



PROJET ESPAS

Groupe de Tâches 3 : Recherches et analyses pour la définition de protocoles scientifiques d'espèces végétales autochtones à haute valeur nutraceutique et salubre dans la zone de coopération

R 3.3 La définition de protocoles pilotes efficaces de multiplication des espèces identifiées

« Activité 3.3.5 Création du rapport pilote sur la définition des protocoles efficaces de multiplication des espèces. »

CREA - Centro di ricerca Difesa e Certificazione
CREA - Research Centre for Plant Protection and Certification

Via C.G. Bertero, 22 - 00156 Rome *Siège réel*
Cascine del Riccio, Via Lanciola, 12/A - 50125 Florence
Viale Regione Siciliana Sud Est, 8669 - 90121 Palerme
S.S. 113, km 245,500 - 90011 Bagheria (PA)
Corno d'Oro, S.S. 18, Km 77,700 - 84091 Battipaglia (SA)
S.S. 9 Via Emilia 19, km 307 - 26838 Tavazzano (LO)
Via di Corticella, 133 - 40128 Bologne
S.S. 11 en direction de Turin, km 2,5 - 13100 Vercelli
Via Guglielmo Marconi, 2 - 36045 Lonigo (VI)
Via Giacomo Venezian, 22 - 20133 Milan

Mail : dc@crea.gov.it
dc@pec.crea.gov.it
Site internet : www.crea.gov.it

Tel : +39 06 820701
TEL : +39 055 24921
TEL : +39 091 6301966
TEL : +39 091 909090
TEL : +39 0828 309484
TEL : +39 0371 761919
TEL : +39 051 6316880
TEL : +39 0161 217097
TEL : +39 0444 1808700
TEL : +39 02 6901201

INDEX

« **Activité 3.3.1 Propagation *in vivo* des populations susmentionnées pour la production en nombre des plantes** »

p. 3

« **Activité 3.3.2 Propagation *in vitro* des populations susmentionnées pour la production en nombre de plantes** » « **Activité 3.3.3 Utilisation des techniques de multiplication des bourgeons axillaires sur les asperges/roser** »

p. 10

« **Activité 3.3.4 Études de l'amélioration des protocoles *in vitro* utilisés sur les câpres de Pantelleria** »

p. 22

**CREA DC siège de Bagheria (PA)
Partenaire associé UNIPA**

Dr. Michele Massimo Mammano

Dr. Giancarlo Fascella

Dr. Alessandra Sgueglia

Pr. Maria Antonietta Germanà

Dr. Irene Granata (doctorante)

« **Activité 3.3.1 Propagation *in vivo* des populations susmentionnées pour la production en nombre des plantes** »

Ensemencement *in vivo* d'asperge sauvage (*Asparagus acutifolius* L. et *Asparagus albus* L.)

Les graines d'asperge sauvage à peine récoltées, même si elles sont placées en conditions idéales, ne germent pas immédiatement à cause de la dormance de type endogène (la germination survient habituellement entre 10 à 12 mois après l'ensemencement). Actuellement, il existe plusieurs limites à la culture de l'asperge et la plus importante est en lien avec la germination faible et irrégulière des graines qui limite la production de plantules (Rosati, 2001). Pour contourner une telle problématique, qui rend la culture de l'asperge sauvage peu répandue, de nombreuses études ont été menées à propos de l'application de traitements de pré-ensemencement afin de favoriser l'activation du processus germinatif. Parmi ces études, les meilleurs résultats ont été obtenus à travers la combinaison de plusieurs techniques : traitements thermiques, à savoir la vernalisation et l'estivation, associés à l'utilisation d'hormones, l'eau chaude et l'eau froide, sont parmi les méthodes les plus fréquemment utilisées dans les ouvrages littéraires. Le protocole décrit ci-après est le résultat d'une étude plus vaste sur la germination *in vivo* des graines d'asperge sauvage menée par les chercheurs du CREA - DC de Bagheria et dans laquelle divers pré-traitements ont été combinés pour évaluer les plus efficaces d'entre eux et pour pallier les problèmes liés à la dormance et à la germination des graines. Plus précisément, au cours des essais, des traitements thermiques (estivation et vernalisation), des traitements à l'acide gibbérellique à des concentrations variées (0,2; 0,4; 0,6; 0,8 g/L) pendant 24 h, une immersion en eau froide ou en eau chaude pendant 90 minutes et une scarification chimique à l'HCl pendant 1 minute ont été testés.

Les fruits de l'asperge sont récoltés sur des plants spontanés d'*Asparagus albus* L. et *Asparagus acutifolius* L. ayant poussé dans des champs incultes de maquis méditerranéen situés dans les provinces de Palerme, Agrigente et Caltanissetta. Habituellement, les fruits sont directement récoltés mais il est aussi possible de couper les branches porteuses de graines en réalisant ensuite l'épluchage pour séparer les baies des phylloclades. Les graines sont ensuite extraites manuellement des baies matures incisées par bistouri, lavées sous un jet d'eau courante et séchées sur un papier filtre (**Fig.1**).

Afin d'augmenter le pouvoir germinatif de la graine d'*Asparagus acutifolius* L. et d'*Asparagus albus* L., la graine est conservée environ un an avant d'être ensemencée, elle est soumise à une stratification à l'intérieur de petits bacs en aluminium contenant du sable et conservée à température ambiante (**Fig. 1**). Au terme de la période de stratification, les graines sont rincées sous eau courante de façon à éliminer les résidus de sable et elles sont séchées à l'air libre.

Afin de réduire la dormance endogène de la graine, celle-ci est soumise à une estivation, exposant la graine pendant 30 jours à une température d'environ 25 °C.

Au terme de la période d'estivation, les graines d'*Asparagus acutifolius* L. sont placées dans des plaques de germination alvéolaires contenant un substrat formé de sable et de tourbe à 50 %. Les plaques sont ensuite positionnées sur des tables de semis à l'intérieur de la serre de propagation, à une température de 25 °C, en prenant soin de maintenir le substrat humide par nébulisation. Les graines traitées de cette façon présentent un taux de germination de 74 %. Les graines plantées la même année que la récolte présentent un taux de germination plus faible, d'environ 58 %. Afin d'éviter les dommages possibles aux racines des jeunes plantules, il est préférable de ne pas maintenir ces dernières à l'intérieur des contenants alvéolés pendant plus de 2 mois.

Les graines d'*Asparagus albus* L. sont soumises à une scarification (chimique) après les périodes de stratification et d'estivation. Plus précisément, elles sont immergées dans une solution d'HCl à 1 % (**Fig. 1**) pendant 1 minute et ensemencées superficiellement (à une profondeur égale au double du diamètre de la graine) dans des plaques de germination alvéolaires contenant du terreau mélangé à du sable. Les plaques de germination sont conservées à l'intérieur d'une serre de propagation à une température de 25 °C et l'humidité du substrat est maintenue par nébulisation superficielle.

Les graines d'*Asparagus albus* L. traitées de cette façon présentent un taux de germination de 99 % (**Fig. 2**). Pour la même espèce, il est possible d'obtenir de bons résultats de germination des graines avec de l'acide gibbérellique (GA₃). En particulier, il est possible d'atteindre un taux égal à 100 % en immergeant les graines pendant 24 h dans une solution contenant du GA₃, à une concentration de 0,8 g/L, avant l'ensemencement.

Bibliographie

Rosati A (2001). Un possibile futuro per l'asparago selvatico. *Informatore agrario* 7:57 p. 89-92.



Fig.1 Semi di asparago selvatico (A). Semi stratificati (B). Semi immersi in una soluzione di HCl (C).

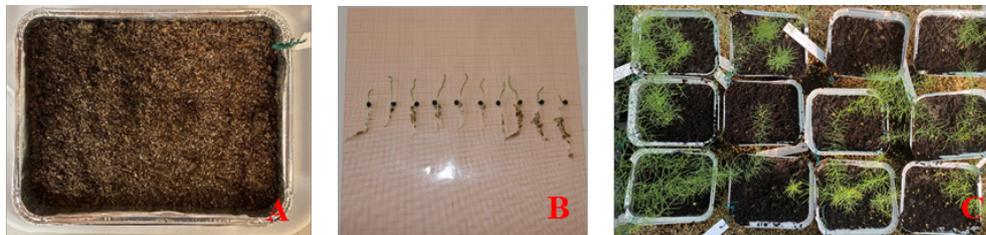


Fig.2 Semina di asparago selvatico (A). Semi di asparago selvatico germinati (B). Piantine di asparago selvatico mantenute in serra di propagazione (C).

