhard *et al* (1991)]. En Europe, elles le sont depuis le 1<sup>er</sup> janvier 1983, mais en 1989, un amendement du règlement a permis la production commerciale de ces plantes sous certaines conditions (Pfinder, 1996). Comme la seule méthode de multiplication donnant des résultats positifs et étant intéressante pour le maintien de la biodiversité est de les semer en laboratoire [Fay, Muir (1990); Johansen, Rasmussen (1992); Zettler, Mcinnis (1992)], ces plantes ont donc été choisies comme matériel végétal expérimental. Depuis la décision de ce choix, le travail s'est principalement axé sur le thème des orchidées terrestres, mais tout autre végétal à protéger et se multipliant difficilement de manière traditionnelle {donc auquel la culture *in vitro* présente une alternative intéressante [Fay, Muir (1990)]} y trouve également sa place [comme ce qui se fait à Kew; Fay, Muir (1990)].

A l'heure actuelle, aucun projet de réintroduction de plantes disparues, au niveau national, n'a déjà été entrepris. Mais, étant donné les menaces qui pèsent sur certaines espèces [voir la liste rouge établie par l'IUCN pour la flore mondiale et celle faite par Landolt (1997) pour la Suisse, ainsi que les lois concernant le transport d'espèces en danger: Convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvage menacées d'extinction ou CITES; Knees *in* Pritchard (1989) (fig. 75, p 128)] et la connaissance grandissante dans le domaine de l'écologie et des réintroductions de par le monde, les structures nécessaires en Suisse se mettent en place afin que bientôt, on soit à même de commencer un programme.

L'IUCN (fig. 75, p 128) est une organisation non gouvernementale qui a été fondée en 1948 avec pour mission d'encourager et d'aider les différentes sociétés de par le monde, à conserver l'intégralité et la diversité de la nature. Elle doit aussi s'assurer que tout usage de ressources naturelles soit équitable et écologiquement supportable.

Cette ONG (Organisation Non-Gouvernementale) a édité en 1997 une liste classant toutes les plantes encourant un risque d'extinction en «catégories de menace». Ces dernières représentent 12.5% des plantes vasculaires mondiales: c'est la liste rouge dont il est question ci-dessus (site internet IUCN). Comme la Suisse est membre de l'IUCN, elle se doit donc de protéger les espèces menacées croissant sur son territoire.

Afin d'y contribuer, la Commission Suisse pour la Conservation des Plantes Sauvages (CPS) a été créée en 1991 (fig. 75, p 128). Son but est de promouvoir la conservation de la diversité génétique des plantes sauvages de Suisse. La CPS agit dans le cadre des lois nationales et des conventions internationales et ses activités contribuent à la mise en application de la Convention sur la diversité biologique (Convention de Rio, Nations Unies - 1992). Comme les jardins botaniques en Suisse sont membres de la CPS, les CJB de Genève en font donc également partie.

L'outil principal de cette commission est la liste rouge de l'IUCN mais à l'échelle nationale, il existe aussi un inventaire semblable: c'est la liste rouge de Landolt (1997). Comme la situation écologique évolue constamment, il est évident que des remises à jour sont nécessaires. C'est pourquoi l'Office Fédéral de l'Environnement, des Forêts et du Paysage (OFEFP) a chargé le Centre du Réseau Suisse de Floristique (CRSF) de renouveler l'édition de cette liste pour le courant de l'année 2001, cette fois-ci en tenant compte des nouvelles

catégories de menace de l'IUCN (site internet CPS). Le CRSF (fig. 75, p 128) est une fondation de droit privé (créée en 1993) dont le but essentiel est de développer et de gérer une banque de données performante, réunissant des informations sur la flore suisse (site internet CRSF).

On constate donc que tout un réseau s'organise à l'échelon national pour que, bientôt, de concert avec les organisations existant dans le reste du monde, des programmes de réintroductions puissent être entrepris. C'est ainsi que le travail et le matériel végétal obtenus aux CJB pourront remplir leur fonction.

Il faut aussi savoir que les réintroductions en nature {que ce soient des renforcements de stations encore existantes ou des créations de nouvelles stations [voir l'exemple donné dans Farrell, Fitzgerald *in* Pritchard (1989)]} sont des entreprises complexes qui ne demandent pas seulement l'obtention de plantes, mais également tout un travail de recherche préalable (analyse de la situation), et qui peuvent être lourdes de conséquences.

En effet, lorsqu'une espèce végétale disparaît d'un milieu, ce dernier évolue vers un nouvel équilibre. Si, après un laps de temps plus ou moins important, on réintroduit l'espèce disparue, celle-ci peut alors se révéler totalement inadéquate au nouvel écosystème en place. Dans le meilleur des cas, elle ne résistera pas à la pression de sélection de ce dernier et finira par s'évanouir de nouveau. L'opération n'aura eu comme seule conséquence la perte de temps et d'argent pour ses organisateurs. Dans le pire des cas, au contraire, c'est l'espèce qui envahira le nouveau milieu, avec pour résultat la disparition d'autres plus vulnérables. On aura alors contribué à l'extinction de plusieurs espèces pour la réintroduction d'une seule dans une station (voir également la remarque à propos des hybrides de Beyrle dans les explications délivrées sur son site internet).

On comprend, dès lors, l'importance:

- du rôle joué par les organismes spécialisés dans la protection et l'étude de l'environnement,
- de la communication et de la coordination entre les différentes instances (nationales et/ou extérieures au pays) chargées de surveiller l'équilibre naturel local et mondial,
- de l'échange entre les milieux scientifiques chargés des recherches sur le terrain et dans les laboratoires.

Ces raisons expliquent la lourdeur de la mise en place d'un programme et la lenteur des prises de décision quant il s'agit de réintroduire une espèce disparue dans un milieu naturel.

Finalement, le dernier rôle que remplit le travail sur les semis d'orchidées terrestres au laboratoire des CJB est celui de contribuer à la recherche fondamentale («recherche théorique sans but d'application directe»; Petit Larousse Illustré, 1984) en physiologie et biologie végétales. Curieusement, ces domaines touchant les orchidées terrestres n'ont que très peu été développés et beaucoup reste encore à découvrir. Toutes les connaissances apportées par les expériences en laboratoire permettent de mieux comprendre comment se déroule le développement des orchidées et ainsi, de mettre en évidence les liens que ces plantes entretiennent avec leur environnement. Indirectement, ces connaissances contribuent donc à affiner les programmes de protection de stations naturelles et les procédures de réintroductions.

A un niveau plus pratique, la technique des semis *in vitro* doit encore beaucoup être expérimentée. Le but étant, au final, d'être capable, en situation d'extinction d'une espèce, au moins de la maintenir en conditions de laboratoire, voire de la multiplier correctement pour la réintroduire. Mais il ne faut pas se leurrer, toute disparition d'individu a pour conséquence la perte d'une partie de patrimoine génétique de la population. Si l'on est peut-être capable de reconstituer toute une population à partir de quelques individus, on ne recréera pas la diversité qui existait au sein de celle d'origine. Il en résulte une nouvelle communauté moins riche/diverse et donc moins apte à survivre aux aléas et aux modifications du milieu (Zettler,

Mcinnis, 1992). Heureusement, la variabilité existante à ce moment n'en restera pas là, elle évoluera de nouveau mais dans une nouvelle direction. Toutefois, le temps nécessaire pour revenir à une taille semblable à celle d'origine est celui que suit toute évolution naturelle dans la nature, c'est-à-dire très long.

### 5.5. Exemples concrets de réintroductions.

Afin d'illustrer le thème des réintroductions d'orchidées en nature, deux exemples trouvés dans la littérature sont exposés dans ce chapitre. Ils permettent de rendre compte du travail à fournir et des précautions à prendre, expliqués ci-dessus. De plus, comme ce sont des expériences réussies, leur mise en avant apporte une note d'optimisme pour le futur en prouvant que l'extinction de plantes n'est pas une fatalité mais que, par la volonté et l'organisation scientifique, on peut réussir à freiner le phénomène de disparition, voire l'inverser. Le succès de ces opérations ne se borne pas seulement à la réimplantation de plantes mais il contribue également à étoffer de manière substantielle les connaissances dans le domaine des techniques de réintroductions et des interactions au sein de biotopes (dynamique des populations, phytosociologie...).

