

Université des Sciences de la Vie de
Varsovie
Faculté d'horticulture et d'architecture paysagère

Olga Zofia Wardziak

Déterminants environnementaux et développementaux de la variabilité de l'aspérule odorante *Galium odoratum* (L.) Scop.

Auto-évaluation de la thèse de doctorat



Les travaux ont été réalisés sous la
supervision du Dr Hab. Ewa Osińska (professeur agrégée
à WULS-SGGW) au Département des plantes potagères et médicinales

Réviseurs :

prof. doctorat Zenon Węglarz Faculté
d'horticulture et d'architecture paysagère Département des
plantes potagères et médicinales Université des sciences
de la vie de Varsovie

prof. doctorat Jan Dyduch Faculté
d'horticulture, Département
des plantes potagères et médicinales, Université des
sciences de la vie de Lublin

Varsovie, 2010

INTRODUCTION ET OBJECTIF DU TRAVAIL

Aspérule des bois *Galium odoratum* (L.) Scop. est une plante médicinale. Son activité pharmacologique est principalement liée aux coumarines contenues dans la plante. L'aspérule des bois est obtenue exclusivement à partir de plantes trouvées dans des lieux naturels. Cette plante, pour des raisons climatiques et une gestion forestière pas toujours rationnelle, est en danger d'extinction. Il est donc soumis à la protection légale des espèces.

Une méthode efficace de protection de l'aspérule présente en milieu forestier semble être son introduction en culture. Cependant, cela nécessite des recherches sur, entre autres, la variabilité intraspécifique et le développement des plantes, y compris les mécanismes de reproduction, l'impact des facteurs environnementaux sur le développement et la dynamique d'accumulation de composés biologiquement actifs dans la plante.

Ce travail a principalement porté sur :

- déterminer l'étendue de l'habitat, la diversification génétique et chimique des populations d'aspérules sauvages présentes dans des régions sélectionnées de Pologne, • retracer la différenciation inter-population des caractéristiques morphologiques et développementales, déterminer l'échelle de variabilité de ces caractéristiques chez les plantes provenant d'emplacements naturels et cultivés. , • déterminer la teneur et la composition chimique de groupes sélectionnés de composés biologiquement actifs au cours du développement ontogénétique des plantes dans des sites naturels et en culture,
- déterminer l'impact de facteurs agrotechniques sélectionnés sur le rendement et la composition chimique herbe d'aspérule,
- déterminer les méthodes optimales d'extraction de l'aspérule et déterminer l'activité antioxydante des extraits obtenus.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Les recherches menées ont inclus un cycle de trois ans (2005-2008) d'expérimentations sur le terrain, sur le terrain et en laboratoire, et ont concerné :

- des études de terrain des populations d'aspérule odorante,
- des analyses développementales et phytochimiques de populations sélectionnées en conditions naturelles et de culture,
- évaluation de l'efficacité de la reproduction générative et végétative de cette espèce, évaluation
- de l'impact de facteurs environnementaux et de culture sélectionnés sur le rendement et la composition chimique de la matière
- première, évaluation de l'impact des conditions d'extraction sur la composition chimique de la
- extraits obtenus, évaluation de l'activité antioxydante des extraits.

1. Recherche sur le terrain. Sélection des sites

Deux régions de Pologne ont été sélectionnées comme zones de recherche, appartenant aux plus importantes en termes de diversité et d'abondance de sites naturels de *Galium odoratum* (Fig. 1).

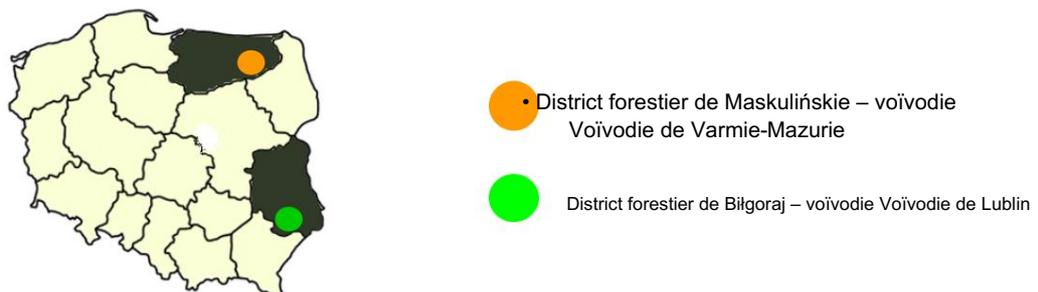


Fig. 1. Domaine de recherche sur le terrain

Analyse phytosociologique des communautés végétales

Dans les zones retenues pour la recherche, 20 sites naturels d'aspérule odorante ont été sélectionnés sur la base de données floristiques. La localisation exacte des stands a été possible grâce au récepteur Philips GPS (Global Positioning System). Les observations ont été réalisées au printemps, en été et en automne durant deux périodes de croissance des plantes. La zone de photographies phytosociologiques a été sélectionnée subjectivement (échantillon biaisé), c'est-à-dire que des communautés végétales caractérisées par une part importante d'aspérule odorante ont été décrites (Zaręba 1988). Lors du recensement des espèces, l'échelle quantitative et de sociabilité selon Braun-Blanquet (1964) a été utilisée. Les espèces individuelles ont été attribuées aux unités syntaxonomiques correspondantes (Matuszkiewicz 2001). Les photos ont été regroupées dans un tableau récapitulatif et soumises à une classification numérique, ce qui a facilité l'interprétation des objets organisés. La méthode d'agglomération a été utilisée dans l'étude. Afin de distinguer des groupes de communautés floristiquement homogènes, les données structurées ont été saisies dans le programme SPSS et les résultats ont été présentés graphiquement sous la forme d'un dendrogramme, qui montre les similitudes entre les photos phytosociologiques. La distance euclidienne a été utilisée comme mesure de similarité basée sur le nombre d'espèces (Sneath et Sokal 1973), et le regroupement hiérarchique des photos a été réalisé à l'aide de la méthode de Ward. À l'aide des numéros d'indicateurs écologiques des plantes vasculaires polonaises (Zarzycki et al. 2002), les indicateurs suivants ont été déterminés pour chaque site : la teneur en matière organique, l'acidité et l'humidité du sol et l'indicateur lumineux.

Contenu absolu en ADN nucléaire et niveau de polyploïdie

La teneur en ADN nucléaire a été déterminée par cytométrie en flux (FCM) dans le laboratoire du Département de génétique et de sélection végétale de l'Université d'agriculture et de technologie de Bydgoszcz. La méthode utilisée consiste à analyser l'intensité de fluorescence des noyaux colorés aux fluorochromes (Śliwińska 1993). Le matériel de recherche était constitué de jeunes feuilles de 60 plantes provenant de 20 populations étudiées provenant de sites naturels. Les feuilles de *Brassica napus* cv ont été utilisées comme étalon interne.