Ensemencement *in vitro* d'asperge sauvage (*Asparagus albus* L. et *Asparagus acutifolius* L.)

Les graines d'asperge peuvent également être utilisées comme matériel initial pour démarrer une culture *in vitro* et elles peuvent être mises à germination sur un milieu gélosé en conditions aseptisées. Les conditions de reproduction *in vitro* et l'ensemencement sur un milieu de culture additionné d'acide gibbérellique (GA₃) permettent d'obtenir bon nombre de plantes en peu de temps. Cette méthode présente les limites classiques des techniques de propagation gamique (ex : degré élevé d'hétérozygotie du semis) mais elle peut être utile pour obtenir des plantes pour la repopulation d'habitats naturels et pour la régénération de zones marginales non vouées à l'agriculture. En outre, les plantes obtenues *in vitro* par des graines peuvent représenter le matériel végétal de départ pour de nombreuses expérimentations basées sur les cultures *in vitro* (Rasad *et al.*, 2019).

Les graines d'*Asparagus acutifolius* L. et d'*Asparagus albus* L. sont récoltées sur des plantes en pots reproduites sous serre auprès des locaux expérimentaux du CREA - DC de Bagheria, à partir du mois d'octobre-novembre. Les baies récoltées, noir-violacé dans le cas d'*Asparagus acutifolius* L. et rougeâtres pour *Asparagus albus* L. (**Fig. 1**), sont incisées à l'aide d'un bistouri

de façon à pouvoir séparer les graines de la pulpe. Les graines sont ensuite séchées à l'air libre à l'intérieur de boîtes de Pétri. Ensuite, elles sont lavées sous un jet d'eau courante pendant 30 minutes et transférées dans un contenant stérile avec, à l'intérieur, une solution d'hypochlorite de sodium (0,8 chlore actif) à 10 % pendant 10 minutes en agitation. Les graines à introduire *in vitro* sont également immergées dans une solution d'éthanol à 70 % pendant 1 minute, soumises à 3 rinçages avec de l'eau stérile sous une hotte à flux laminaire et mises en culture sur un milieu gélosé contenant des sels MS (Murashige and Skoog, 1962) et de l'acide gibbérellique (GA₃) (2 mg/L) (**Fig. 2**). Les graines sont ensuite reproduites en chambre de culture à 24 °C dans l'obscurité. Après l'émission des racines, les contenants sont transférés à la lumière pour favoriser le développement correct du bourgeon. Les plantules obtenues après environ 3 semaines par ensemencement *in vitro* sont introduites *in vivo* à l'intérieur de bacs en polystyrène contenant de la tourbe sous un tunnel en polyéthylène ouvert graduellement au cours des semaines. Enfin, les plantules introduites sont transférées et cultivées dans de petits pots en polyéthylène contenant de la tourbe et maintenues à l'intérieur de la serre de propagation du CREA - DC de Bagheria (**Fig. 3**).

Cette méthode d'ensemencement *in vitro* permet d'obtenir un démarrage rapide de la phase de germination des graines (20 jours en moyenne) et un taux de germination de 65 % pour *Asparagus acutifolius* L. et de 82 % pour *Asparagus albus* L. En augmentant la concentration en GA₃ (jusqu'à 4 mg/L) à l'intérieur du substrat d'ensemencement, il est possible d'obtenir des taux de germination plus élevés (76 % pour *Asparagus acutifolius* L. et 89 % pour *Asparagus albus* L.) mais les plantes obtenues présentent un système racinaire long et fin, difficile à entretenir sans l'endommager et développent de fines stèles qui compromettent la réussite de la phase d'acclimatation sous serre.

Bibliographie

- Murashige T and Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15 pp 473–497.
- Rasad FM, Hasbullah NA, Azis NA, Daud NF and Lassim MM (2019). Micropropagation of *Asparagus officinalis* L. (Garden Asparagus). *International Journal of Life Sciences Research* 7:3 pp 123-129.



Fig.1 Frutti di *asparagus acutifolius* L. (sinistra) e di *asparagus albus* L. (destra).

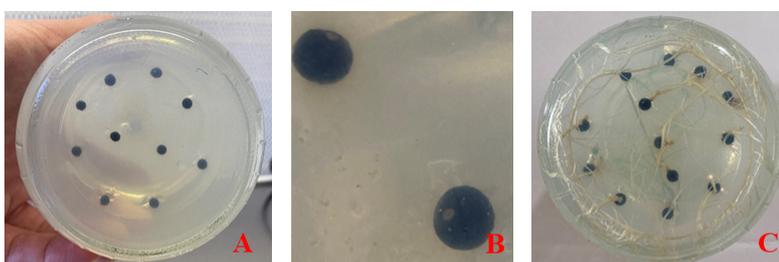


Fig.2 Semi di asparago selvatico introdotti *in vitro* (A). Fuoriuscita di un primordio radicale (B). Emissione di radici *in vitro* (C).

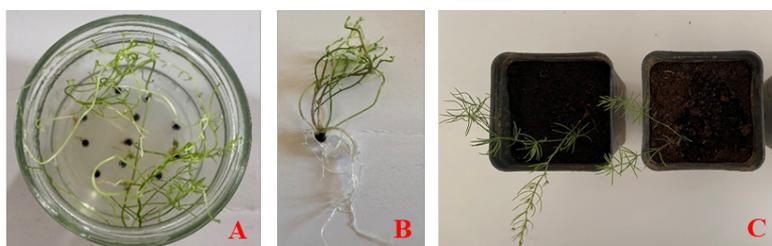


Fig.3 Semi di asparago selvatico introdotti germinati *in vitro* (A). Piantina pronta per il travaso *ex vitro* (B). Piantine travasate *in vivo* (C).

Ensemencement de Rosa (*Rosa canina* L., *Rosa corymbifera* Bork, *Rosa micrantha* Borrer ex Sm, *Rosa sempervirens* L.)

Chez le genre *Rosa*, la dormance des graines (akènes), due à divers facteurs tels que la dureté du péricarpe, représente un problème considérable pour la production de plantules (Haouala *et al.*, 2013). Cela vaut également pour les espèces de roses spontanées présentes en Sicile. En effet, si les graines de cette espèce sont plantées sans aucun traitement pré-ensemencement préalable, elles atteignent des taux de germination très bas qui sont la conséquence d'une dormance prolongée des graines. Chez *Rosa*, le phénomène de la dormance peut également être dû à la présence d'inhibiteurs spécifiques dans le péricarpe et à quelques barrières physiologiques à l'intérieur de l'embryon-même (Bo *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 2009). Les barrières physiologiques

des embryons ont été franchies avec succès pour un certain nombre d'espèces de *Rosa* en utilisant la stratification à froid (vernalisation) (Densmore *et al.*, 1977). Par ailleurs, il est possible de recourir à la scarification mécanique comme traitement pour réduire la résistance mécanique du péricarpe à travers l'immersion du semis dans l'eau chaude pendant 24 h ou à la scarification chimique en utilisation de l'acide chlorhydrique (HCl) ou sulfurique (H₂SO₄).

Les graines des espèces de *Rosa* autochtones siciliennes sont extraites des fruits (cynorrhodons) à l'aide d'un bistouri et débarrassées de leurs poils (**Fig. 1**). Après cela, elles sont immergées dans l'eau pendant 24 h et séparées par densimétrie, c'est-à-dire que seules les graines qui restent au fond du contenant (supposément intègres et en vie) sont prélevées, en écartant celles qui flottent à la surface (probablement vides). Les graines sélectionnées sont mises à l'intérieur de petits bacs en aluminium contenant du sable de rivière finement tamisé et mouillé. Les bacs sont remis à l'intérieur d'une armoire à thermostat à une température d'environ 6 °C dans l'obscurité pendant 4 mois. Pendant la période de stratification, les bacs ont été contrôlés chaque semaine pour vérifier et éventuellement intégrer les pertes d'eau du substrat. Cette technique, appelée vernalisation, permet d'augmenter le taux de germination des graines car elle satisfait leurs besoins en froid et permettent de surmonter la période dite de dormance. Après la stratification à froid, les graines sont rincées pour éliminer le sable en excès et sont soumises à une scarification chimique à travers l'immersion dans une solution d'acide chlorhydrique (HCl 1M) (**Fig. 1**) suivie de trois rinçages successifs à l'eau distillée. Enfin, elles sont ensemencées à l'intérieur de contenants alvéolaires (1 graine par alvéole) remplis d'un mélange de sable, de tourbe et de perlite (1 : 1 : 1, v/v/v) et placés sur des tables de semis réchauffées sous un système de nébulisation de type *mist* (Humidité relative : 80 %) (**Fig. 2**). La scarification chimique permet d'obtenir les taux suivants de germination des graines : chez *Rosa canina* L. 33,5 %, chez *Rosa corymbifera* 22,5 %, chez *Rosa micrantha* Borrer ex Sm 63,4 % et chez *Rosa sempervirens* L. 81 %. Concernant le temps moyen de germination (T.M.G), *Rosa sempervirens* atteint une valeur de 52 jours, *Rosa canina* L. atteint 70 jours et *Rosa corymbifera* Bork. atteint 30 jours. Le recours à la scarification physique en immergeant les graines dans de l'eau chaude avant l'ensemencement permet d'atteindre des taux de germination fort modestes (*Rosa canina* L. 24,6 %, *Rosa corymbifera* Bork 3,8 %, *Rosa micrantha* Borrer ex Sm 5,7 %).