Malgré le fait qu'il ne s'agisse pas de réintroduction à partir de plantes issues d'*in vitro*, l'expérience de la AHO («Arbeitsgemeinschaft Heimische Orchideen») du Land de Schleswig-Holstein (D) mérite d'être mentionné (Reinecke, 1993). En effet, les études préliminaires et les conditions sous lesquelles ces réintroductions en nature ont été effectuées sont les mêmes que si les semis avaient été réalisés au laboratoire.

A côté des actions de préservation de stations naturelles d'orchidées, la AHO s'est fixée comme mission complémentaire de réintroduire ces plantes menacées, mais aussi d'autres genres en voie d'extinction, dans leur milieu naturel. Afin d'éviter toute erreur écologique, elle s'est composée un «code de déontologie» avec pour lignes directrices les recommandations de l'«Akademie für Naturschutz und Landschaftspflege» (A-8229 Laufen/Salzach, Postfach 61). Quelques-unes de ces conditions sont:

- le soutien préférentiel de nouveaux sites créés, sur celui de plantations aussi semblables naturelles soient-elles,
- le semis de plantes uniquement dans des lieux appartenant à leur aire de répartition naturelle,
- un contrôle et un suivi scientifiques.

En plus de ces dernières, la AHO a documenté méticuleusement ses travaux et a impliqué, par le contrôle, l'institution citée ci-dessus ainsi que le «Botanischen Institut der Universität Kiel».

Dans un premier temps, une recherche bibliographique a été faite pour savoir quelle était l'aire de répartition originale de l'orchidée à réintroduire [*Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br.] et quelle était la flore qui l'accompagnait.

Ensuite, est venue l'analyse sur le terrain d'un spécialiste, pour faire l'état des lieux de la flore présente à ce moment. Celui-ci a conclu que des mesures d'entretien ainsi que la réimplantation du biotope d'origine n'étaient pas d'intérêt. Des études, du point de vue pédologique, géographique et hydrologique, ont accompagné cette analyse.

Finalement, le semis de graines provenant d'un conservatoire botanique («Botanischer Garten Oldenburg») a été réalisé. Afin d'optimiser ce dernier, les graines matures avaient été mélangées à du sable fin, lavé et séché, pour éviter la formation de grumeaux et ainsi faciliter le glissement des graines entre les doigts du semeur (semis à la volée). Les proportions de deux constituants du mélange étaient de 2 cm<sup>3</sup> de graines pour 8 litres de sable. Le semis a eu lieu par

temps calme (minimum de vent), soit avant, soit pendant une averse afin que les graines soient aussi rapidement que possible dans les conditions optimales de germination.

Mais la réintroduction ne s'est pas terminée sur cette action. En effet, le suivi scientifique était indispensable pour que les opérations futures similaires puissent bénéficier des observations et pour permettre l'étude de la dynamique des populations de cette espèce. Un programme de comptage des rosettes, du nombre de hampes florales, du nombre de feuilles par rosette a été mis en place pour les années suivantes, sur des échantillons de terrain du site.

Selon les scientifiques dans ce domaine, une première floraison de 5 à 10% pouvait être prise comme référence pour déterminer l'adéquation du biotope aux graines. Or ce taux avait effectivement été atteint lors de cette opération: la première année, à peu près 25% des plantes avaient été dénombrées en fleur, ce qui plaçait donc cette réintroduction au rang des succès. Malheureusement, les années suivantes, les plantes ont subi des attaques d'origines diverses, ce qui a empêché le suivi du plan. On a cependant cherché à déterminer la nature des dégâts constatés. Celle-ci se composait: de prélèvements sauvages d'amateurs ou de connaisseurs (discernable par l'état des trous de prélèvement), du pâturage par le gibier, de dégâts dus aux escargots et d'attaques fongiques.

Dans le but de rendre pérenne cette station réaménagée, un programme d'entretien a été entrepris. Mais cette partie du travail ne se passe, en général, pas sans difficulté car il y a souvent des intérêts divergeants entre les protecteurs de la nature et les propriétaires des terrains. Pour cette station aussi, un compromis a dû être trouvé.

Le deuxième exemple de réintroduction concerne les talus d'autoroute en Alsace (F) (Frey, 1996). C'est, en premier lieu, sous l'impulsion du «Conservatoire des Sites Alsaciens» que toute une palette de plantes (orchidées et autres) dont l'avenir était incertain dans la région, avait été semée. Malgré un résultat positif pour beaucoup d'espèces, certaines ne se sont pas développées du tout, comptant, parmi elles, les orchidées. C'est ainsi que, dans un deuxième temps, de l'aide fut demandée aux spécialistes en orchidophilie Samuel Sprunger et Robert Mitchell pour tenter une plantation d'orchidées. Cette fois-ci, des plantes issues de semis *in vitro* et d'espèces menacées dans la région allaient être utilisées (notamment *Orchis pallens* L.). Des essais de ce type avaient, en effet, été réalisés auparavant, avec succès, par Sprunger grâce à des plants d'*Orchis morio* L. provenant de culture de laboratoire.

Afin d'optimiser l'expérience, le choix des sites et du matériel végétal ont été méticuleusement sélectionnés et des critères strictes imposés. Les plantes devaient être issues d'individus établis dans les environs des nouvelles stations et compter un effectif suffisamment fourni pour subsister à la sélection naturelle. Quant aux sites, leur milieu devait être secondaire (c'est-à-dire être une «formation végétale, non originelle, liée à l'action de l'homme»; Petit Larousse Illustré, 1984) sans avoir encore atteint sa garniture complète d'espèces, il ne devait pas constituer un milieu ancien ayant gardé sa végétation d'origine, il devait pouvoir jouir d'une garantie de pérennité et la gestion du site devait se faire selon un plan décrivant la gestion financière, les moyens mis en œuvre et le suivi à effectuer.

Plusieurs prélèvements de graines durent être réalisés avant de pouvoir satisfaire aux conditions nécessaires à Mitchell pour produire les orchidées (notamment en ce qui concernait la maturité des graines). Malheureusement, un problème au niveau de la mycorhization (mycorhize inadéquate) a empêché le producteur d'obtenir le résultat escompté. C'est pourquoi, une autre espèce fut choisie: *Orchis palustris* Jacq., également en situation précaire dans la région. Toutes les étapes précédant la culture *in vitro* furent cette fois contrôlées afin que tous les facteurs jouent en faveur de la réussite de l'expérience. Ceci concernait en particulier la

pollinisation manuelle et le décompte des jours permettant l'obtention de matériel à maturité optimale à la germination. Le travail de Mitchell fut un succès et les plants furent mis en attente de la bonne saison pour réaliser leur sevrage (au moment de l'écriture de l'article).

Ayant pris contact téléphoniquement avec Sprunger le 29.I.2001 pour connaître l'état de la situation à cette dernière date, des précisions concernant cette réintroduction peuvent être apportées. Malgré tous les soins apportés par toutes les parties, la réimplantation d'*Orchis palustris* Jacq. n'a tenu qu'une seule année. En effet, les plantes ont fleuri une saison puis ont disparu. Cette opération ne peut cependant pas être vue comme un échec car des raisons extérieures aux personnes impliquées sont responsables de la disparition de la plante à cet endroit. En effet, les années suivant la réimplantation, des travaux sur ces talus d'autoroute ont provoqué l'assèchement du sol entraînant ainsi la modification du biotope. Or, comme son nom l'indique, cette orchidée se développe dans des milieux humides, ce qui explique sa disparition constatée les saisons suivantes.