'Bore' (2C=2,18 pg). Les échantillons ont été préparés selon la procédure décrite précédemment (Thiem et Śliwińska 2003) avec des modifications mineures. Environ 5 000 à 10 000 noyaux cellulaires ont été analysés dans chaque échantillon. La teneur absolue en ADN nucléaire a été calculée en utilisant une relation linéaire entre les positions des pics 2C de *Galium odoratum* et de *Brassica napus*.

Développement de végétaux en milieu naturel avec des modes d'obtention de matières premières diversifiés

L'objectif de la recherche était de déterminer l'impact de différentes méthodes d'obtention d'herbes sur le développement des plantes dans des milieux naturels et sur l'accumulation de composés biologiquement actifs dans la matière première. L'étude a été réalisée en 2007/2008 sur un site naturel de la ville de Żelwęgi, située dans la région forestière de Maskulińskie. La population d'aspérules y couvrait une superficie d'environ 30 m²

, s'est caractérisé par une forte croissance et des effectifs importants.

Neuf parcelles de 1 m² ont été désignées au hasard sur le site . Les tests ont été effectués en triple.

En 2007, dans les parcelles désignées, les herbes aromatiques ont été récoltées en pleine floraison de la manière suivante : • coupe à mi-

hauteur des pousses, • coupe au sol, • sans coupe (contrôle).

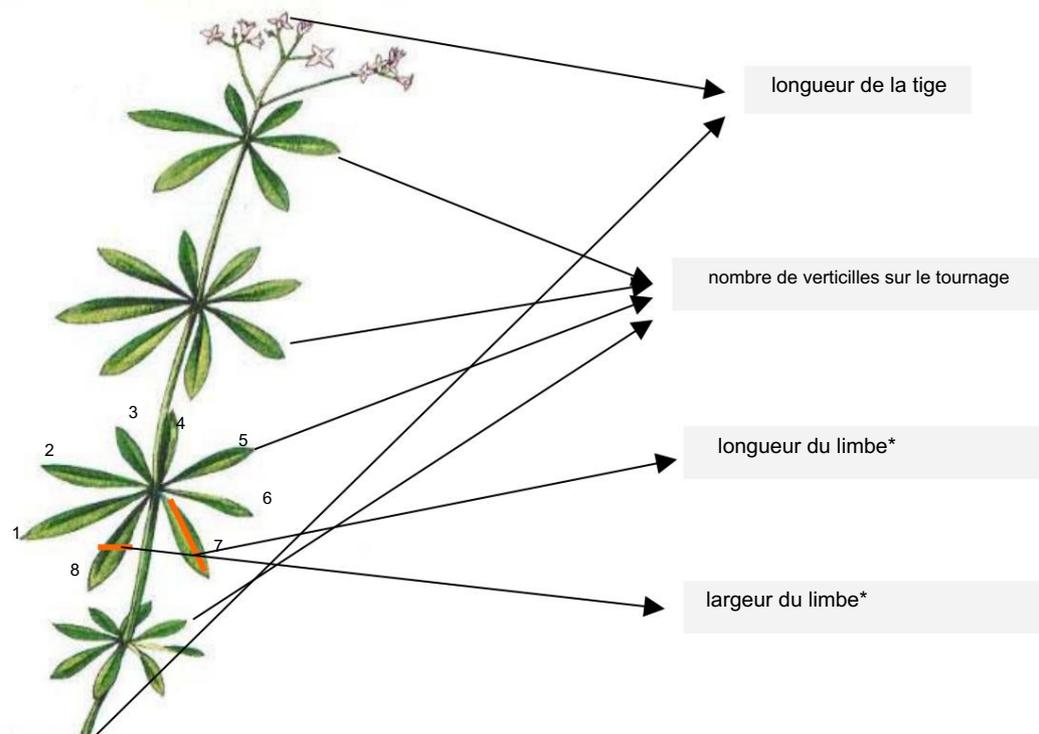
Au printemps 2008 (d'avril à mi-mai), des mesures biométriques des caractéristiques individuelles des plantes ont été effectuées dans chaque parcelle (Fig. 2). Cette année, les herbes ont été récoltées dans les parcelles une fois lorsque les plantes étaient en pleine floraison, c'est-à-dire en mai. Le poids des herbes fraîches et sèches a été déterminé. La teneur en coumarines dans l'herbe séchée à l'air a été déterminée à l'aide de la méthode spectrophotométrique selon Wierzchowska-Renke et Stecka (1976), en acides polyphénoliques (calculés en acide caféique), en glycosides iridoïdes (calculés en aucubine), selon FP VI (2002).).

2. Analyse développementale et phytochimique de populations sélectionnées dans des conditions naturelles et cultivées

Évaluation des caractéristiques morphologiques et développementales des plantes

Les caractéristiques morphologiques des plantes ont été évaluées sur 20 sites naturels et cultivés toutes les deux semaines de mai à octobre en 2006 et 2007 (Fig. 2). L'expérience sur le terrain a été mise en place au printemps 2006 en plantant, à un espacement de 60 x 30 cm, des semis à deux nœuds préalablement enracinés provenant d'emplacements naturels, 30 morceaux pour chaque population. Le sol a été paillé avec un substrat d'écorce. Les moyennes arithmétiques, l'écart type et le coefficient de variation ont été calculés pour chaque caractéristique analysée.

En 2007, des herbes ont été récoltées deux fois sur des sites naturels et cultivés (la deuxième année de végétation végétale) - pendant la pleine floraison et après la floraison. L'herbe a été collectée sur 10 plantes sélectionnées au hasard dans chaque population, laissant les deux verticilles de feuilles inférieures. Ensuite, l'herbe a été séchée dans un séchoir à une température de 30 °C avec un débit d'air de 0,2 à 0,25 m s⁻².



* tout au long de la saison de croissance, des mesures ont été prises de la longueur et de la largeur des feuilles à 3 verticilles du sommet de la pousse. Fig. 2. Caractéristiques morphologiques et développementales observées de l'aspérule.

Afin d'évaluer d'innombrables caractéristiques morphologiques et développementales des plantes, un propre classificateur a été développé conformément aux directives de l'Institut international des ressources phytogénétiques et en utilisant les données de la littérature (Pawłowski 1977, Szafer 1988).

Tests phytochimiques (méthodes)

La matière première obtenue en deux étapes de développement végétal à partir de sites naturels et de culture a été soumise à des analyses chimiques dans le laboratoire KRWiL. La teneur en composés biologiquement actifs testés a été exprimée sur la base du poids sec. La teneur des composés suivants a été déterminée dans les matières premières : somme des coumarines (selon la méthode spectrophotométrique selon Wierzchowska-Renke et Stecka (1976)), somme des acides polyphénoliques exprimée en acide caféique (selon FP VI 2002), somme de glycosides iridoïdes exprimés en aucubine (selon FP VI 2002). La coumarine a été analysée quantitativement par chromatographie sur couche mince (TLC) selon FP VI (2002), et la composition des composés biologiquement actifs (coumarines, acides polyphénols, flavonoïdes) a été analysée par chromatographie liquide haute performance (HPLC). L'activité antioxydante des extraits a été évaluée à l'aide des méthodes DPPH (Chen et Ho 1997) et FRAP (Benzie et Strain 1999).