Bibliographie

Bo J, Huiru D, Xiaohan Y, (1995). Shortening hybridization breeding cycle of rose. A study on mechanisms controlling achene dormancy. *Acta Horticulturae* 404 pp 40-47.

Densmore R, Zasada JC, (1977). Germination requirements of Alaskan *Rosa acicularis*. *The Canadian Field-Naturalist* 91:1 pp 58-62.

Haouala F, Hajlaoui N, Cheikh-Affene ZB, (2013). Enhancing Seed Germination in Rose (*Rosa rubiginosa* L.). *Medicinal & Aromatic Plants*, 2:6.

Zhou ZQ, Bao WK, Wu N, (2009). Dormancy and germination in *Rosa multibracteata* Hemsl. & E. H. Wilson. *Scientia Horticulturae*, 119 pp 434-441.

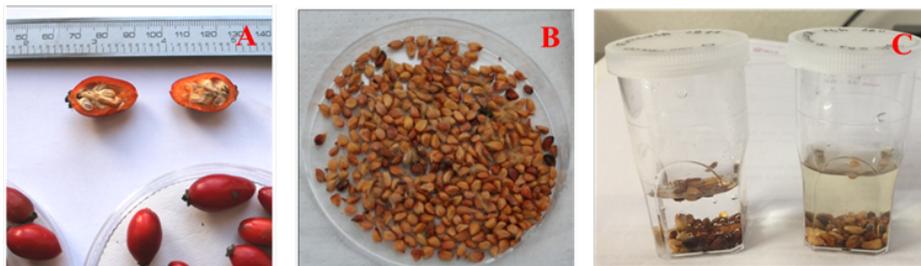


Fig.1 Estrazione dei semi di rosa (A). Semi di rosa posti ad asciugare prima della vernalizzazione (B). Semi di rosa trattati con HCl (C).



Fig.2 Semi di rosa germinati *in vivo* (A). Piantine di rosa propagate per seme (B). Piantina di rosa prima del trapianto (C).

Les plantes obtenues par propagation *in vivo* des espèces d'asperge sauvage et de rose seront conservées dans les locaux expérimentaux du CREA - DC de Bagheria (PA) afin de poursuivre les activités scientifiques prévues dans le projet ESPAS.

"Activité 3.3.2 Propagation *in vitro* des populations susmentionnées pour la production en nombre des plantes" - "Activité 3.3.3 Utilisation des techniques de multiplication des bourgeons axillaires sur les asperges/roses "

Propagation *in vitro* d'asperge sauvage (*Asparagus albus* L. et *Asparagus acutifolius* L.)

Dans les zones de diffusion de l'asperge sauvage, la possibilité de valoriser les zones agricoles marginales à travers la culture de certains écotypes locaux est évaluée depuis longtemps. Cela permettrait de rendre disponible sur le marché un produit typique, très apprécié d'un point de vue culinaire et salubre mais encore diffusé au niveau local seulement. Les turions émis par les plantes spontanées sont en effet récoltés et utilisés depuis toujours dans le régime des peuples méditerranéens. À la lumière des études menées sur leur composition, ils sont appréciés pour leur teneur en vitamine C, acide folique, caroténoïdes et vitamines du complexe B.

En Sicile, *Asparagus albus* L. et *Asparagus acutifolius* L. poussent à l'état spontané dans différents milieux : près des côtes, des oliveraies, des amanderaies et près de terres incultes. Les plantes sont normalement propagées *in vivo*, par graine ou par rhizome (griffe), mais les deux techniques, outre le fait qu'elles soient laborieuses et qu'elles requièrent beaucoup de temps, la plupart du temps ne garantissent pas l'obtention du matériel de propagation optimal pour un nouvel implant et limitent ainsi la culture.

En effet, la graine présente un faible pouvoir germinatif dû à une dormance primaire dont l'origine varie (physique, physiologique, morphologique, etc.), qui nécessite que la graine soit soumise à divers pré-traitements avant l'ensemencement afin d'augmenter le taux de germination.

À la lumière des problématiques soulevées, la micropropagation peut favoriser la propagation végétative de ces espèces, en raccourcissant les temps de production du matériel végétal et en permettant d'obtenir des plantes de qualité supérieure, génétiquement uniformes et saines d'un point de vue phytosanitaire. Les techniques *in vitro*, en effet, sont considérées comme des méthodes simples et fiables pour une propagation rapide des plantes, spécialement pour celles qui ont une importance d'un point de vue médicinal (Thomas *et al.*, 2005).

La micropropagation a débuté par la stérilisation superficielle des explants primaires qui sont introduits *in vitro* et transférés successivement sur un milieu de culture additionné de cytokinines dans le but de stimuler la prolifération de bourgeons. Ces derniers sont soumis à des subcultures afin d'en favoriser ultérieurement la prolifération et, enfin, d'en stimuler la production de racines

in vitro ou *ex vitro* pour produire des plantes complètes. Toutefois, bien que la technique de propagation *in vitro* a été amplement étudiée pour l'asperge la plus largement cultivée, *Asparagus officinalis* L. (Murashige *et al.*, 1972 ; Yang, 1977), pour les espèces sauvages, sa diffusion comme méthode de propagation végétative est entravée par certains inconvénients liés surtout à la phase de stabilisation *in vitro* et à la phase d'enracinement.

Au sein du projet ESPAS, un protocole de micropropagation a été développé pour favoriser une croissance *in vitro* rapide des bourgeons de deux espèces d'asperge sauvage (*Asparagus albus* L. et *Asparagus acutifolius* L.). En particulier, sont décrites la typologie de l'explant, la phase de stérilisation et de prolifération des bourgeons, l'enracinement et l'acclimatation pour la production clonale de plantes utiles à la repopulation des habitats naturels, la conservation du germoplasme et la culture durable de l'asperge sauvage.

Les plants mères d'asperge sont cultivés en pots et conservés dans une collection *in vivo* à l'intérieur d'une serre de propagation, au sein des locaux expérimentaux du CREA - DC de Bagheria. Les plantes dont le matériel végétal est à prélever pour la multiplication *in vitro* peuvent également être cultivées en plein champ mais la culture en pot dans des milieux propres est préférable car elle est plus simple pour en favoriser la croissance, surveiller les conditions physiologiques et limiter l'apparition de maladies. La qualité de l'explant et la réponse successive *in vitro* sont, en effet, influencées de façon significative par la vigueur, les conditions phytosanitaires et physiologiques des plants mères (Fay, 1992) et par la présence d'agents pathogènes terricoles (Withers, 1987). Pour une bonne conservation des plants mères, il est donc important de maintenir des taux d'humidité relative bas à l'intérieur de la serre, d'utiliser des contenants avec un volume adéquat et élevés au moins à 20 cm du sol, d'utiliser du terreau exempt de nématodes et des systèmes d'irrigation goutte à goutte. Enfin, traiter les instruments utilisés dans la serre avec une solution commerciale d'hypochlorite de sodium à 2 % pendant au moins 20 minutes constitue une bonne pratique.

1) Stérilisation superficielle des explants

Pour la phase d'introduction *in vitro*, les jeunes bourgeons (turions) d'une longueur d'environ 15 - 20 cm et de consistance herbacée sont récoltés. Habituellement, le prélèvement est effectué au printemps ou à l'automne, avant que les turions ne se ramifient, présentant alors une consistance plus coriace et formant les nouvelles ramifications du plant mère. Dans certains cas, il peut être utile de couper la partie aérienne de la plante en pot, de façon à stimuler l'émission de turions et pouvoir disposer d'une plus grande quantité d'explants primaires.