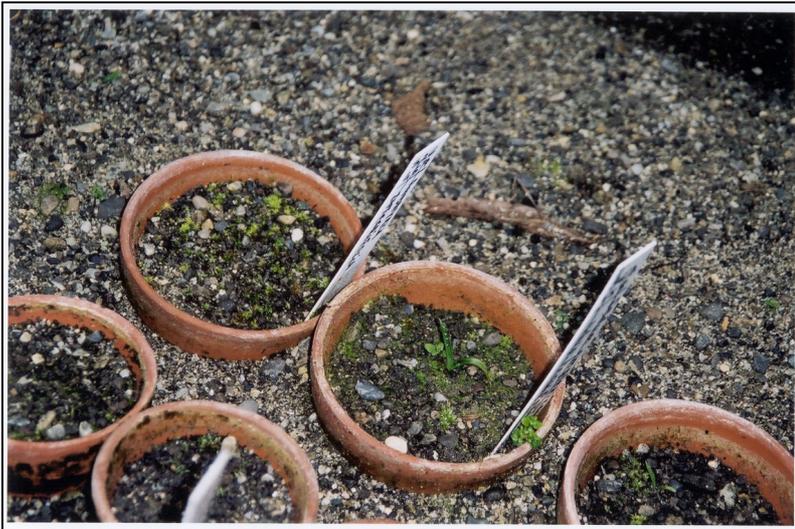
Par contre, Sprunger continue ses expériences de plantations sur les talus de l'autoroute en direction de Bâle (CH) et obtient des résultats tout à fait satisfaisants. Il utilise comme matériel végétal des *Orchis morio* L., *Ophrys apifera* Hudson et *holosericea* (Burman f.) Greuter, *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó, *incarnata* (L.) Soó et *fuchsii* (Druce) Soó ainsi que des *Anacamptis pyramidalis* (L.) Rich. et travaille toujours en collaboration avec Mitchell. En effet, il s'occupe de récolter les graines qu'il envoie à Mitchell, celui-ci les fait germer *in vitro* (avec mycorhization) et les sèvre. Après une année de culture chez lui, Mitchell renvoie les plantules vers leur lieu d'origine où Sprunger les garde jusqu'à leur première floraison. Cette étape marque leur entrée dans l'âge adulte et par là le moment adéquat à leur plantation. Chaque année, ce sont donc 1000 plantes qui suivent cette voie de réintroduction.

L'avantage de cette méthode est que les graines produites sur le site servent à deux buts: l'approvisionnement en graines de la culture *in vitro* mais également le réensemencement naturel des talus. Ainsi, seules les orchidées provenant de cette station sont utilisées dans ce projet et aucun apport de diversité génétique extérieur n'est fait. La biodiversité existant sur ces talus et son évolution sera alors spécifiquement originaire de cet endroit.

En ce qui concerne *Orchis pallens* L., le projet de réintroduction n'est pas abandonné, mais des expériences de germination sont menées depuis un an, dans un laboratoire spécialement créé à cet effet. Pour l'instant, l'étape de réintroduction est donc en attente de matériel sevré mais peut-être verra-t-on dans le futur réapparaître cette espèce d'orchidées dans la région des «Trois Frontières» (Bâle-Fribourg-Mulhouse).



**Fig. 66** Couche de culture des plantules sevrées aux CJB (II.2001).



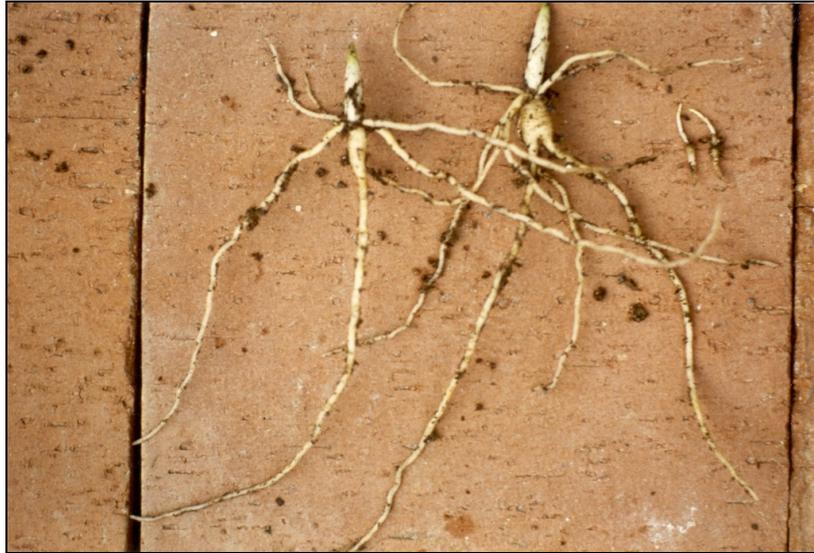
**Fig. 67** Plantules sevrées aux CJB (II.2001).



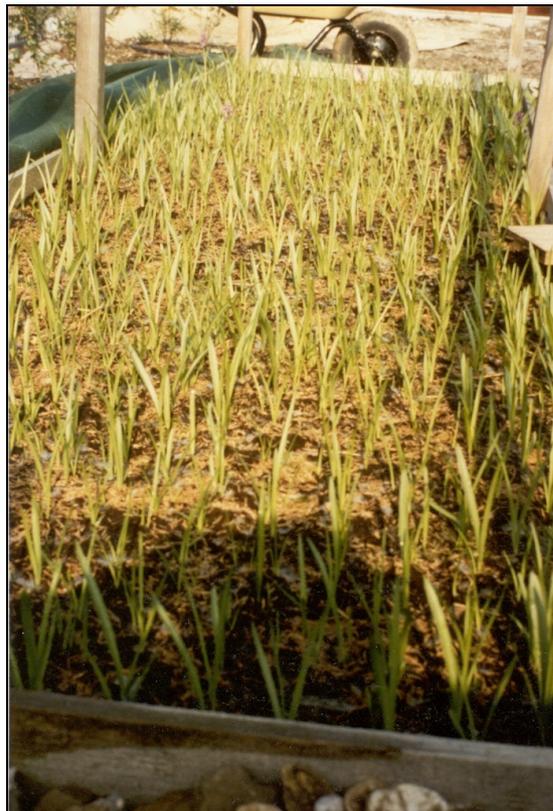
**Fig. 68** Protocormes de *Dactylorhiza*, 6 semaines après le semis (H. Beyrle).



**Fig. 69** Plantule de *Dactylorhiza* avec bourgeon formé, 5 mois (H. Beyrle).



**Fig. 70** Plantes sélectionnées sur la taille de l'organe souterrain, *Dactylorhiza incarnata* de 2 ans (H. Beyrle).



**Fig. 71** Culture de *Dactylorhiza incarnata* âgée de 2 ans (H. Beyrle).



**Fig. 72 Culture de *Dactylorhiza incarnata* âgée de 3 ans (H. Beyrle).**



**Fig. 73 Dégâts causés par les escargots sur *Ophrys apifera* (CJB, II.2001).**

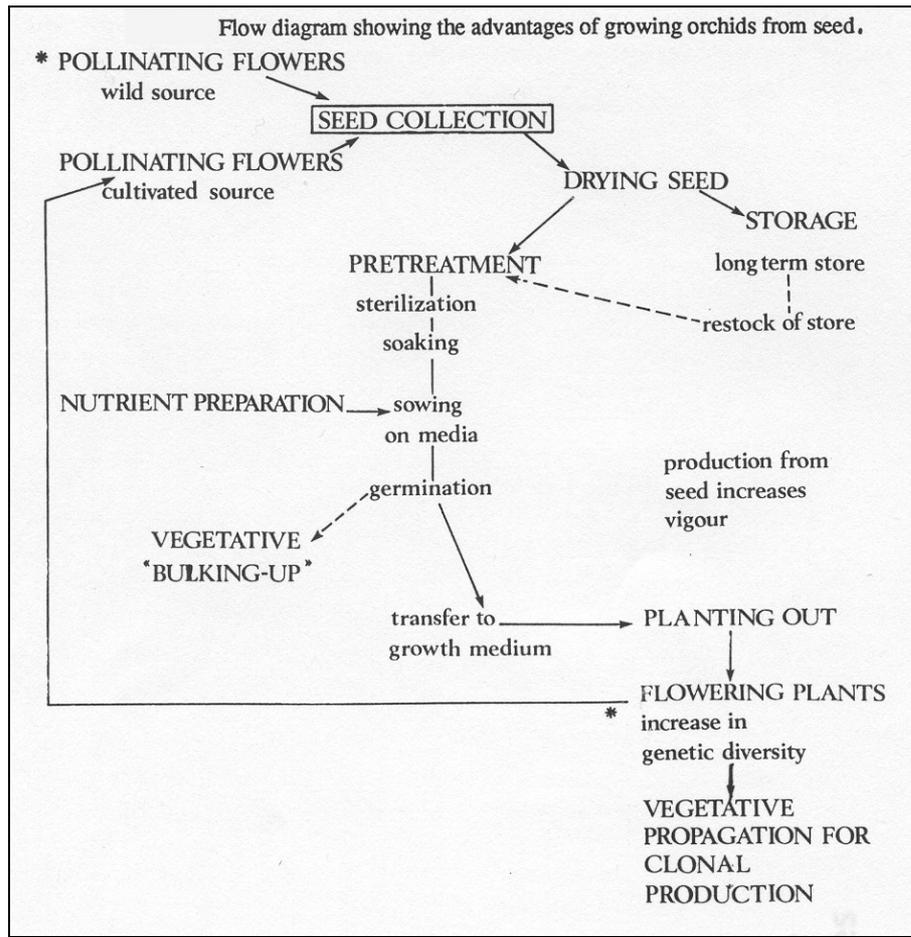


Fig. 74 Diagramme récapitulatif des possibilités offertes par le semis.