3. Évaluation de l'efficacité de la reproduction générative et végétative

Reproduction générative Dans le

cadre des recherches sur la multiplication générative de l'aspérule odorante, des expérimentations ont été réalisées pour déterminer l'impact de la méthode de stratification sur la germination des graines et l'impact de l'âge des graines et de la méthode « d'endommagement de l'enveloppe de la graine » sur le nombre de plants développés.

Le sujet de l'étude était les fruits (graines) de l'aspérule récoltés en 2007 sur des plantes situées dans des lieux naturels. Les graines ont été récoltées de manière aléatoire lorsque 80 % des fruits étaient complètement mûrs. Les fruits mal colorés et les petits fruits étaient considérés comme non mûrs.

L'influence de la méthode de stratification sur la germination des graines

La valeur de semis des graines a été testée en laboratoire en déterminant l'énergie et la capacité germinative. Les graines ont été divisées en deux parties : fruit râpé mécaniquement (o), fruit non abrasé (n). Les graines ainsi préparées ont été soumises aux méthodes de stratification suivantes : trempage dans de l'eau froide pendant 24 heures ou 3 minutes dans de l'eau à 60-70°C, puis semis dans le substrat ou mise dans un sac en plastique au réfrigérateur pendant 30 semaines (température 2°C) sans accès à la lumière, tremper pendant 20 minutes dans 0,5 ml d'acide sulfurique et semer dans le substrat ou placer dans un sac en plastique au réfrigérateur pendant 30 semaines (temp. 2°C) sans accès à la lumière, ou à sec (non gonflé).) les graines ont été semées directement dans le substrat. La stratification à 2 °C a été réalisée dans un réfrigérateur SANYO CHL 350 T B10/350 T B10. Après une période de 30 semaines, les graines ont été transférées du réfrigérateur dans des conditions de lumière (10 h du jour - intensité d'irradiation PAR de 30 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 14 h de la nuit) et de température (20 °C) contrôlées.). Au cours des semaines suivantes, des observations ont été faites sur la germination des graines ainsi que sur la croissance et le développement initial des plantules.

L'influence de l'âge des graines et de la méthode « d'endommagement de l'enveloppe de la graine » sur le nombre de plants développés

Les fruits ont été stratifiés pendant 8 semaines dans du sable humide, à une température de 4°C, sans accès à la lumière. Passé ce délai, ils ont été divisés en trois parties de 25 graines chacune : fruits entiers - témoin, fruits dont le tégument est complètement enlevé (embryons isolés), fruits dont 1/3 du tégument est enlevé au niveau de la racine embryonnaire. .

Les graines ainsi préparées ont été placées sur des boîtes de Pétri avec du milieu MS/B5 modifié sans régulateurs de croissance selon Gamborg et al. (1965). L'expérience a été réalisée à une température de 24°C et l'intensité d'irradiation PAR était de 10 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Au cours des semaines suivantes, des observations ont été faites sur la germination des graines ainsi que sur la croissance et le développement des plantules.

Multiplication végétative

Multiplication par bouturage

Le but de l'expérimentation était de déterminer l'influence du type de boutures, de la date de leur retrait de la plante mère et du type de substrat sur l'enracinement des boutures.

Facteur A – type de plants :

Facteur B – date de prélèvement
des plants (dans des lieux naturels) :

Facteur C – type de support :

- boutures herbacées (du sommet des pousses

à deux verticilles de feuilles) -

boutures de pousses de stolon : à

quatre nœuds, à trois nœuds, à

deux nœuds, à un nœud

- printemps (IV)

- automne (X)

- perlite

- tourbe désacidifiée (pH 5,7) -

tourbe non désacidifiée (pH 4,5)

Les plants prélevés sur des sites naturels ont été hormonisés puis placés dans des récipients remplis de perlite ou de tourbe.

L'expérience a été réalisée en trois répétitions pendant une période de huit semaines en serre, sous une humidité élevée.

Chaque répétition contenait 50 plants.

Micropropagation Les

expériences ont été réalisées en plusieurs étapes au cours des années 2006-2008 dans le laboratoire de culture tissulaire du KRWiL. Le matériel de départ était constitué de plantes provenant de sites naturels. Dans un premier temps, l'impact de la méthode de désinfection (hypochlorite de sodium et chloramine T) sur l'efficacité d'obtention d'explants viables a été déterminé. Dans les étapes suivantes de l'étude, l'efficacité de la désinfection des explants apicaux et nodaux a été comparée en fonction de la date de leur collecte (printemps, été et automne) et l'influence de la composition du milieu sur le développement des explants initiaux a été déterminée. .

Les explants ont été placés individuellement dans des tubes à essai avec du milieu MS (Murashige et Skoog 1962) :

- a) sans régulateurs de croissance, b) contenant 0,1 mg·dm⁻³ de 6-benzyladénine (BA) et 0,01 mg·dm⁻³ d'acide naphthyl-1-acétique (NAA), c) contenant 0,1 mg·dm⁻³ de 6-benzyladénine (BA), d) contenant 1,0 mg·dm⁻³ d'acide gibbérellique (GA3) e) contenant 0,5 mg·dm⁻³ d'acide gibbérellique indole acétique (IAA).

L'influence des cytokinines sur le développement des pousses issues des bourgeons latéraux de l'aspérule a également été déterminée. L'expérience a utilisé du milieu MS additionné de 30 g·dm⁻³ de saccharose et de 6,5 g·dm⁻³ d'agar. De la kinétine ou du BA ont été ajoutés au milieu à des concentrations de 1,0 ; 2,5 ; 5,0 mg·dm⁻³, avec l'ajout de 0,01 mg·dm⁻³ NAA ou sans ajout d'auxine. Le témoin était un milieu basal sans régulateurs de croissance. Deux niveaux d'irradiation par lumière fluorescente ont été utilisés : 7,5 et 33,0 µE m⁻²·s⁻¹. Cinq explants ont été placés dans des récipients de culture en polypropylène contenant 100 ml de milieu. Toutes les expériences ont été réalisées dans une salle de croissance avec une photopériode de 16 heures et une température de 24°C. Après 12 semaines, la longueur et le nombre de pousses produites à partir d'un explant ainsi que le nombre de nœuds sur les pousses nouvellement produites ont été déterminés.

4. Évaluation de l'impact de certains facteurs environnementaux et de culture sur le rendement et la composition matière première chimique

Des recherches agrotechniques ont été réalisées entre 2006 et 2008 au champ expérimental KRWiL à Wilanów-Zawady.