En laboratoire, le turion est découpé en segments nodaux d'une longueur comprise entre 2 et 3 cm, comprenant 1 ou 2 bourgeons latéraux (explants). Les explants avec les plus grandes dimensions permettent de créer des bourgeons *in vitro* plus rapidement, en augmentant toutefois considérablement le taux de contamination et en compromettant ainsi les phases de la micropropagation. Lors de la préparation des explants pour la phase de stérilisation, si la longueur du turion le permet, il est préférable d'éliminer la partie du turion la plus proche du milieu afin d'éliminer les polluants et d'éliminer la partie apicale car elle présente un faible taux d'enracinement *in vitro* (< 25 %).

La phase de stérilisation concerne la surface externe des explants et est nécessaire pour pouvoir lutter contre les contaminations par bactéries ou champignons qui peuvent compromettre la survie, la croissance et la multiplication *in vivo* des bourgeons. Les explants sont nettoyés avec de l'eau et du savon Lysoform pendant 30 minutes en agitation sur un agitateur magnétique et rincés à l'intérieur d'un tamis sous l'eau courante pendant 10 minutes (**Fig. 1**). Ensuite, ils sont immergés dans une solution d'alcool éthylique à 70 % pendant 1 minute à l'intérieur d'un contenant stérile et soumis à 3 rinçages à l'eau stérile. Enfin, les explants sont traités avec de l'hypochlorite de sodium commercial et 2 gouttes de détergent Tween20® pendant 5 minutes à l'intérieur d'un contenant stérile et rincés 3 fois avec de l'eau stérile. Entre deux passages, il est possible d'allonger le temps et le nombre de rinçages à effectuer avec l'eau stérile. Le recours au traitement à l'HCl pendant 5 minutes permet d'obtenir des taux de stérilisation égaux à 66,9 % pour *Asparagus acutifolius* et 46,6 % pour *Asparagus albus*.

Des temps d'immersion dans l'hypochlorite de sodium plus longs (jusqu'à 10 minutes) peuvent garantir un taux plus élevé d'explants stériles (93,4 % chez *A. acutifolius* et 83,4 % chez *A. albus*) mais ils comprennent l'augmentation du taux d'explants nécrosés (76,6 % chez *A. acutifolius* et 56,7 % chez *A. albus*), ce qui est probablement dû à sa pénétration consécutive à l'endommagement du tissu végétal.

2) Introduction *in vitro* et stabilisation des explants

Pour la phase d'introduction *in vitro*, on procède, sous une hotte à flux laminaire, au retrait des parties apicale et basale du tissu des explants stérilisés par un bistouri stérile en effectuant des coupes transversales. Enfin, les explants sont insérés à l'intérieur de flacons stériles contenant un milieu MS (Murashige et Skoog, 1962) (**Tab.1**). Le pH du milieu est défini à $5,7 \pm 0,1$ avec l'utilisation de solutions de NaOH ou d'HCl à 0,1 - 1 M avant d'ajouter l'agar. Les flacons sont transférés en chambre de culture à 24 °C avec une photopériode de 16 h et une intensité

lumineuse de $40 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ RPA (rayonnement photosynthétique actif) (**Fig. 2**). Il est d'une importance fondamentale de maintenir un environnement aseptisé à l'intérieur de la hotte à flux laminaire. C'est pourquoi le plan de travail doit être nettoyé fréquemment avec de l'alcool. Tous les instruments doivent être stérilisés en autoclave à $121 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 20 minutes à une pression de 1 kg/cm^2 , les bistouris et pinces doivent être reposés à l'intérieur d'un stérilisateur à chaque passage sous la hotte. Dans le cas de l'asperge, s'agissant d'un tissu végétal herbacé, il est nécessaire d'être vigilant et de ne pas utiliser d'instruments (bistouris et pinces) trop chauds qui pourraient endommager et compromettre les phases suivantes de micropropagation.

3) Multiplication *in vitro* des bourgeons

Après environ 4 semaines suivant la phase de stabilisation *in vitro*, les explants non pollués sont transférés à l'intérieur de contenants avec milieu MS avec ajout de benzyl adénine (BA), saccharose et agar (**Tab. 1**) pour démarrer la phase de multiplication. Pendant cette phase, les bourgeons sont transférés sur un nouveau milieu en moyenne toutes les 4 semaines (subculture) pour promouvoir la croissance et le développement de nouveaux bourgeons (**Fig. 2**). À chaque subculture, l'élimination de bourgeons qui présentent des tissus vitreux et l'éventuelle présence de cals constitue une bonne pratique. Il est nécessaire également de ne pas singulariser les bourgeons mais de les séparer en petits groupes en maintenant leur structure basale. L'utilisation de la BA comme cytokinine dans la phase de multiplication permet d'obtenir un taux de multiplication satisfaisant. En effet, 2,2 à 3,8 bourgeons sont émis dans le cas d'*A. acutifolius* et 1,6 à 4 bourgeons sont émis dans le cas d'*A. albus*.

En augmentant la concentration en BA, on obtient un taux de multiplication plus élevé (3,8 pour *A. acutifolius* et 4,0 pour *A. albus*). Toutefois, les bourgeons produits présentent des dimensions réduites et les taux de tissus hyperhydriques et de cals basaux augmentent. En se basant sur les résultats obtenus, l'apparition de tissus hyperhydriques augmente également avec l'augmentation des subcultures, tout comme l'incidence de l'apparition des contaminations bactériennes et le vieillissement précoce des plantes *in vitro*. C'est pourquoi il est préférable de ne pas prolonger la phase de multiplication *in vitro* au-delà de 4 - 5 cultures pour ces deux espèces d'asperge sauvage.

4) Enracinement *in vitro* et acclimatation

La phase d'enracinement consiste en la préparation de groupes de bourgeons obtenus *in vitro* lors de la phase de transfert en conditions de culture *ex vitro*. Les bourgeons provenant de la phase de multiplication sont divisés en groupe de 2 à 3 bourgeons en maintenant leur structure basale

et sont induites à l'enracinement sur milieu MS avec une concentration en sel réduite de moitié, contenant de l'acide indole butyrique (IBA) ou de l'acide naphthalène acétique (NAA), pendant 2 semaines. Enfin, les plantes sont transférées sur un milieu MS avec une concentration saline réduite de moitié et sans hormones pendant 4 semaines. Si les bourgeons sont singularisés, la partie basale subit des phénomènes d'oxydation ce qui entraîne la dégradation de la plantule *in vitro*. Les contenants sont placés à l'intérieur de chambres de cultures à 24 °C avec une photopériode de 16 h et la partie basale du contenant est placée dans l'obscurité pour favoriser l'émission de racines. La présence de NAA dans le milieu d'enracinement permet d'obtenir un taux d'enracinement de 40 à 46 % chez *Asparagus acutifolius* et de 26,7 à 33,3 % chez *Asparagus albus* tandis que l'utilisation d'IBA comporte la formation de cals à la base des groupes de bourgeons qui inhibe ainsi l'émission de racines chez les deux espèces.

Comme mentionné dans beaucoup de travaux scientifiques, le problème le plus courant lors de la propagation *in vitro* de l'asperge n'est pas tant la phase de stabilisation ou de multiplication des bourgeons mais celle de l'induction racinaire (Sharma *et al.*, 2018). Les études ont démontré que le taux d'enracinement peut dépendre de divers facteurs tels que par exemple l'espèce, la variabilité génétique à l'intérieur de l'espèce ou le type d'explants. Une attention particulière est également portée à la typologie et à la concentration des régulateurs de croissance utilisés dans le milieu d'enracinement.