**Fig. 75 Sigles des différentes organisations citées.**

**Bibliographie.**

Aeschimann D., Burdet H. M., Flore de la Suisse et des territoires limitrophes. Le nouveau Binz, Editions du Griffon Neuchâtel, (1994), 603 p.

Agence Horticole Bernau, 126,134, Avenue du Maréchal Leclerc- F-86100 Châtellerault, *in* fascicule: Hiller Jungpflanzen, (1998), 7 p.

Ainsworth G. C., Introduction and keys to higher taxa, (1973), *in* The fungi: an advanced treatise, *in* Webster J., Introduction to Fungi (2<sup>nd</sup> ed), Cambridge University Press, (1980), 669 p.

Alexander C., Alexander I. J., Seasonal changes in populations of the orchid *Goodyera repens* Br. and its mycorrhizal development, Transactions of the Botanical Society of Edinburgh, 44, (1984), 219-227.

Alexander C., Alexander J. L., Phosphate uptake by *Goodyera repens* in relation to mycorrhizal infection, New Phytologist, 97, (1984), 401-411.

Arditti J., Orchid biology-Reviews and perspectives-II, Joseph Arditti (ed), Comstock Publishing Associates a division of Cornell University Press, Ithaca and London, (1982), 390 p.

Arditti J., Oliva A., Michaud J. D., Practical germination of North American and related Orchids-3-*Calopogon bulbosa*, *Cypripedium* species and hybrids, *Piperia elegans* var. *elata*, *Piperia maritima*, *Platanthera hyperborea*, and *Platanthera saccata*, American Orchid Society Bulletin, 54 (7), (1985), 859-866.

Bailes C., Clements M., Cribb P., Muir H., Tasker S., The cultivation of european orchids, The Orchid Review, 95, (1987), 19-24.

Ballard W. W., Sterile propagation of *Cypripedium reginae* from seeds, American Orchid Society Bulletin, 56 (9), (1987), 935-946.

Bessey E. A., Morphology and taxonomy of fungi, Hafner Publishing Company-New York, London, (1965), 791 p.

Breddy N. C., Black W. H., Orchid mycorrhiza and their application to seedling raising, The Orchid Journal, 3 (2), (1954), 57-61.

Beyrle H., Die Orchideen Mitteleuropas, Deutscher Gartenbau, 2+3, (1996), 1-5.

Beyrle H., communications personnelles, adresse e-mail: Heinrich.Beyrle@t-online.de, (2001).

Beyrle H., site internet: <http://www.myorchids.de>, (2001), 12 p.

Borriss H., Samenvermehrung und Anzucht europäischer Erdorchideen, (1969), *in* Joseph Arditti (ed), Orchid biology-Reviews and perspectives-II, Comstock Publishing Associates a division of Cornell University Press, Ithaca and London, (1982), 310, 312, 315, 317-320,325.

Bournerias J., Protection. Ou l'on reparle du Salep, L'Orchidophile, 127 (4), (1997), 130-132.

Burgeff H., Samenkeimung der Orchideen, Gustav Fisher, Jena, (1936), *in* Rasmussen H. N., Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plant, Cambridge University Press, (1995), 444 p.

Burges A., The defensive mechanism in orchid mycorrhiza, *New Phytologist*, 38 (3), (1939), 273-283.

Carlson M. C., Formation of the seed of *Cypripedium parviflorum*, *Botanical Gazette*, 102, (1940), 295-301.

CITES, site internet: <http://www.cites.org>, (2001), 3 p.

Clements M. A., Orchid mycorrhizal associations, *Lindleyana*, 3 (2), (1988), 73-86.

Clements M. A., Ellyard R. K., The symbiotic germination of Australian Terrestrial orchids, *American Orchid Society Bulletin*, 48 (8), (1979), 810-816.

Clements M. A., Muir H., Cribb P. J., A preliminary report on the symbiotic germination of European terrestrial orchids, *Kew Bulletin*, 41 (2), (1985), 437-445.

Coleman R. A., Propagation of Native Orchids, *American Orchid Society Bulletin*, (september 1996), 950-955.

CPS, site internet: <http://www.cps-skew.ch>, (2001), 14 p.

Cribb P., Bailes C., Hardy orchids. Orchids for the garden and frost-free glasshouse, Christopher Helm, London, Timber Press, Portland, Oregon, (1989), 162 p.

Cronquist A., An integrated system of classification of flowering plants, The New York Botanical Garden, Columbia University Press, New York, (1981), 1262 p.

CRSF, site internet: <http://www.cjb.unige.ch/CRSF/home.html>, (2001), 3 p.

Curtis J. T., The relation of specificity of orchid mycorrhizal fungi to the problem of symbiosis, *American Journal of Botany*, 26, (1939), 390-399.

Davet P., Rouxel F., Détection et isolement des champignons du sol, INRA Editions, (1997), 201 p.

Delforge P., Guide des orchidées d'Europe, d'Afrique du nord et du Proche-Orient, Delachaux et Niestlé, Lausanne, (1994), 480 p.

Dijk E., Mycorrhizen der Orchideen I, II, III, *Die Orchidee*, 39 (1), (3), (5), (1988), 38-41, 116-120, 196-200.

Dixon K., Raising terrestrial orchids from seed, (1987), in Zettler L. W., Mcinnis Jr. T. M., Propagation of *Platanthera integrilabia* (Correll) Luer, an endangered terrestrial orchid, through symbiotic seed germination, *Lindleyana*, 7 (3), (1992), 154-161.

Downie D. G., On the germination and growth of *Goodyera repens*, *Transactions of the Botanical Society of Edinburgh*, 33 (1), (1940), 36-51.

Downie D. G., Notes on the germination of some British Orchids, *Transactions of the Botanical Society of Edinburgh*, 33 (2), (1941), 94-103.

Downie D. G., Source of the symbiont of *Goodyera repens*, *Transactions of the Botanical Society of Edinburgh*, 33 (4), (1943), 383-390.

- Downie D. G., *Corticum solani* - an orchid endophyte, *Nature*, 179, (1957), 160.
- Downie D. G., *Rhizoctonia solani* and orchid seed, *Transactions of the Botanical Society of Edinburgh*, 37, (1959), 279-284.
- Downie D. G., The mycorrhiza of *Orchis purpurella*, *Transactions of the botanical society of Edinburgh*, 38, (1959), in Smith S. E., Carbohydrate translocation in orchid mycorrhizas, *New Phytologist*, 66, (1967), 371-378.
- Erhardt W., Götz E., Böderer N., Seybold S., Zander. *Handwörterbuch der Pflanzennamen*. 16. Auflage, Eugen Ulmer, (2000), 990 p.
- Farrell L., Fitzgerald R., The nature Conservancy Council and orchid conservation in Pritchard H. W., *Modern methods in orchid conservation. The role of physiology, ecology and management*, Cambridge University Press, (1989), 173 p.
- Fast G., Über das Keimverhalten europäischer Erdorchideen bei asymbiotischer Aussaat, *Die Orchidee*, 29, (1978), 270-274.
- Fast G., European terrestrial orchids (symbiotic and asymbiotic methods) in Arditti J. (ed), *Orchid Biology-Reviews and perspectives II*, Comstock Publishing Associates a division of Cornell University press Ithaca London, (1982), 309-326.
- Fay M. F., Muir H. J., The rôle of micropropagation in the conservation of European plants, in Hernandez Bermejo J. E., Clemente M., Heywood V. (eds); *Conservation techniques in botanic gardens*, Koenigstein: Koeltz, (1990), 27-32.
- Frey M., Une intéressante expérience en Alsace du sud, *L'Orchidophile*, 122 (4), (1996), 125-129.
- Fuchs A., Ziegenspeck H., Bau und Form der Wurzeln der einheimischen Orchideen in Hinblick auf ihre Aufgaben, *Botanisches Archiv*, 11, (1925), 290-379, in Rasmussen H. N., *Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plant*, Cambridge University Press, (1995), 444 p.
- Gatin C.-L., *Dictionnaire aide-mémoire de botanique*, Editions Lechevalier, Paris, Kraus Reprint, Nendeln Liechtenstein, (1975), 847 p.
- George E. F., *Plant propagation by tissue culture. Part 1&2*, Exegetics Limited, Edington, Wilts, (1996), 1361 p.
- Hadley G., Cellulose as a carbon source for orchid mycorrhiza, *New Phytologist*, 68, (1969), 933-939.
- Hadley G., Non-specificity of symbiotic infection in orchid mycorrhiza, *New Phytologist*, 69, (1970), 1015-1023.
- Hadley G., Germination of British orchids, *The Orchid Review*, (1982), 84-86.
- Hadley G., European terrestrial orchids, in Arditti J. (ed), *Orchid Biology-Reviews and perspectives II*, Comstock Publishing Associates a division of Cornell University press Ithaca London, (1982), 326-329.
- Hadley G., Symbiotic germination of orchid seed, *The Orchid Review*, (1983), 44-47.