L'influence de l'ombrage sur le développement des plantes, le rendement et la qualité des matières premières

La recherche a été menée en 2006-2007. Le matériel de départ pour la mise en place de l'expérience au printemps 2006 était des semis à deux nœuds avec des stolons et des pousses prélevés dans un site naturel près de la ville de Zelwégi (région de Varmie-Mazurie). L'expérience a été mise en place selon la méthode des blocs randomisés avec trois répétitions. Les plantes ont été plantées dans le sol à un espacement de 30x30, 60 plantes à chaque répétition.

Les variantes d'intensité lumineuse suivantes ont été utilisées : en plein soleil, sous une seule ombre, sous une double ombre. Pendant toute la durée de l'expérimentation, l'intensité lumineuse a été mesurée (quatre fois par mois à l'aide d'un phytophotomètre SONOPAN RF-100. En 2006 (de mai à octobre), des tests biométriques des plantes ont été réalisés toutes les 4 semaines. En 2007, lorsque les plantes étaient en phase générative, l'herbe a été récoltée (récolte de printemps), en coupant les plantes au-dessus du deuxième verticille (en comptant à partir du sol). La deuxième coupe de l'herbe a été réalisée pendant la phase végétative du développement de la plante, en automne. d'herbe fraîche et séchée à l'air a été déterminée pour 1 m²

Dans l'herbe séchée à l'air, la teneur en coumarines a été déterminée (par la méthode spectrophotométrique selon Wierzchowska-Renke et Stecka (1976)), en acides polyphénoliques exprimés en acide caféique et en glycosides iridoïdes exprimés en aucubine (selon FP VI 2002) .

L'influence du pH du substrat sur le développement des plantes, le rendement et la qualité des matières premières

La recherche a été réalisée en 2007-2008 sur trois substrats (tourbe et sable dans un rapport 1:1) avec des pH différents (4,5, 5,5, 6,5). Dans chaque pH horizontal, 300 plants de pousses de stolon à deux nœuds et enracinés d'aspérule ont été plantés à un espacement de 10 x 15 cm. Les plantes ont été recouvertes d'une seule toile d'ombrage, fournissant environ 50 % d'ombrage. 30 plantes de chaque combinaison ont été sélectionnées pour mesurer les caractéristiques biométriques. La recherche a été menée de mai à octobre 2007 toutes les 4 semaines.

Au printemps 2008, pendant la phase de floraison des plantes, l'herbe a été coupée au niveau du deuxième verticille au-dessus du sol, puis la matière première séchée à l'air a été soumise à une analyse chimique déterminant : la somme des coumarines (par la méthode spectrophotométrique selon Wierzchowska-Renke et Stecka (1976)), les acides polyphénoliques exprimés en acide caféique, les glycosides iridoïdes exprimés en aucubine (d'après FP VI 2002).

L'influence du mode d'implantation d'une plantation sur le rendement et la qualité de la matière première

Le but de l'expérience était de déterminer l'influence de la date de plantation et de la densité des plants sur leur développement ainsi que sur la qualité de l'aspérule des bois. Trois populations ont été sélectionnées pour l'expérimentation, dont deux provenaient de la province. Voïvodie de Varmie-Mazurie (n° 2 et n° 6), et un de la voïvodie Province de Lublin (n° 19), caractérisée par une croissance intensive et une teneur élevée en composés biologiquement actifs. L'expérience a été mise en place en 2006 en utilisant la méthode des blocs randomisés en trois répétitions.

Facteur A-population : 2

Facteur B - date de plantation : mai
(printemps) - T1
septembre (automne) - T2

Facteur C-espacement :
30x30 cm – R1
30x40cm – R2

6 19

Des boutures racinées de pousses de stolon à deux nœuds, 20 à chaque répétition, ont été plantées aux deux dates. Le site de culture était abrité par une rangée d'arbres du côté sud.

Des observations des caractéristiques morphologiques et développementales des plantes ont été effectuées toutes les deux semaines tout au long de la période de végétation végétale, en 2006 et 2007. En 2008, des herbes ont été récoltées à deux stades de développement des plantes. La première a été réalisée en mai, pendant la période de floraison, lorsque 80 % des plantes avaient des fleurs pleinement développées. La deuxième coupe a eu lieu en septembre. Dans l'herbe séchée à l'air, la teneur en coumarines a été déterminée (par la méthode spectrophotométrique selon Wierzchowska-Renke et Stecka (1976)), en acides polyphénoliques exprimés en acide caféique et en glycosides iridoïdes exprimés en aucubine (selon FP VI 2002).

5. Évaluation de l'impact des conditions d'extraction sur la composition chimique des extraits obtenus

Le matériel de recherche était constitué d'herbes provenant de plantes de la population n° 8 (Zelwęgi) collectées dans des sites naturels et cultivées. L'herbe a été récoltée pendant la phase générative et végétative des plantes. La matière première a été séchée dans un séchoir à 35°C.

Facteur A - milieu d'extraction : - alcool
(méthanol 75%) - eau

Facteur B - méthode d'extraction : -
extraction sous reflux - extraction dans un
appareil Soxlet automatisé (Büchi B-811) - extraction par ultrasons

La teneur en coumarines dans les extraits a été déterminée par la méthode CCM et leur pouvoir antioxydant a été déterminé par les méthodes FRAP et DPPH.

6. Évaluation de l'activité antioxydante des extraits

Détermination de l'activité antioxydante générale par la méthode FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

La détermination a été effectuée sur des extraits aqueux. L'activité antioxydante du FRAP a été déterminée à l'aide de la méthode donnée par Benzie et Strain (1999), qui implique la réduction du fer au troisième état d'oxydation dans un environnement acide en une forme ferreuse de couleur bleue intense, qui présente l'absorbance la plus élevée à une longueur d'onde de 593 nm. La réaction n'est pas spécifique et se produit sous l'influence de toute substance ayant des propriétés réductrices. La valeur FRAP d'un mélange d'antioxydants est la somme des valeurs FRAP de ses composants individuels.

Détermination de l'activité antioxydante générale par la méthode DPPH La

détermination a été réalisée sur des extraits aqueux. L'analyse a été réalisée selon la méthode de Chen et Ho (1997) et le pourcentage d'inhibition du DPPH a été calculé selon la formule donnée par Rossi et al. (2003).

La détermination implique une mesure colorimétrique du degré de réduction des radicaux DPPH.