Actuellement, les chercheurs du CREA - DC de Bagheria sont engagés dans le déroulement d'un essai expérimental qui prévoit l'utilisation de l'ancymidole dans la phase d'enracinement *in vitro* pour augmenter le taux d'enracinement des deux espèces d'asperge sauvage et le nombre de plantes à pouvoir acclimater *ex vitro*. Comme mentionné dans les ouvrages littéraires, pendant la propagation *in vitro* du genre *Asparagus*, l'induction racinaire est très difficile mais elle peut être promue en utilisant un retardateur de croissance comme l'ancymidole qui promeut le développement correct des bourgeons et réduit la formation de cals (Štajner, 2012). La phase d'acclimatation consiste à transférer les plantules enracinées *in vitro* dans des conditions d'humidité relative significativement inférieures et d'intensité lumineuse supérieure comparé aux conditions *in vitro*. Lors de cette phase, les plantules enracinées sont prélevées des contenants avec grand soin de façon à ne pas endommager les racines et on procède à leur lavage à l'eau déminéralisée afin d'éliminer les résidus de gélose. Les plantes enracinées sont transplantées sur un substrat stérile de tourbe et de perlite (1 : 1 v/v) et bien drainé à l'intérieur de contenants alvéolés et sont maintenues dans des conditions d'humidité relative élevée (sous un tunnel de

polyéthylène), d'intensité lumineuse réduite et à une température de 20 à 25 °C. Les plantes sont acclimatées en réduisant graduellement l'humidité relative et en augmentant l'intensité lumineuse, en ouvrant de manière graduelle la couverture en polyéthylène au cours des semaines suivant la transplantation.

Bibliographie

Fay MF (1992). Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 28 pp 1-4.

Murashige T and Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15 pp 473–497.

Murashige T, Shabde MN, Hasegawa PM, Takatori FH and Jones JB (1972) Propagation of asparagus through shoot apex culture. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 97 pp 158–161.

Sharma AK, Pandit J and Bhardwaj SV (2018). *In Vitro* Propagation of Wild *Asparagus adscendens* Roxb. using Nodal Explants. *Indian Journal of Hill Farming.* 31:1 pp 35-40.

Štajner N (2012). Micropropagation of *Asparagus* by In Vitro Shoot Culture. *Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants.* pp 341-351.

Thomas DT and Philip B (2005). Thidiazuron-induced high frequency shoot organogenesis from leaf-derived callus of a medicinal climber, *Tylophora indica* (Burm.F) Merrill. *In Vitro Cell.Dev.Biol- Plant.* 41 pp 124-128.

Withers L.A (1987). *In vitro* methods for germplasm collecting in the field. *Plant Genetic Resources*, 69 pp 2-6.

Yang H.Y (1977) Tissue culture technique developed for asparagus propagation. *HortScience* 12:2 pp 140–14.

Componenti	Stabilizzazione	Moltiplicazione	Radicazione
Macronutrienti	MS	MS	MS/2
Micronutrienti	MS	MS	MS/2
Vitamine	MS	MS	MS/2
BA (mg/L)	---	0-0,5-0,75	---
IBA (mg/L)	---	---	0,5-1
NAA (mg/L)	---	---	0,5-1
Saccarosio (g/L)	20	30	20
Agar (g/L)	5,8	5,8	5,8
pH	5,7±0,1	5,7±0,1	5,7±0,1

Tab.1 Composizione terreni delle fasi di propagazione *in vitro* di 2 specie di asparago selvatico. MS= Murashige & Skoog, BA= benziladenina, IBA= acido indolbutirrico, NAA= acido naftalenacetico.



Fig.1 Turioni di asparago selvatico raccolti dalla pianta madre (A). Porzioni di turioni prima della fase di sterilizzazione (B). Lavaggio porzioni di turione con sapone Lysoform in agitazione (C). Risciacquo sotto acqua corrente (D).

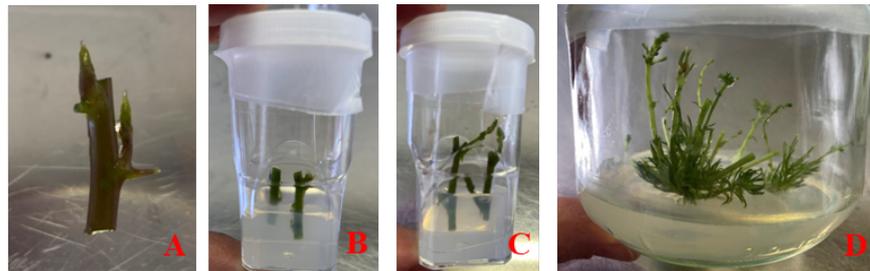


Fig.2 Espianto (A). Espianto introdotto *in vitro* (B). Ripresa vegetativa *in vitro* degli espianti (C). Germogli di asparago selvatico in fase di moltiplicazione *in vitro* (D).

Propagation *in vitro* de *Rosa* (*Rosa canina* L., *Rosa corymbifera* Bork, *Rosa micrantha* Borrer ex Sm, *Rosa sempervirens* L.)

La technique de propagation *in vitro* a été appliquée avec succès sur de nombreuses espèces afférentes au genre *Rosa* présentes dans le monde entier. Pour ce genre, utilisé à diverses fins productives (ornementale, alimentaire, cosmétique, médicinale), la micropropagation est adoptée comme une méthode alternative aux techniques classiques de propagation telles que le greffage, le bouturage et le marcottage et permet d'obtenir un grand nombre de plantes en peu de temps, génétiquement uniformes et saines en partant d'un faible nombre de plants mères. Bien que la multiplication végétative *in vivo* soit une technique prédominante chez les roses, elle ne garantit pas souvent une production de plantes saines et privées de maladies. D'autre part, la dépendance

à la saison et les faibles taux de multiplication constituent certains des autres facteurs principaux limitant la propagation conventionnelle (Pati *et al.*, 2006). La réponse aux conditions *in vitro* résulte le plus souvent génotype-dépendante dans toutes les phases de la micropropagation. C'est pourquoi il est nécessaire de développer des protocoles spécifiques pour chaque espèce. Concernant l'influence du génotype sur la prolifération des bourgeons *in vitro*, certaines études ont démontré qu'il existe des gènes responsables de l'augmentation du nombre de bourgeons initiaux et de la prolifération des bourgeons (Pati *et al.*, 2006). Dans la littérature également, il a été mentionné que l'implication du gène dans la variation des taux hormonaux est possible (Tantikanjana *et al.*, 2001)..

Les études menées jusqu'à l'heure actuelle sur les aspects de propagation des roses siciliennes spontanées sont très limitées (Fascella *et al.*, 2014), cela vaut aussi pour les essais expérimentaux conduits pour l'application des cultures *in vitro* à ces espèces autochtones. La définition de protocoles efficaces pour la production de plantes *in vitro* de ces espèces peut permettre de faciliter la diffusion et la valorisation du germoplasme rosicole local, caractérisé par un grand potentiel tant sur le point de vue ornemental-paysager que sur le point de vue agronomique-productif.

Les stèles de *Rosa* âgées d'1 an, d'une longueur d'environ 20 cm ont été coupées au printemps (avant la reprise végétative) à partir de plantes maintenues en plein champ et de plantes élevées en pots dans les locaux expérimentaux du CREA - DC de Bagheria. La conservation d'un état physiologique et sanitaire optimal des plants mères dont le matériel végétal est à prélever est essentielle pour pouvoir disposer d'explants adaptés à la mise en place de cultures aseptisées. C'est pourquoi les plants mères doivent être maintenus dans un milieu contrôlé qui permet une croissance correcte et qui limite l'apparition de maladies. Pour procéder correctement pendant les phases de micropropagation, il est nécessaire d'avoir une connaissance approfondie de l'état physiologique et phytopathologique du matériel végétal de départ. C'est pourquoi il est conseillé d'effectuer des contrôles permanents et précis des plants mères.

En laboratoire, les stèles de roses sont coupées en segments uninodaux d'une longueur d'environ 5 cm, avec des bourgeons axillaires et apicaux (microboutures) à utiliser pour la phase de stérilisation. Les phases de la micropropagation à partir de la phase de désinfection sont réalisées sous une hotte à flux laminaire de façon à maintenir les conditions de stérilité. D'autre part, les instruments et le matériel doivent être préalablement stérilisés en autoclave à 121 °C pendant 20 minutes à une pression de 1 kg/cm² avant d'être utilisés.

1) Stérilisation superficielle des explants

Les microboutures sont soumises à un lavage en agitation sur plaque magnétique avec de l'eau et du savon Lysoform pendant 20 minutes. En cas de présence importante d'épines, il est conseillé de nettoyer la surface des microboutures avec une petite brosse sous l'eau courante avant le lavage en immersion. On procède ensuite à un rinçage sous eau courante pendant 10 minutes à l'intérieur d'un tamis. Pour la phase de désinfection superficielle, on procède à l'immersion des microboutures dans une solution d'alcool éthylique à 70 % pendant 60 secondes à l'intérieur d'un contenant stérile suivie de trois rinçages à l'eau stérile. Les microboutures sont ensuite traitées avec de l'hypochlorite de sodium (5 % de sodium actif) plus quelques gouttes de l'agent mouillant Tween20® à l'intérieur d'un contenant stérile pendant 5 ou 10 minutes (selon la consistance plus ou moins herbacée du tissu) et rincées trois fois à l'eau stérile.