Hadley G., Uptake of [ $^{14}\text{C}$ ]glucose by asymbiotic and mycorrhizal orchid protocorms, *New Phytologist*, 96, (1984), 263-273.

Hadley G., Harvais G., The effect of certain growth substances on asymbiotic germination and development of *Orchis purpurella*, *New Phytologist*, 67 (2), (1968), 441-445.

Hadley G., Pegg G. F., Host fungus relationships in orchid mycorrhizal systems, in Pritchard H. W. (ed), *Modern methods in orchid conservation: the role of physiology, ecology and management*, Cambridge University Press, (1989), p. 57-72.

Hadley G., Williamson B., Analysis of the post-infection growth stimulus in orchid mycorrhiza, *New Phytologist*, 70, (1971), 445-455.

Harbeck M., (1963), in Arditti J. (ed), *Orchid Biology-Reviews and perspectives II*, Comstock Publishing Associates a division of Cornell University press Ithaca London, (1982), 310, 317-319, 324.

Harrison C. R., Ultrastructural and histochemical changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (*Orchidaceae*), *Botanical Gazette*, 138 (1), (1977), 41-45.

Harvais G., Hadley G., The relation between host and endophyte in orchid mycorrhiza, *New Phytologist*, 66, (1967), 205-215.

Harvais G., Hadley G., The development of *Orchis purpurella* in asymbiotic and inoculated cultures, *New Phytologist*, 66, (1967), 217-230.

Harvais G., (1972) in Arditti J. (ed), *Orchid Biology-Reviews and perspectives II*, Comstock Publishing Associates a division of Cornell University press Ithaca London, (1982), 310, 317, 321.

Harvais G., Growth requirements and development of *Cypripedium reginae* in axenic culture, *Canadian Journal of Botany*, 51, (1973), 327-332.

Harvais G., An improved culture medium for growing the orchid *Cypripedium reginae* axenically, *Canadian Journal of Botany*, 60, (1982), 2547-2555, in St-Arnaud M. *et al*, *In vitro* germination and early growth of seedlings of *Cypripedium acaule* (*Orchidaceae*), *Lindleyana*, 7 (1), (1992), 22-27.

Heinrichs G., Von der Idee zum fertigem Produkt + Anzucht und Verwendung von Gartenorchideen in *Deutscher Gartenbau*, 2+3, Verlag Eugen Ulmer-Stuttgart, (1996), 14-15, 16-17.

Hiller Jungpflanzen, fascicules: Fascination Orchidée. Les orchidées de jardin, (2000), 4+8.

Hiller Jungpflanzen, site internet: <http://www.jungpflanzen-hiller.de> , (2000)

Hmeijer R. J. A., site internet:

<http://homepages.go.com/~ronsorchids/Ronshardyorchids.index.html>, (2000), 3 p.

IUCN, site internet: <http://www.iucn.org>, (2001), 1 p.

Johansen B., Rasmussen H., *Ex situ* conservations of orchids, *Opera Botanica*, 113, (1992), 43-48.

Kano K., Acceleration of the germination of so-called «hard-to-germinate» orchid seeds, *American Orchid Society Bulletin*, 37, (1968), 690-698.

Killgus C., Grundlagen aus einem Quedlinburger Labor + Gartenorchideen von Hiller *in* *Deutscher Gartenbau*, 2+3, Verlag Eugen Ulmer-Stuttgart, (1996), 9-11+12-14.

Knees S. G., Import and export of orchids and the law *in* Pritchard H. W., *Modern methods in orchid conservation. The role of physiology, ecology and management*, Cambridge University Press, (1989), 173 p.

Knudson L., Nonsymbiotic germination of orchid seeds, *Botanical Gazette*, 73 (1), (1922), 1-25.

Knudson L., A new nutrient solution for the germination of orchid seed, *American Orchid Society Bulletin*, 15, (1946), 214-217.

Landwehr J., Les orchidées sauvages de Suisse et d'Europe (I et II), *La bibliothèque des arts*, Paris, (1982), 595 p.

Petit Larousse Illustré, Librairie Larousse, Paris, (1984), 1799 p.

Petit Larousse Illustré, édition entièrement nouvelle, Larousse, Paris, (1999), 1786 p.

Lauber K., Wagner G., *Flora Helvetica, Flore illustrée de Suisse*, Editions Paul Haupt, Berne-Stuttgart-Vienne, (2000), 1616 p.

Lender T., Delavault R., Le Moigne A., *Dictionnaire de Biologie*, Presses Universitaires de France, (1979), 437 p.

Lewis D. H., Concepts in fungal nutrition and the origin of biotrophy, *Biological Reviews*, 48, (1973), 261-278.

Linden B., Aseptic germination of seeds of Northern Terrestrial orchids, *Annales Botanici Societas Zoologicae-botanicae fennicae Vanamo*, 17, (1980), 174-182.

Lucke E., Sowing of orchid seed-Made easy, *American Orchid Society Bulletin*, feb., (1975) *in* Mitchell R. B., *Growing hardy orchids from seeds at Kew*, *The Plantsman*, 11, (1989), 152-169.

Lucke E., Samenstruktur und Samenkeimung europäischer Orchideen nach VEYRET sowie weitere Untersuchungen (Teil 5), *Die Orchidee*, 35 (4), (1984), 153-158.

Maire, aucune référence *in* Gatin C. L., *Dictionnaire aide-mémoire de botanique*, Editions Lechevalier, Paris, Kraus Reprint, Nendeln Liechtenstein, (1975), 847 p.

Manning J. C., Van Staden J., The development and metabolisation of seed reserves in some African orchids, *Australian Journal of Botany*, 35, (1987), 343-353.

Mead J. W., Bulard C., Effects of vitamins and nitrogen sources on asymbiotic germination and development on *Orchis laxiflora* and *Ophrys sphegodes*, *New Phytologist*, 74, (1975), 33-40.

Mead J. W., Bulard C., (1979), *in* Arditti J. (ed), *Orchid Biology-Reviews and perspectives II*, Comstock Publishing Associates a division of Cornell University press Ithaca London, (1982), 347-351, 636.

Menneret E., Pépinière de Vésenaz, communications personnelles, (2000).