7. Analyse statistique des résultats

Pour développer les résultats expérimentaux, le test χ^2 d'indépendance des caractéristiques et les méthodes d'analyse de variance à un facteur et à deux facteurs ont été utilisés. Pour comparer les moyennes, le test de Tukey a été utilisé au niveau de signification de $\alpha = 0,05$ ou $\alpha = 0,01$. Statgraphics Plus version 4.1 a été utilisé pour effectuer les calculs. Afin d'isoler des groupes de population similaires dans des études en sites naturels et en culture, la méthode d'analyse groupée a été utilisée (Jendzejczak 1998).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Recherche sur le terrain

Analyse phytosociologique des communautés végétales

Sur la base d'une analyse phytosociologique, quatre groupes de communautés végétales où l'aspérule était présente ont été identifiés. La plupart d'entre eux ont été classés dans l'ordre Fagetalia sylvaticae (association Alno-Ulmion et Carpinion betuli, association : Tilio-Carpinetum), dont l'aspérule est une espèce caractéristique (Matuszkiewicz 2002), tandis que six d'entre eux dans l'ordre Piceetalia abietis (association : Querco roboris– Pinetum) (Fig. 3).

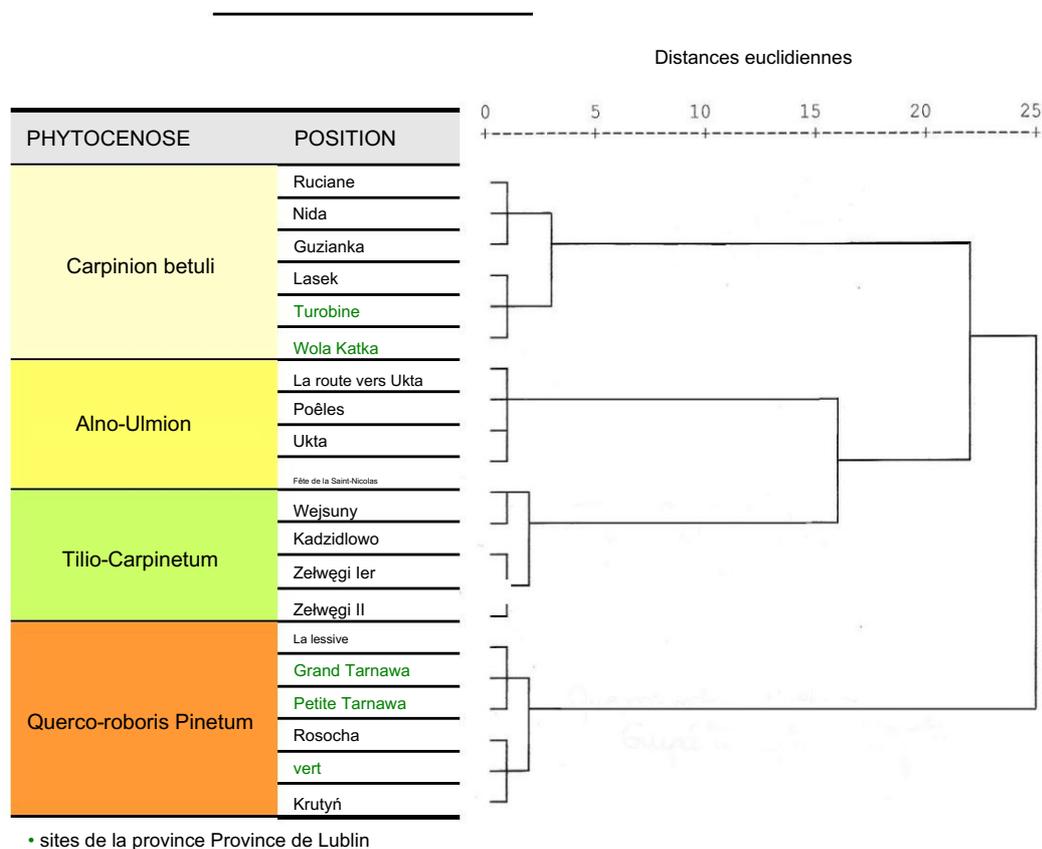


Fig. 3. Dendrogramme montrant des similitudes dans la composition spécifique des sites d'aspérule odorante, obtenu par analyse groupée utilisant la méthode de Ward

Contenu absolu en ADN nucléaire et niveau de polyploïdie

L'analyse du contenu en ADN nucléaire de 20 populations d'aspérules provenant de sites naturels n'a pas révélé de diversité intra-espèce significative. Cette valeur variait de 1,34 à 1,43. Aucun polyploïde n'a été trouvé au sein des populations étudiées.

Des résultats similaires ont été obtenus dans les études de Skalińska et al. (1959) affirmant que l'aspérule ne présente aucune différenciation intraspécifique. Jusqu'à présent, aucune unité systématique inférieure, telle que la variété ou la forme, n'a été distinguée au sein de cette espèce.

Développement de végétaux en sites naturels avec des modes d'obtention de matières premières diversifiés

Les résultats des recherches sur le développement des plantes dans les sites naturels ont montré que le mode d'obtention des matières premières a un impact important sur la régénération de la population et la qualité de l'herbe obtenue à partir de celles-ci (graphiques 1-4, tableau 1). En coupant les plantes à mi-longueur des pousses, on a observé une croissance intensive des pousses après environ quatre semaines, et à la fin de la saison de croissance, les pousses ont atteint une longueur similaire à celle des plantes non coupées (22 cm). Les plantes coupées près du sol sont mortes ou leur croissance a été médiocre au cours de la saison de croissance suivante.

Des observations similaires ont été faites par Oświęcimska et al. (1984). L'auteur estime également que la coupe des pousses d'aspérule près du sol entraîne une mauvaise repousse des plantes (environ 24 %) l'année suivante. Ainsi, ce qu'on appelle la méthode de récolte « industrielle », qui consiste à abattre ou à déterrer tout ce qui semble être la matière première recherchée, menace non seulement des espèces individuelles, mais des habitats entiers, rarement restaurés dans leur forme originale.

Concernant la qualité de la matière première obtenue, il a été constaté que la récolte de l'aspérule, qui consiste à couper les plantes au ras du sol, réduit considérablement la teneur en coumarine l'année suivante et augmente légèrement la teneur en acides polyphénoliques. Cependant, il n'y avait pas de relation directionnelle claire entre la méthode de coupe de l'herbe et la teneur en glycosides iridoïdes.

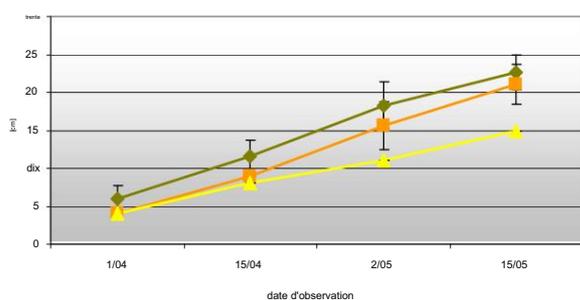


Fig. 1. Augmentation de la hauteur des plantes [cm]

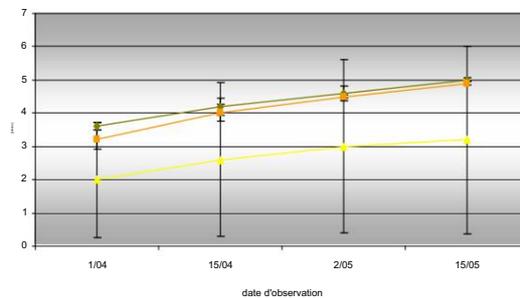


Fig. 2. Nombre de verticilles de feuilles sur la pousse [pcs.]