2) Introduction *in vitro* et stabilisation des explants

En laboratoire, sous une hotte à flux laminaire, les explants des microboutures stériles d'une dimension d'environ 2 cm à introduire *in vitro* sont récupérés. Dans cette phase, le retrait des épines présentes peut faire diminuer le taux de pollution mais, en contrepartie, il favorise la libération de phénols des tissus végétaux. Les explants prélevés en milieu aseptisé sont transférés à l'intérieur de flacons stériles contenant un milieu MS (Murashige e Skoog, 1962) (**Tab.1**) additionné de saccharose, d'agar, d'acide citrique pour contrebalancer la libération de phénols par la surface de la coupe des explants et sans aucun phytorégulateur de croissance (**Fig.1**). Alternativement à l'acide citrique, il est possible d'utiliser du PVP (polyvinylpyrrolidone), de l'acide ascorbique, du carbone actif à ajouter au milieu de stabilisation ou de recourir à des changements fréquents du milieu de culture (Rout *et al.*, 1999). Le pH du milieu est défini à $5,7 \pm 0,1$ avec l'utilisation de solutions de NaOH ou d'HCl à 0,1 - 1 M avant d'ajouter l'agar. Les flacons sont transférés en chambre de culture à 24 °C avec une photopériode de 16 h sous une lumière à une intensité lumineuse de 3 500 lux (tubes fluorescents Osram Lumilux White, Berlin, Allemagne).

3) Multiplication *in vitro* des bourgeons

Cette phase consiste à transférer les bourgeons obtenus des explants stériles sur des milieux dits de multiplication, caractérisés par des taux de cytokinines plus élevés par rapport au substrat utilisé pour la stabilisation *in vitro*. Après 4 semaines suivant la phase d'installation, les bourgeons de roses dont la culture a été débutée *in vitro* et qui n'ont pas été pollués sont transférés dans des contenants stériles renfermant un milieu de culture constitué de sels MS, de saccharose,

d'agar et de benzyl adénine (BA) comme cytokinine (**Tab. 1**). Le transfert des bourgeons est effectué en moyenne toutes les 3 semaines (subculture) selon l'espèce et le taux de prolifération des bourgeons (**Fig. 2**). À chaque subculture, les tissus vitreux et le cal s'étant formé à la base des bourgeons sont éliminés et sur ces derniers, la partie apicale est retirée de façon à contrebalancer le phénomène de dominance apicale. Pour la *Rosa canina* L. et la *Rosa sempervirens* L., il est possible d'atteindre un bon taux de multiplication, respectivement égal à 2,3 et 1,7 bourgeons en utilisant la BA à une concentration de 0,75 mg/L. Dans le cas de *Rosa corymbifera* Bork et de *Rosa micrantha* Borrer ex SM, on atteint des taux de multiplication respectivement égaux à 0,6 et 0,9 et présence de BA à une concentration de 0,75 mg/L. Les quatre espèces présentent des taux de multiplication satisfaisants en présence de BA aussi bien à une concentration de 0,5 mg/L qu'à une concentration de 0,75 mg/L.

L'utilisation d'une concentration en BA plus élevée comporte toutefois une apparition plus importante de tissus hyperhydriques et de cals chez ces deux espèces. Des taux de BA plus faibles, de 0 à 0,25 mg/L ne permettent pas un développement significatif de bourgeons axillaires *in vitro* chez les quatre espèces de roses.

4) Enracinement *in vitro* et acclimatation

Cette phase consiste à promouvoir l'émission de racines de la part des bourgeons *in vitro* en vue d'un transfert successif *ex vitro*. Les bourgeons sont donc singularisés et induits à l'enracinement sur un milieu MS, avec une concentration en sels réduite de moitié, contenant de l'acide indole acétique (IAA) (**Tab. 1**) (**Fig. 3**). Chez *Rosa canina* L., on atteint un bon taux d'enracinement *in vitro* (68,5 %) en utilisant l'IAA à une concentration de 0,6 mg/L. Dans le cas de *Rosa sempervirens*, en revanche, on atteint des taux élevés d'enracinement (91,8 %) sans devoir ajouter aucune hormone auxinique dans le milieu d'enracinement. Une concentration plus élevée d'IAA permet d'obtenir des taux d'enracinement plus importants également dans le cas de *Rosa micrantha* (32 %) et de *Rosa corymbifera* (19 %).

Pour l'acclimatation des bourgeons enracinés *in vitro*, ceux-ci ont été prélevés des contenants de façon à ne pas endommager les racines. Le système racinaire est immergé dans l'eau de façon à éliminer les résidus de gélose. Ensuite, les plantules sont plantées sur des tables de semis chauffantes à la base et pourvues d'un système de nébulisation de type *mist* (Humidité relative : 80 %) et placées dans de petits contenants avec du substrat à base de tourbe brune et de perlite (1 : 1, v/v) pour en favoriser l'acclimatation *ex vitro* (**Fig. 3**). Enfin, les plantules acclimatées

sont placées à l'air libre sous ombrière à 50 % de réduction de la radiation lumineuse. L'utilisation d'IAA dans l'induction de l'enracinement des bourgeons *in vitro* semble avoir une influence positive aussi sur la phase d'acclimatation de la *Rosa canina* L. et de la *Rosa sempervirens* L., qui, traitées ainsi, réussissent à atteindre un taux d'acclimatation respectivement de 51,3 % et 37,3 %.

Bibliographie

Fascella G, Maggiore P, Giardina G (2014). Propagazione vegetativa e gamica di rose siciliane autoctone. Atti X° Convegno Nazionale sulla Biodiversità, Roma 3-5 settembre, pp 69-76.

Murashige T and Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15 pp 473–497.

Pati PK, Rath SP, Sharma M, Sood A, Ahuja PS (2006). In vitro propagation of rose—a review. *Biotechnology Advances*, 24:1, pp 94-114.

Rout GR, Samantaray S, Mottley J, Das P (1999). Biotechnology of the rose: a review of recent progress. *Scientia Horticulturae*, 81:3 pp 201-228.

Tantikanjana T, Yong JW, Letham DS, Griffith M, Hussain M, Ljung K, Sandberg G, Sundaresan V (2001). Control of axillary bud initiation and shoot architecture in *Arabidopsis* through the SUPERSHOOT gene. *Genes Dev* 15 pp 1577–1588.

Componenti	Stabilizzazione	Moltiplicazione	Radicazione
Macronutrienti	MS	MS	MS/2
Micronutrienti	MS	MS	MS/2
Vitamine	MS	MS	MS/2
BA (mg/L)	---	0-0,25-0,5-0,75	---
IAA (mg/L)	---	---	0-0,3-0,6
Saccarosio (g/L)	30	30	30
Acido citrico (mg/L)	50	---	---
Agar (g/L)	8	8	8
pH	5,7±0,1	5,7±0,1	5,7±0,1

Tab.1 Composizione terreni delle fasi di propagazione *in vitro* di 4 specie di rose. MS= Murashige & Skoog, BA= benziladenina, IAA= acido indolacetico.



Fig.1 Espianti di rosa introdotti *in vitro* (sinistra). Espianti di rosa in ripresa vegetativa su terreno di stabilizzazione.

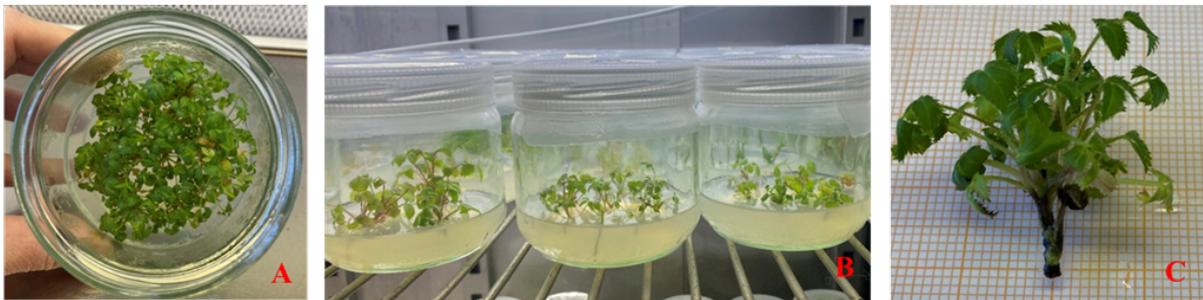


Fig.2 Germogli di rosa in fase di moltiplicazione *in vitro* (A). Piantine *in vitro* in camera di vegetazione (B). Piantina di rosa propagata *in vitro* (C).