- Mitchell R. B., Growing hardy orchids from seeds at Kew, *The Plantsman*, 11, (1989), 152-169.
- Mollison J. E., *Goodyera repens* and its endophyte, *Transactions of the Botanical Society of Edinburgh*, 33 (4), (1943), 391-403.
- Morel O., Schilliger Garden Centre SA, communications personnelles, (2000-2001).
- Murashige T., Skoog F., A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture, *Physiologia Plantarum*, 37, (1962), 80-82, in St-Arnaud M. *et al*, *In vitro* germination and early growth of seedlings of *Cypripedium acaule* (*Orchidaceae*), *Lindleyana*, 7 (1), (1992), 22-27..
- Nicholson G., Dictionnaire pratique d'horticulture et de jardinage, Jeanne Lafitte Marseille, (1981), 806 p.
- Perombelon M., Hadley G., Production of pectic enzymes by pathogenic and symbiotic *Rhizoctonia* strains, *New Phytologist*, 64, (1965), 144-155.
- Pfänder P., Gartenorchideen und Artenschutz in Deutscher Gartenbau, 2+3, Verlag Eugen Ulmer-Stuttgart, (1996), 6-7.
- Purves S., Hadley G., The physiology of symbiosis in *Goodyera repens*, *New Phytologist*, 77, (1976), 689-696.
- Rasmussen F. N., Orchids, in R. M. H. Dahlgren, H. T. Clifford, O. F. Yeo (eds), *The families of the monocotyledons*, Springer, Berlin-Heidelberg-New York-Tokyo, (1985), 249-260.
- Rasmussen H. N., Cell differentiation and mycorrhizal infection in *Dactylorhiza majalis* (Rchb. f.) Hunt & Summerh. (*Orchidaceae*) during germination *in vitro*, *New Phytologist*, 116, (1990), 137-147.
- Rasmussen H. N., Seed dormancy patterns in *Epipactis palustris* (*Orchidaceae*): requirements for germination and establishment of mycorrhiza, *Physiologia Plantarum*, 86, (1992), 161-167.
- Rasmussen H. N., *Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plant*, Cambridge University Press, (1995), 444 p.
- Rasmussen H. N., Whigham D., Seed ecology of dust seed *in situ*: a new study technique and its application in terrestrial orchids, *American Journal of Botany*, 80, (1993), 1374-1378, in Rasmussen H. N., *Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plant*, Cambridge University Press, (1995), 444 p.
- Rasmussen H. N., Andersen T. F., Johansen B., Light stimulation and darkness requirements for the symbiotic germination of *Dactylorhiza majalis* (*Orchidaceae*) *in vitro*, *Physiologia Plantarum*, 79, (1990), 226-230.
- Reinecke F., Wiedereinbürgerung von *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br. in Schleswig-Holstein. 20 Monate von der Aussaat bis zur Blüte, *Die Orchidee*, 44 (4), (1993), 204-206.
- Reinhard H. R., Gölz P., Peter R., Wildermuth H., *Die Orchideen der Schweiz und angrenzender Gebiete*, Fotorotar AG, Druck & Verlag, (1991), 348 p.
- Reynaud V., Wyss Samen und Pflanzen A. G., communications personnelles, (2000-2001).

Royal Botanic Gardens-Kew: Kew information sheet K 15: The Sainsbury orchid conservation project: propagation for conservation, 2 p.

Royal Botanic Gardens-Kew: information sheets: micropropagation, site internet: <http://www.rbgekew.org.uk/ksheets/microprop.html>, (2000), 9 p.

St-Arnaud M., Lauzer D., Barabé D., *In vitro* germination and early growth of seedlings of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae), *Lindleyana*, 7 (1), (1992), 22-27.

Smith S. E., Physiology and ecology of orchid mycorrhizal fungi with reference to seedling nutrition, *New Phytologist*, 65, (1966), 488-499.

Smith S. E., Carbohydrate translocation in orchid mycorrhizas, *New Phytologist*, 66, (1967), 371-378.

Smith S. E., Asymbiotic germination of orchid seeds on carbohydrates of fungal origin, *New Phytologist*, 72, (1973), 497-499.

Smith S. E., Read D. J., Mycorrhizal symbiosis, Academic Press, Harcourt Brace & Company, Publishers, (1997), 605 p.

Spichiger R. E., Savolainen V. V., Figeat M., Botanique systématique des plantes à fleurs, Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, (2000), 372 p.

Sprunger S., communications personnelles, (2001).

Stiles W., The composition of the atmosphere (oxygen content of air, water, soil, intercellular spaces, diffusion, carbon dioxide and oxygen tension). *In* Encyclopedia of plant physiology XII/2, Ruhland (ed), Springer Verlag, Berlin, (1960), 114-148, *in* Rasmussen H. N., Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plant, Cambridge University Press, (1995), 444 p.

Tasker S., Living orchid collection at Kew *in* Pritchard H. W., Modern methods in orchid conservation. The role of physiology, ecology and management, Cambridge University Press, (1989), 173 p.

Technique de pollinisation manuelle pour les orchidées terrestres, méthode développée à Kew, 6 p.

Terashita T., Fungi inhabiting wild orchids in Japan (III). A symbiotic experiment with *Armillaria mellea* *Galeola septentrionalis*, (1985), *Transactions of the Mycological Society of Japan*, 26, 47-53, *in* Rasmussen H. N., Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plant, Cambridge University Press, (1995), 444 p.

Thurston K. C., Spencer S. J., Arditti J., (1979), *in* Arditti J. (ed), *Orchid Biology-Reviews and perspectives II*, Comstock Publishing Associates a division of Cornell University press Ithaca London, (1982), 257.

Tracol A., Montagneux G., Les maladies des plantes ornementales 4<sup>ème</sup> édition, Collection «Protection des plantes cultivées», (1985), 403 p.

Van Waes J. M., *In vitro* studie van de kiemingsfysiologie van Westeuropese orchidëen. Thesis, Rijksuniversiteit Gent, Belgium, (1984), *in* Rasmussen H. N., Seed dormancy patterns in *Epipactis palustris* (Orchidaceae): requirements for germination and establishment of mycorrhiza, *Physiologia Plantarum*, 86, (1992), 161-167.

- Van Waes J. M., Debergh P. C., *In vitro* germination of some Western European orchids, *Physiologia Plantarum*, 67, (1986), 253-261.
- Vidalie H., Moraud J.-C., Minier R., Galandrin J.-C., Digat B., Decourtye L., Boccon-Gibod J., Beauchesne G., Augé R., La culture *in vitro* et ses applications horticoles, J.B. Baillière - Lavoisier - Technique et Documentation, (1984), 152 p.
- Warcup J. H., Specificity of mycorrhizal association in some Australian terrestrial orchids, *New Phytologist*, 70, (1971), 41-46.
- Warcup J. H., Symbiotic germination of some Australian terrestrial orchids, *New Phytologist*, 72, (1973), 387-392.
- Warcup J. H., The mycorrhizal relationships of Australian Orchids, *New Phytologist*, 87, (1981), 371-381.
- Warcup J. H., Talbot P. H. B., Perfect states of *Rhizoctonia* associated with orchids II, *New Phytologist* 70, (1971), 35-40.
- Webster J., Introduction to fungi, second edition, Cambridge University Press, (1980), 669 p.
- Weiss J.-F., communications personnelles, (2000).
- Westerman E., Fungus and its association with orchid seed germination, *The Orchid Journal*, 3, (1959), 288-289.
- Whitlow C. E., *Cypripedium* culture in the USA, *The Orchid Review*, 91, (1983), 300-305.
- Whitlow C. E., Approaches to reducing collecting pressure on terrestrial orchid species, *American Orchid Society Bulletin*, 59(1), (1990), 41-52.
- Williams N. H., The biology of Orchids and Euglossine Bees, in Arditti J. (ed), *Orchid Biology, Reviews and perspectives II*, Comstock Publishing Associates a division of Cornell University Press-Ithaca London, (1982), 119-171.
- Wood J. J., British orchids in their European context in Pritchard H. W., *Modern methods in orchid conservation. The role of physiology, ecology and management*, Cambridge University Press, (1989), 173 p.
- Zettler L. W., Mcinnis Jr. T. M., Propagation of *Platanthera integrilabia* (Correll) Luer, an endangered terrestrial orchid, through symbiotic seed germination, *Lindleyana*, 7 (3), (1992), 154-161.