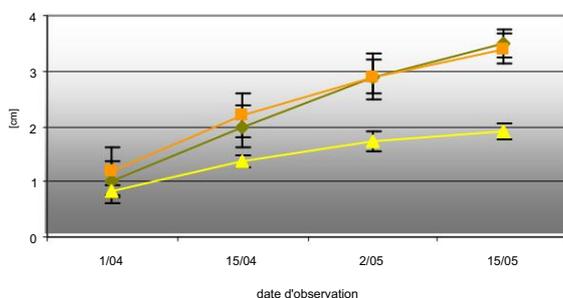


Fig. 3. Longueur des limbes des feuilles [cm]

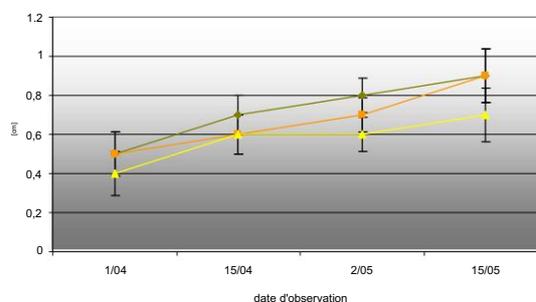


Fig. 4. Largeur des limbes des feuilles [cm] - sans coupe ; - coupe mi-hauteur ; - couper au sol

Tableau 1. Teneur en coumarines, acides polyphénoliques et glycosides iridoïdes dans l'herbe [% MS]

Comment couper l'herbe,	Coumarine	Acides polyphénoliques	Glycosides iridoïdes
la plante n'a pas été coupée l'année dernière,	0,41 une	1,68 milliards	0,99 milliards
coupée à mi-hauteur de la plante, coupée au sol	0,43 une	1,77 milliards	1,12 un
	0,30 b	1,84 un	0,87c

Les mêmes lettres indiquent des valeurs qui ne diffèrent pas significativement au niveau de $\alpha = 0,05$ selon le test de Tukey.

2. Analyse développementale et phytochimique de populations sélectionnées dans des conditions naturelles i cultures

Évaluation des caractéristiques morphologiques et développementales des plantes

L'évaluation des caractéristiques morphologiques et développementales dénombrables et indénombrables des plantes dans les sites naturels a montré peu de différenciation. En culture, les plantes ont été évaluées de la même manière que dans les sites naturels. Les mesures biométriques des plantes ont montré, à l'instar de celles effectuées en conditions naturelles, des différences moyennes dans la longueur des pousses, le nombre de verticilles sur la pousse et la longueur et la largeur des feuilles. Longueurs des pousses d'aspérule selon Tokarz et al. (1969), Szafer et al. (1988) et Strzelecka et Kowalski (2000) est de 10 à 60 cm, ils affirment également que les conditions de l'habitat ont un impact significatif sur cette caractéristique des plantes. Les plantes observées dans cette étude en milieu naturel avaient des pousses d'une longueur moyenne de 28 cm à la fin de la période de végétation et en culture de 22 cm (Figures 5 et 6). En ce qui concerne le nombre de verticilles de feuilles sur la pousse, il a été constaté que chez les plantes en milieu naturel, il variait de 5 à 6 pièces, et en conditions cultivées de 6 à 10 pièces (Figures 7 et 8).

Selon Sulma et al. (1964, 1967, 1969), le nombre de verticilles de feuilles sur une pousse est une caractéristique peu variable chez l'aspérule et ne dépend pas de l'habitat et de la communauté végétale dans laquelle elle est présente. Il estime également que la taille des feuilles de l'aspérule ne dépend pas de l'endroit où elle pousse. Les feuilles les plus courtes dans les sites naturels étaient les plantes de la population n° 2 (3 cm), et les plus longues étaient les plantes des populations n° 9 et 20 (4 cm). Après transfert des plantes en culture, la longueur des limbes des feuilles de la population n°2 était en moyenne de 3,7 cm, et celle de la population n°9 est restée inchangée (Graphiques 9-12). Les conditions météorologiques prévalant lors des expériences sur le terrain ne différaient pas significativement des conditions nationales à long terme, à l'exception de 2007, qui a été caractérisée par une température de l'air plus élevée et une augmentation des précipitations. Sur la base des résultats obtenus dans cette étude, on peut supposer que les conditions météorologiques n'ont pas d'impact significatif sur le développement des plantes.

À l'aide d'une analyse hiérarchique par grappes, les 20 populations étudiées (dans des sites naturels et en culture) ont été divisées en 10 groupes (clusters), constitués d'objets plus similaires dans de nombreuses caractéristiques au sein des groupes qu'entre les groupes. Les groupes séparés avaient des tailles différentes – de un à neuf. Cependant, la similarité des populations individuelles était différente selon les sites naturels et les cultures. En analysant la composition des groupes individuels, on peut observer que les groupes les plus importants comprenaient des populations des deux régions de Pologne (Fig. 4 et 5).

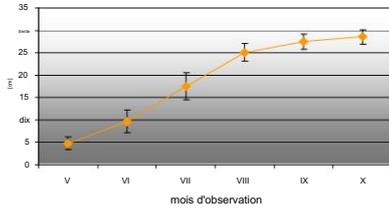
Moyennes de population en conditions naturelles et cultivées

POSITIONS NATURELLES

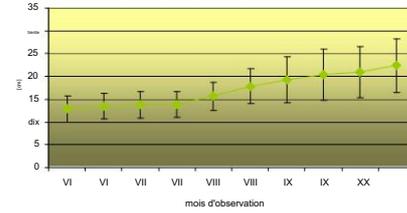
CULTIVATION

Longueur des pousses [cm]

Conférence 5

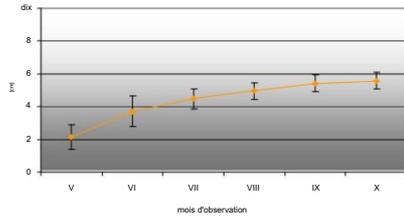


Conférence 6

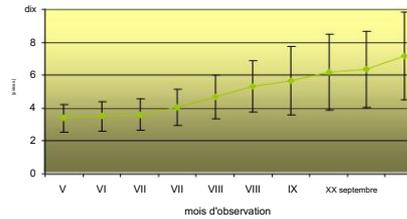


Nombre de verticilles sur le tournage [pcs.]