Fig.3 Piantine di rosa radicate *in vitro* (A). Piantine di rosa ambientate *ex-vitro* (B). Piantine di rosa dopo il travaso in serra di propagazione (C).

Les plantes obtenues par propagation *in vitro* des espèces d'asperge sauvage et de rose seront conservées au laboratoire de micropropagation du CREA - DC de Bagheria (PA) afin de poursuivre les activités scientifiques prévues dans le projet ESPAS.

"Activité 3.3.4 Études pour l'amélioration des protocoles *in vitro* utilisés sur les câpres de Pantelleria"



1. Multiplication par bourgeons latéraux

1.1 Introduction *in vitro*

1.1a Stérilisation

1.1b Substrat de croissance

1.2 Phase de multiplication

1.3 Phase d'enracinement

2. Propagation par graine

Le matériel végétal a été prélevé lors de la première moitié du mois d'avril (pour la micropropagation) et dans la seconde moitié du mois de juillet (graines) des génotypes *C. spinosa* L. subsp. *inermis* récupéré auprès de l'Université de Palerme et *C. spinosa* L. subsp. *spinosa* dont le Jardin Botanique de Palerme possède une collection.



Fig.1 *C. spinosa* L. subsp. *inermis*



Fig.2 *C. spinosa* L. subsp. *spinosa*

1. Multiplication par bourgeons latéraux

1.1 Introduction *in vitro*

Les explants (10 de chaque génotype), ont été soumis à un traitement à 4 °C pendant 24 h tout de suite après leur récolte. À partir de 10 explants, 50 boutures uni-bi nodales pourvues de bourgeons axillaires ont été obtenues.

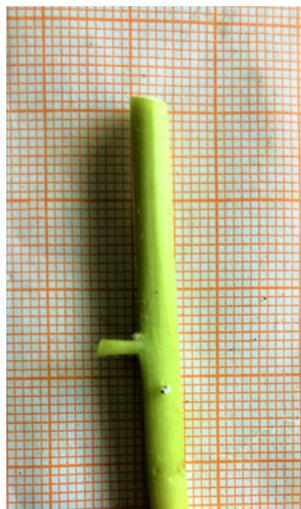
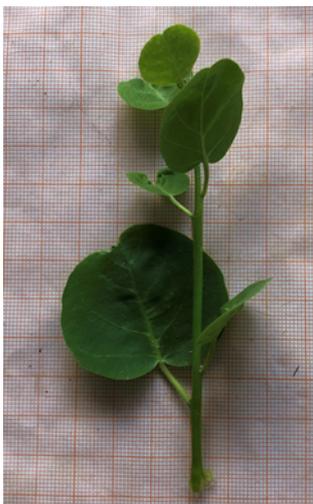


Fig. 3,4,4.1. Explants de *C. spinosa* L. subsp. *inermis*

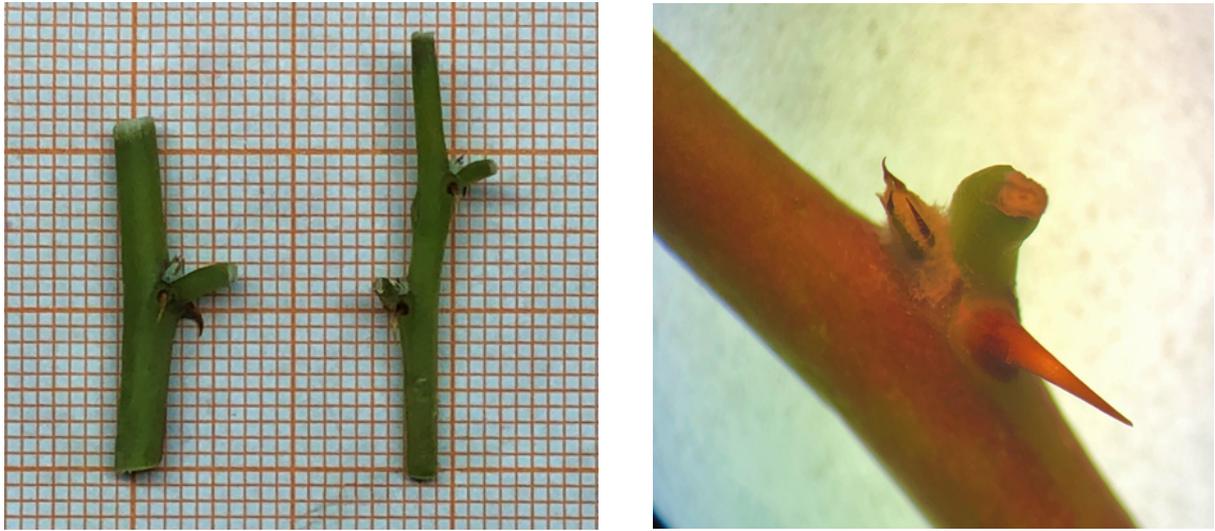


Fig. 5,5.1 Explants de *C. spinosa* L. subsp. *spinosa*

1.1a Stérilisation

Successivement au pré-traitement à 4 °C, les explants ont été privés de leurs feuilles et ont été coupés en segments uniformes uni ou binodaux (Fig. 3, 4 e 5). Ils ont été laissés sous eau courante (froide) pendant 1 heure (Fig. 6), et ont ensuite été placés dans un b cher avec de l'eau distillée et un détergeant commercial avec un dosage de 10 mL/L en agitation permanente pendant 1 h (Fig. 7). Enfin, deux rinçages à l'eau distillée de 5 minutes chacun ont été effectués.

Le protocole de stérilisation est complété sous hotte à flux laminaire et prévoit : 5 minutes d'immersion dans de l'éthanol à 70 % (Fig. 8), successivement deux rinçages à l'eau distillée stérile et enfin 20 minutes d'immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 10 % (eau de javel du commerce) avec quelques gouttes de Tween 20. On termine par 3 rinçages de 5 minutes chacun avec de l'eau distillée stérile.



Fig. 6



Fig. 7



Fig. 8

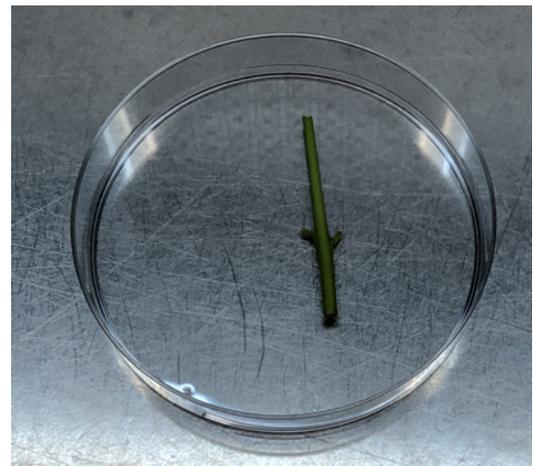


Fig. 9

1.1b Substrat de croissance

Immédiatement après la phase de stérilisation, les explants ont été placés sur un substrat de stabilisation (Tab. 1) dans des contenants de polypropylène pourvus d'un filtre (ECO2BOX Duchefa) (Fig. 10).

Après environ deux semaines, le bourgeonnement des bourgeons axillaires a été observé, avec un taux de survie d'environ 80 % (Fig. 13, 13.2, 14).