**Tables.****Table des matières.**

<b>1. Introduction.....</b>	<b>1</b>
1.1. Description botanique.....	1
1.2. Classification botanique.....	2
1.3. Classification phénologique.....	2
1.4. La relation mycorhizique.....	3
1.5. Les méthodes de propagation végétatives.....	5
1.6. Le choix du semis comme méthode de propagation.....	6
<b>2. Les orchidées terrestres.....</b>	<b>16</b>
2.1. Les étapes de la culture.....	16
2.1.1. <u>Introduction</u> .....	16
2.1.2. <u>La pollinisation</u> .....	16
2.1.3. <u>Le prélèvement des graines</u> .....	17
2.1.4. <u>Les désinfections et prétraitements</u> .....	19
2.1.5. <u>Le semis</u> .....	22
2.1.6. <u>Le repiquage</u> .....	23
2.1.7. <u>La mycorhization</u> .....	25
2.1.8. <u>Le sevrage</u> .....	29
2.2. Les conditions de culture.....	43
2.2.1. <u>Introduction</u> .....	43
2.2.2. <u>Méthode générale de préparation de milieux</u> .....	43
2.2.3. <u>Méthode asymbiotique</u> .....	43
2.2.4. <u>Méthode symbiotique</u> .....	48
2.2.5. <u>Conditions de lumière et de température</u> .....	49
<b>3. La culture des mycorhizes.....</b>	<b>60</b>
3.1. Introduction.....	60
3.2. Le prélèvement dans la nature.....	63
3.3. L'isolation.....	65
3.4. Les tests d'efficacité.....	69
3.5. La culture et la conservation.....	71
3.6. Besoins et facteurs influençant la culture des mycorhizes.....	73
<b>4. Résultats et discussions.....</b>	<b>84</b>
4.1. Introduction.....	84
4.2. Fiches de culture.....	85
4.3. Ebauche de fiche de culture de deux orchidées en danger.....	104
4.4. Tableau récapitulatif des résultats de mycorhizations (Tab. 9).....	110
<b>5. Discussions–conclusion.....</b>	<b>112</b>
5.1. Introduction.....	112
5.2. Remarques générales sur les résultats obtenus.....	112
5.3. Production à but commercial.....	115
5.4. Conservation et réintroductions.....	120
5.5. Exemples concrets de réintroductions.....	123
<b>Bibliographie.....</b>	<b>132</b>
<b>Tables.....</b>	<b>140</b>
Table des matières.....	140
Table des figures.....	141
Table des tableaux.....	143

## Table des figures.

Fig. 1 Rhizome de <i>Goodyera repens</i> .	8
Fig. 2 Tubercules d' <i>Orchis mascula</i> .	8
Fig. 3 Pseudo-bulbes de <i>Platanthera bifolia</i> .	8
Fig. 4 Coupe schématique de la fleur d'orchidée.	9
Fig. 5 Fleur d'orchidée: appareil reproducteur.	9
Fig. 6 Coupe transversale de l'ovaire.	10
Fig. 7 Fruit, coupe transversale de ce dernier et graine.	10
Fig. 8 Etapes de la germination.	11
Fig. 9 Classification botanique selon Cronquist, 1981.	11
Fig. 10 Schéma du cycle annuel d' <i>Ophrys sphegodes</i> (en haut) et d' <i>Orchis morio</i> (en bas).	12
Fig. 11 Graine de <i>Cephalanthera longifolia</i> .	13
Fig. 12 Protocorme mycorhizé.	13
Fig. 13 Multiplication végétative d'espèces à rhizome.	14
Fig. 14 Multiplication végétative d'espèces à tubercules.	15
Fig. 15 Pollinisation manuelle.	34
Fig. 16 Etapes du cycle annuel d'une orchidée.	34
Fig. 17 Conservation frigorifique des graines sèches emballées pour le semis.	35
Fig. 18 Schéma d'une graine d'orchidée terrestre.	35
Fig. 19 Petits paquets utilisés pour la désinfection et le semis des graines sèches.	36
Fig. 20 Schéma d'une hotte pour le travail en atmosphère "aseptisée".	36
Fig. 21 Mauvais étalement des graines au semis ( <i>Dactylorhiza fuchsii</i> , milieu Kew-A).	37
Fig. 22 Etalement optimal au semis ( <i>Dactylorhiza fuchsii</i> , milieu Kew-A).	38
Fig. 23 Début de germination, rupture du testa ( <i>Cypripedium parviflorum</i> ).	39
Fig. 24 Différents stades de développement de protocormes ( <i>Cypripedium parviflorum</i> ).	39
Fig. 25 Type de récipient initial de repiquage.	40
Fig. 26 Nouveau type de récipient pour le repiquage (essais en cours).	40
Fig. 27 Différence de résultat en fonction du mode de culture (asymbiotique/symbiotique).	41
Fig. 28 Pelotes de mycorhize au sein des cellules.	41
Fig. 29 Semis mycorhizé ( <i>Orchis purpurea</i> ) avec le cube de mycorhization, en bas à droite.	42
Fig. 30 Mycorhization sale de semis à partir d'une capsule (graines immature, <i>Aceras anthropophorum</i> ).	42
Fig. 31 Solutions-mères et préparations du commerce conservées au frigo du CJB.	54
Fig. 32 Méthode générale de préparation de milieux.	55
Fig. 33 Empilement de protocormes rendant difficile le repiquage ( <i>Dactylorhiza maculata</i> ).	56
Fig. 34 Infection bactérienne dans un semis en germination ( <i>Cypripedium parviflorum</i> ).	57
Fig. 35 Infection fongique dans un semis d' <i>Epipactis palustris</i> .	57
Fig. 36 Mycorhization un peu trop vigoureuse (à laisser en observation).	58
Fig. 37 Mycorhization un peu trop vigoureuse (à laisser en observation).	58
Fig. 38 Chambre de culture aux CJB pour les semis mycorhizés.	59
Fig. 39 Chambre de culture pour semis mycorhizés avec des souches trop vigoureuses.	59
Fig. 40 Classification selon Ainsworth (1973) in Webster, 1980.	78
Fig. 41 Développement de la baside et des basidiospores.	78
Fig. 42 Classification des champignons selon leur comportement écologique et nutritionnel.	79
Fig. 44 Classification selon l'histologie des tissus infectés.	80
Fig. 45 Isolation de mycorhizes.	81
Fig. 46 Conservation à court terme dans du FIM.	82
Fig. 47 Conservation à long terme dans un protocorme.	82
Fig. 48 Voies possibles dans l'association mycorhize-orchidée.	83
Fig. 49 Protocorme issu de semis immature ( <i>Dactylorhiza maculata</i> , Kew-A).	90
Fig. 50 Protocorme mycorhizé ( <i>Dactylorhiza maculata</i> , F 414).	90
Fig. 51 Protocorme mycorhizé ( <i>Dactylorhiza maculata</i> , OMF 121).	91
Fig. 52 Protocorme mycorhizé au repiquage ( <i>Dactylorhiza maculata</i> , DFV 1).	91
Fig. 53 Protocorme montrant des rhizoïdes recroquevillés ( <i>Ophrys apifera</i> , Kew-A).	96
Fig. 54 Protocormes dont le stade de repiquage est presque dépassé ( <i>Ophrys apifera</i> , Kew-A).	97
Fig. 55 Verdissement de la pousse indiquant le stade du sevrage ( <i>Ophrys apifera</i> , Kew-A).	98
Fig. 56 Protocorme, peu fréquent chez ce genre ( <i>Himmantoglossum hircinum</i> , Kew-A).	102
Fig. 57 Protocorme prêt à être repiquer ( <i>Himmantoglossum hircinum</i> , Kew-A).	102