Conférence 7

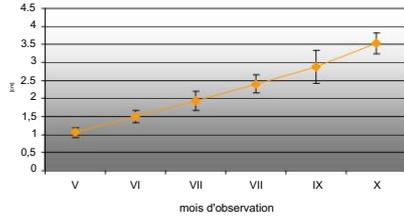


Conférence 8

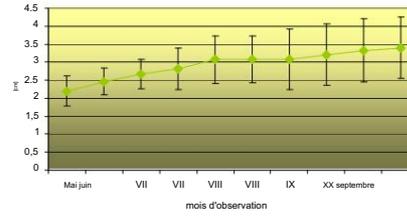


Longueur des feuilles [cm]

Conférence 9

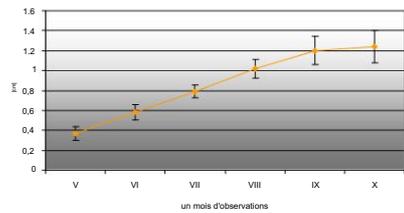


Conférence 10

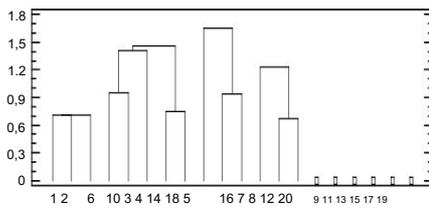
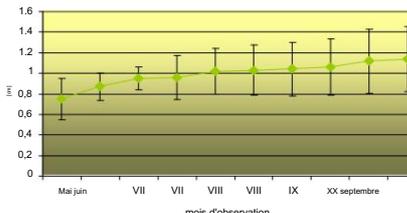


Largeur des feuilles [cm]

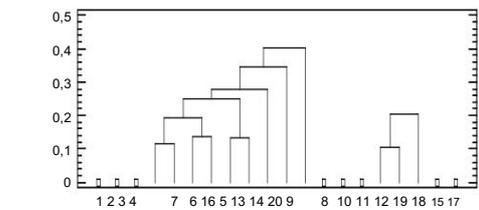
Conférence 11



Conférence 12



population



population

Fig. 4. Dendrogramme de similarité pour 20 populations en termes de caractéristiques de développement dans des sites naturels

Fig. 5. Dendrogramme de similarité pour 20 populations en termes de caractéristiques de développement en culture

L'évaluation des caractéristiques d'innombrables plantes de 20 populations d'aspérule odorante a montré que leur développement en sites naturels était plus homogène qu'en culture. Toutes les populations des sites naturels ont commencé à fleurir en même temps, cependant, les plantes de la province Lubelskie a atteint sa pleine floraison une dizaine de jours plus tard que les autres. Concernant les innombrables caractères morphologiques, des différences plus importantes ont été observées dans le cas des plantes cultivées. Ils différaient clairement en termes de forme de croissance - la plupart d'entre eux avaient une forme semi-dressée ou dressée, et quelques-uns avaient des pousses rampantes. Par rapport aux plantes cultivées dans des endroits naturels, les plantes cultivées fleurissent plus tard et terminent leur végétation plus tôt.

Tests phytochimiques

Dans le travail présenté, une tentative a été faite pour déterminer la diversité chimique de l'aspérule des bois, obtenue à la fois à partir de sites naturels et à partir de la culture. La matière première (herbe) a été collectée pendant la période de floraison des plantes (en mai) et après environ 4 mois (après la floraison des plantes). La teneur en coumarines, acides polyphénoliques et glycosides iridoïdes a été déterminée dans l'herbe séchée à l'air. Quel que soit le lieu de collecte de la matière première, une teneur plus élevée en coumarine a été trouvée dans l'herbe récoltée pendant la période de floraison des plantes (sites naturels - 0,43%, culture - 0,58%) qu'après leur floraison (sites naturels - 0,34 %, culture - 0,36%) (Figure 13-16). Recherches antérieures présentées dans des ouvrages comprenant : Hlavý et coll.

(1984), Mahlajuk (1991), Strzelecka et Kowalski (2000) et Basera et al. (2004) confirment que la teneur en coumarine et ses dérivés dans l'aspérule est la plus élevée pendant la période de floraison des plantes, et après la floraison, elle peut même être deux fois plus faible.

Les herbes récoltées en phase végétative (après la floraison des plantes) sur des sites naturels étaient caractérisées par une teneur plus élevée en acides polyphénoliques (1,19 %) que celles issues de la culture (1,16 %) (Figures 17 à 20). Une tendance similaire a été observée concernant la teneur en glycosides iridoïdes de la plante. Il y en avait six fois plus dans la matière première issue de sites naturels (0,71 % après plantes à fleurs) (Figures 21-24). Ożarowski et Jaroniewski (1987) rapportent que la teneur en aspéroluside (l'un des glycosides iridoïdes) de l'aspérule des bois est d'environ 0,05 %. Des travaux antérieurs d'Osińska et Rosłon (2004) sur l'évaluation de l'aspérule des bois (obtenue pendant la floraison des plantes) en termes de teneur en aucuboside et en acides polyphénoliques indiquent qu'elle contient environ 0,82 % d'aucuboside et environ 2 % d'acides polyphénoliques.

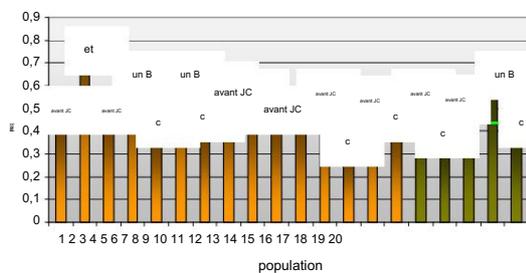


Fig. 13. Teneur en coumarines dans les herbes collectées dans la phase génératif à partir de sites naturels [% MS]

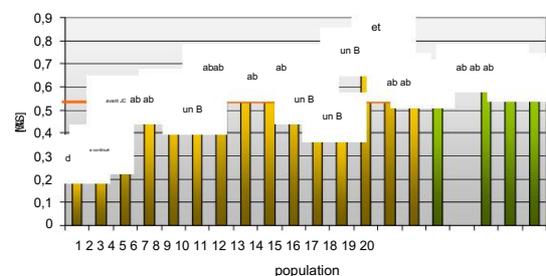


Fig. 14. Teneur en coumarines dans les herbes récoltées lors de la phase générative issue de la culture [% MS]

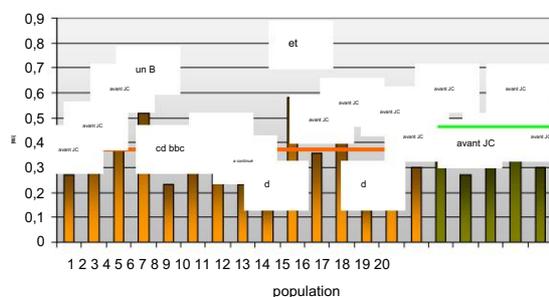


Fig. 15. Teneur en coumarines dans les herbes collectées dans la phase croissance végétative à partir d'emplacements naturels [% MS]

populations de la province Voïvodie de Varmie-Mazurie

indiquent des valeurs qui ne diffèrent pas significativement au niveau de $\alpha = 0,05$ selon le test de Tukey