Tab. 1 Substrat de stabilisation

1X	Murashige & Skoog Basal Salts
30 gL ⁻¹	Saccharose
100 mgL ⁻¹	Myo-inositol
1,5 mgL ⁻¹	Benzyl Amino Purine (BAP)
0,08 mgL ⁻¹	Acide Indole Butyrique (IBA)
0,1 mgL ⁻¹	Acide Gibbérellique (GA ₃)
7 gL ⁻¹	Agar
pH	5,8

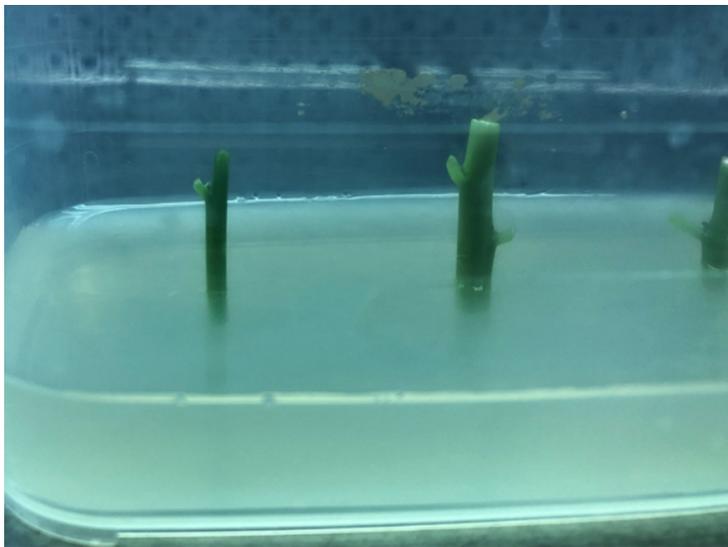


Fig. 10 Explants de *C. spinosa* L. subsp. *inermis* introduits *in vitro*



Fig. 11 et 12 Bourgeonnement de *C. spinosa* L. subsp. *inermis*

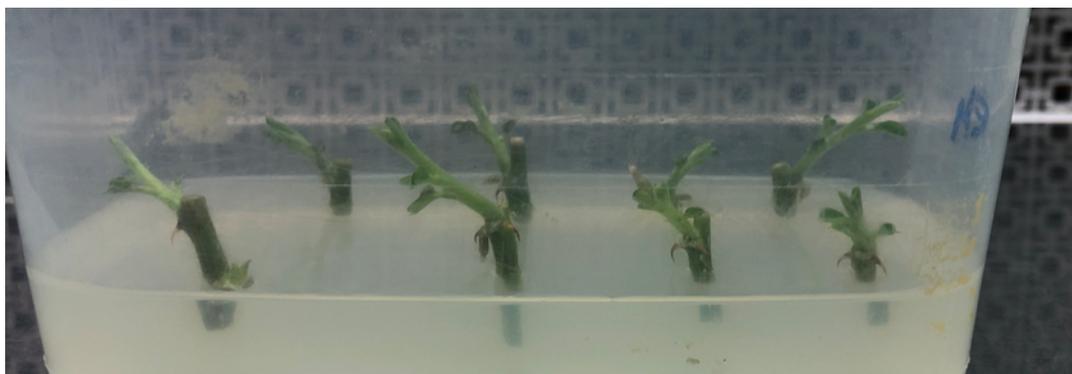


Fig. 13 Bourgeonnement de *C. spinosa* L. subsp. *spinosa*



Fig. 13.2 *C. spinosa* L. subsp. *spinosa*

1.2 Phase de multiplication

Suite à la stabilisation *in vitro* des explants, il en résulte une augmentation du stock de plantes nécessaire. Deux milieux de culture, indiqués comme CAP-M et CAP-C, dont la composition est indiquée respectivement dans les tableaux 2 et 3, ont montré une efficacité considérable.

Le substrat CAP-C a été mis au point dans des études précédentes (Germanà, M. A., & Chiancone, B. “In vitro germination and seedling development of caper (*Capparis spinosa* L.) mature seeds”).



Fig. 14 *C. spinosa* L. subsp. *spinosa* sur CAP-M

CAP-M	
1X	Murashige & Skoog
30 gL ⁻¹	Saccharose
1,5 mgL ⁻¹	Méta-topoline
0,05 mgL ⁻¹	Acide Indole Butyrique (IBA)
7 gL ⁻¹	Agar
pH 5,8	

Tab.2 Substrat de multiplication CAP-M

CAP-C	
1X	Murashige & Skoog
30 gL-1	Saccharose
1,45 mgL-1	Benzyl Amino Purine (BAP)
0,4 mgL-1	Acide Naphtalène Acétique (NAA)
0,7 mgL-1	GA3
7 gL-1	Agar
pH 5,8	

Tab.2 Substrat de multiplication CAP-C

1.3 Phase d'enracinement

Après avoir atteint un nombre satisfaisant de plantules multipliées, la phase suivante est celle de l'induction de l'enracinement. Les plantules sont transférées sur un milieu de culture privé d'hormone (Tab. 3) et conservé pendant 3 semaines. Les racines éventuellement émises dans ces conditions ne sont toutefois pas suffisantes en termes de nombre et de longueur. Par conséquent les plantes sont également transférées sur un milieu enrichi en hormones pour l'enracinement (auxines) (Tab. 4)

1X	Murashige & Skoog
30 gL-1	Saccharose
7 gL-1	Agar
pH 5,8	

Tab.3 Substrat d'enracinement 1

1X	Murashige & Skoog
30 gL ⁻¹	Saccharose
0,8 gL ⁻¹	Acide Naphtalène Acétique (NAA)
0,3 gL ⁻¹	Acide Indole Butyrique (IBA)
7 gL ⁻¹	Agar
pH 5,8	

Tab.4 Substrat d'enracinement 2

2. Propagation par graine

Pour évaluer le pouvoir germinatif des graines de *C. spinosa* L. subsp. *inermis* et *C. spinosa* L. subsp. *spinosa*, un total de 10 fruits par génotype a été prélevé, à partir de la moitié du mois de juillet pour les graines immatures (blanches) et successivement pour les graines matures (noires). Le choix d'évaluer la capacité germinative aussi avec les graines « blanches » est lié à la problématique de la dormance qui caractérise les graines de cette espèce et qui s'avère être corrélée à l'épaisseur du tégument externe.

En ce qui concerne l'étude des graines matures et des graines immatures, celles-ci ont été soumises à un pré-traitement à 40 °C pendant 1 heure dans l'eau chaude et successivement à un traitement mécanique de scarification mécanique du tégument.

Le comportement de ces graines a été comparé à celui des graines sans aucun traitement.

Le protocole de stérilisation est le même pour les deux typologies de graines et est mentionné ci-dessous.

Laisser les graines en immersion dans une solution à 20 % d'hypochlorite de sodium pendant 10 min. Rincer successivement sous eau courant pendant 5 minutes et laisser sécher au moins 12 h sur des feuilles de papier essuie-tout.

Compléter le processus dans des conditions d'asepsie.

Laisser les graines en immersion pendant 3 minutes dans de l'éthanol à 70 % suivi d'un rinçage à l'eau distillée stérile.

Laisser les graines en immersion pendant 20 minutes dans une solution d'eau de javel commerciale à 25 % avec quelques gouttes de Tween 20 puis poursuivre avec au moins 3 rinçages de 3 à 4 minutes chacun avec de l'eau distillée.

Une fois la stérilisation terminée, les graines sont placées par 8 dans chaque boîte de Pétri de 60 mm Ø sur substrat CAP-C (Tab. 2) et conservés dans l'obscurité pendant environ 30 jours.



Fig. 15 et 15.2 Fruit immature de *C. spinosa* L. subsp. *inermis* avec des graines « blanches »

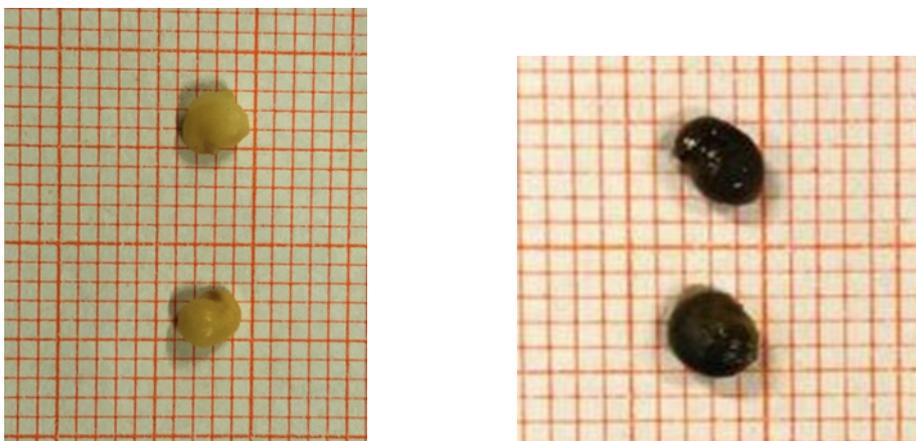


Fig. 16 et 16.2 Graines immatures et matures de *C. spinosa* L. subsp. *inermis*