<b>Fig. 58 Stade idéal pour le repiquage, faible taux de germination, (<i>Himmantoglossum hircinum</i>, Kew-A).</b> .....	<b>103</b>
<b>Fig. 59 Stade critique au repiquage (<i>Himmantoglossum hircinum</i>, Kew-A).</b> .....	<b>103</b>
<b>Fig. 60 Protocorme peu fréquent dans les essais des CJB (<i>Orchis papilionacea</i>, Kew-A).</b> .....	<b>106</b>
<b>Fig. 61 Verdissement de la pousse (<i>Orchis papilionacea</i>, Kew-A).</b> .....	<b>106</b>
<b>Fig. 62 Protocormes déjà repiqués (<i>Orchis papilionacea</i>, Kew-A).</b> .....	<b>107</b>
<b>Fig. 63 Protocorme mycorhizé (<i>Orchis provincialis</i>, OMF 121).</b> .....	<b>108</b>
<b>Fig. 64 Protocorme mycorhizé au repiquage (<i>Orchis provincialis</i>, OMF 121).</b> .....	<b>108</b>
<b>Fig. 65 Protocormes repiqués, montrant une pousse verte (<i>Orchis provincialis</i>, Kew-A).</b> .....	<b>109</b>
<b>Fig. 66 Couche de culture des plantules sevrées aux CJB (II.2001).</b> .....	<b>126</b>
<b>Fig. 67 Plantules sevrées aux CJB (II.2001).</b> .....	<b>126</b>
<b>Fig. 68 Protocormes de <i>Dactylorhiza</i>, 6 semaines après le semis (H. Beyrle).</b> .....	<b>127</b>
<b>Fig. 69 Plantule de <i>Dactylorhiza</i> avec bourgeon formé, 5 mois (H. Beyrle).</b> .....	<b>127</b>
<b>Fig. 70 Plantes sélectionnées sur la taille de l'organe souterrain, <i>Dactylorhiza incarnata</i> de 2 ans (H. Beyrle).</b> .....	<b>128</b>
<b>Fig. 71 Culture de <i>Dactylorhiza incarnata</i> âgée de 2 ans (H. Beyrle).</b> .....	<b>128</b>
<b>Fig. 72 Culture de <i>Dactylorhiza incarnata</i> âgée de 3 ans (H. Beyrle).</b> .....	<b>129</b>
<b>Fig. 73 Dégâts causés par les escargots sur <i>Ophrys apifera</i> (CJB, II.2001).</b> .....	<b>129</b>
<b>Fig. 74 Diagramme récapitulatif des possibilités offertes par le semis.</b> .....	<b>130</b>
<b>Fig. 75 Sigles des différentes organisations citées.</b> .....	<b>131</b>

**Table des tableaux.**

<b>Tab. 1: méthodes de désinfection de graines sèches.....</b>	<b>21</b>
<b>Tab. 2: méthodes de désinfection des capsules vertes.....</b>	<b>22</b>
<b>Tab. 3: milieux asymbiotiques rencontrés.....</b>	<b>47</b>
<b>Tab. 4: milieux symbiotiques.....</b>	<b>49</b>
<b>Tab. 5: conditions avant le semis.....</b>	<b>50</b>
<b>Tab. 6: conditions au semis.....</b>	<b>52</b>
<b>Tab. 7: conditions après la germination.....</b>	<b>53</b>
<b>Tab. 8: méthodes d'isolation des mycorhizes.....</b>	<b>68</b>
<b>Tab. 9: mycorhizations effectuées aux CJB.....</b>	<b>111</b>

**Annexe I.****Titre:**

La micropropagation des orchidées terrestres d'Europe.

**Nom de l'étudiant:**

Agnès Bracke.

**Année de diplôme:**

2001.

**Mots clés:**

orchidées terrestres, *in vitro*, semis, symbiotique, mycorhizes, isolations, sevrage, fiche de culture, réintroductions.

**Résumé:**

Après un rappel des caractéristiques des orchidées terrestres européennes, les étapes de la culture à partir de semis de ces plantes ainsi que les conditions dans lesquelles elle sont réalisées sont décrites. Comme la vie des orchidées est fortement dépendante de leur association avec des mycorhizes, un chapitre est consacré à la culture et la conservation de ces dernières. Quatre exemples sont ensuite donnés pour offrir une méthode de travail à ceux qui désireraient se lancer dans la production en laboratoire de ces plantes. Ces données expérimentales ne sont qu'une étape dans le travail de recherches qui continue aux Conservatoire et Jardin Botaniques de Genève. Le but est de pouvoir entretenir les collections et conserver les plantes en danger, mais également d'offrir du matériel pouvant être réintroduit dans la nature. C'est dans cette optique de protection de l'environnement et de maintien de la biodiversité naturelle que les expériences de ce laboratoire sont réalisées. Mais cela ne gêne en rien l'application des résultats obtenus pour la mise en culture à des fins commerciales. C'est pourquoi, une enquête dans le domaine de la production horticole et de la vente a également été réalisée.

**Annexe II.****Données constantes de la loupe binoculaire:**

Binoculaire:	Binoculaire:				Scan:		Image:		
	Mo	Me	q	r	Gr. Sortie	Res. [pxls]	[mm]	[mm/pxl]	[pxls/mm]
Objectif:									
Achromat	0.63			1					
Achromat	1.5			1					
Oculaire:									
Standard		10							
Adaptateur:									
Standard			0.32						
Image:								0.1305	7.6620
Longueur (L'):					3	830	36	0.1301	7.6852
largeur (l'):					3	550	24	0.1309	7.6389

Mo : Grossissement Objectif

Me : Grossissement Oculaire

q : Facteur 'adaptateur appareil photo'

r : Facteur objectif (Achromat: 1)

Scan Gr. Sortie: Grossissement à la sortie du scan

Scan Res. : Image résultante après le scan en pxls

**Calcul du grossissement et de l'échelle des diapositives:**

Figure dans le trav. de. dipl.:	Donnees binoculaire:						Image reelle:		Echelle:		
	Mo	Me	z	q	r	Mtot:	l [mm]	L [mm]	[pxls/mm]	[mm]	[pxls]
11	1.5	10	4.00	0.32	1.00	19.20	1.3	1.9	443	0.25	111
21	1.5	10	2.00	0.32	1.00	9.60	2.5	3.8	221	0.50	111
22	1.5	10	2.00	0.32	1.00	9.60	2.5	3.8	221	0.50	111
23	1.5	10	5.00	0.32	1.00	24.00	1.0	1.5	553	0.25	138
24	1.5	10	2.00	0.32	1.00	9.60	2.5	3.8	221	0.50	111
29	0.63	10	1.25	0.32	1.00	2.52	9.5	14.3	58	2.50	145
30	0.63	10	0.80	0.32	1.00	1.61	14.9	22.3	37	3.00	112
33	1.5	10	0.63	0.32	1.00	3.02	7.9	11.9	70	2.00	139
34	1.5	10	0.80	0.32	1.00	3.84	6.3	9.4	89	1.50	133
35	0.63	10	1.25	0.32	1.00	2.52	9.5	14.3	58	2.50	145
36	0.63	10	2.00	0.32	1.00	4.03	6.0	8.9	93	1.50	139
37	0.63	10	0.63	0.32	1.00	1.27	18.9	28.3	29	4.00	117
46	1.5	10	1.60	0.32	1.00	7.68	3.1	4.7	177	0.75	133
47	0.63	10	2.50	0.32	1.00	5.04	4.8	7.1	116	1.00	116
49	1.5	10	1.25	0.32	1.00	6.00	4.0	6.0	138	1.00	138
50	0.63	10	1.00	0.32	1.00	2.02	11.9	17.9	46	3.00	139
51	0.63	10	1.25	0.32	1.00	2.52	9.5	14.3	58	2.50	145
52	0.63	10	1.00	0.32	1.00	2.02	11.9	17.9	46	3.00	139
53	1.5	10	1.25	0.32	1.00	6.00	4.0	6.0	138	1.00	138
54	0.63	10	1.60	0.32	1.00	3.23	7.4	11.2	74	2.00	149
55	0.63	10	1.00	0.32	1.00	2.02	11.9	17.9	46	3.00	139
56	1.5	10	1.00	0.32	1.00	4.80	5.0	7.5	111	1.00	111
57	0.63	10	3.20	0.32	1.00	6.45	3.7	5.6	149	1.00	149
58	0.63	10	1.25	0.32	1.00	2.52	9.5	14.3	58	2.50	145
59	0.63	10	1.25	0.32	1.00	2.52	9.5	14.3	58	2.50	145
60	1.5	10	1.25	0.32	1.00	6.00	4.0	6.0	138	1.00	138
62	0.63	10	1.25	0.32	1.00	2.52	9.5	14.3	58	2.50	145
63	0.63	10	4.00	0.32	1.00	8.06	3.0	4.5	186	0.75	139
64	1.5	10	1.25	0.32	1.00	6.00	4.0	6.0	138	1.00	138
65	0.63	10	1.25	0.32	1.00	2.52	9.5	14.3	58	2.50	145

Mo : Grossissement Objectif

Me : Grossissement Oculaire

z : Facteur 'zoom' du binoculaire

q : Facteur 'adaptateur appareil photo'

r : Facteur objectif (Achromat: 1)

Formules:

Mtot : Grossissement total = Mo x Me x z x q x r

Image reelle (l, L) = l' / Mtot, L' / Mtot

Echelle [pxls/mm] = ( L' [pxls] ) / L

Echelle [pxls] = ( Echelle [pxls/mm] ) x ( Echelle [mm] )