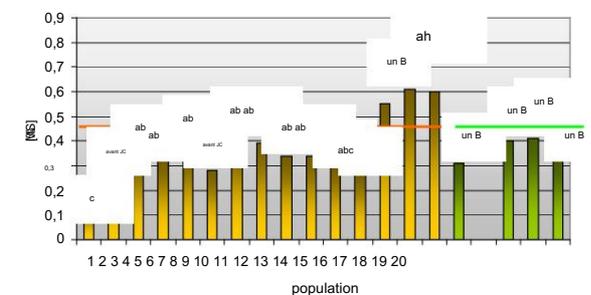


Fig. 16. Teneur en coumarines dans les herbes récoltées en phase végétative provenant de la culture [% MS]

populations de la province Voïvodie de Lublin Les mêmes lettres

signifier

La présence de coumarine dans les herbes des plantes de 20 populations étudiées a été initialement déterminée à l'aide de la méthode de chromatographie sur couche mince (CCM). Les résultats obtenus ont ensuite été confirmés par une analyse plus détaillée par chromatographie liquide haute performance (HPLC). Parmi les composés identifiés, tant dans les herbes récoltées sur des sites naturels que dans la culture, outre la coumarine, les acides polyphénoliques suivants ont été trouvés : l'acide o-coumarique, l'acide ellagique, l'acide chlorogénique, l'acide férulique et l'acide rosmarin, ainsi que le glycoside flavonoïde. - la rutine.

Leur contenu était largement lié à l'origine de la matière première (population) et au stade de développement des plantes. L'herbe de la population de la région de Varmie-Mazurie se caractérisait par une teneur en coumarine plus de trois fois supérieure à celle de la province. Lubelskie, qu'il provienne de sites naturels (38,61 mg·100 g⁻¹ MS en phase générative ; 31,33 mg·100 g⁻¹ MS en phase végétative) ou de culture (94,14 mg·100 g⁻¹ MS en phase générative ; 69,84 mg·100 g⁻¹ MS en phase végétative). La tendance inverse a été constatée dans le cas de l'acide chlorogénique (sites naturels 311,59 mg·100 g⁻¹ MS en phase générative ; 322,87 mg·100 g⁻¹ MS en phase végétative, culture 874,36 mg·100 g⁻¹ MS en phase générative ; 754,98 mg·100 g⁻¹ MS en phase végétative). La teneur en acides polyphénoliques des matières premières analysées, c'est-à-dire l'acide ellagique, l'acide férulique et l'acide rosmarinique, était bien inférieure à celle de l'acide chlorogénique, et l'acide o-coumarique n'était présent qu'à l'état de traces, quel que soit le lieu de collecte des herbes et le stade de développement des plantes.

Dans les matières premières issues de la culture, la rutine a été trouvée en quantités allant de 12,99 à 41,22 mg·100 g⁻¹ MS, tandis que dans les herbes provenant de sites naturels, la teneur de ce composé était environ trois fois inférieure et variait de 6,67 à 10,11 mg·100 g⁻¹ MS (Tableaux 2 et 3).

Tableau 2. Teneur en composés biologiquement actifs identifiés dans les herbes provenant de sites naturels [mg·100 g⁻¹ MS]

Zone	Phase relation/ récolte	coumarine		acide o-coumarique		L'acide ellagique		l'acide chlorogénique		acide férulique		acide de rosmarin		rutine		
		g.	Dans.	g.	Dans.	g.	Dans.	g.	Dans.	g.	Dans.	g.	Dans.	g.	Dans.	
voïvodie Voïvodie de Varmie-Mazurie	Moyenne pour la population	38,61*	31,33	0,32	0,37	2,82	2,79	240,03	249,87	9,71*		5.1	10,04*	7,38	6,67	10,11*
voïvodie Voïvodie de Lublin	Moyenne pour la population	11,74*	9,33	0,37	0,36	2,73	3,27	311,59	322,87	8,46		7.44	9,98	8,68	7,27	9.36

w – herbe récoltée en phase végétative g – herbe récoltée en phase générative composés avec la part la plus élevée

*p<0,05

Tableau 3. Teneur en composés biologiquement actifs identifiés dans les herbes issues de la culture [mg·100 g⁻¹ MS]

Zone	Phase relation/ récolte	coumarine		o-acide kumarowy g.		acide ellagique		l'acide chlorogénique		acide férulique		acide rosmarin en g.		rutine				
		g.	Dans.		Dans.	g.	Dans.	g.	Dans.		Dans.	g.	Dans.	g.	Dans.			
voïvodie Voïvodie de Varmie-Mazurie	Moyenne pour la population.	94,14*	69,84	0,19	0,25*			2,75	3,9*	802,9*	618,77	1,61	4,45*	15,65	15,44	37,83	41,22*	
voïvodie Voïvodie de Lublin	Moyenne pour la population.	24,68*	21,1			0,13	0,15	3,28*	1,8	874,36*	754,98	2,06	5,0*	2,6,6*		4.9	12,99	23,94*

w – herbe récoltée dans la phase végétative g – herbe récoltée dans la phase générative composés avec la part la plus élevée *p<0,05

3. Évaluation de l'efficacité de la reproduction générative et végétative

Reproduction générative À la

suite d'essais en laboratoire, il a été constaté que les graines d'aspérule ont une capacité germinative naturelle très faible. Quelles que soient les méthodes de stratification utilisées, leur capacité germinative ne dépassait pas 20 %. Dans les cultures in vitro, la capacité

la germination des embryons isolés (tégument complètement enlevé) n'a pas dépassé 25 % (graphique 25).

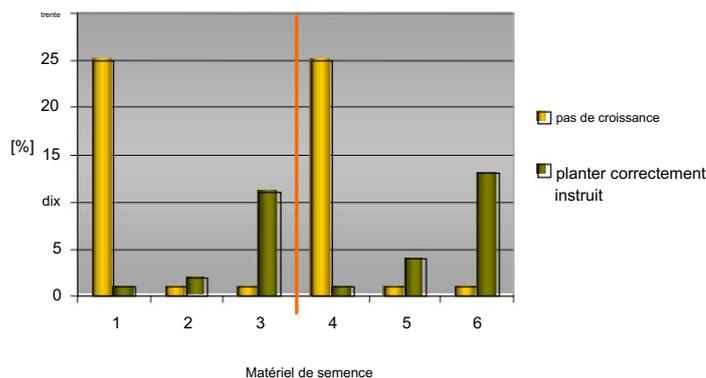


Fig. 25. L'influence de l'âge des graines et de la méthode d'endommagement de l'enveloppe de la graine sur le nombre de plants développés

Multiplication végétative Les résultats

des expériences liées à la propagation de l'aspérule odorante par bouturage indiquent que les boutures de pousses de stolon à deux nœuds (prélevées sur les plantes mères au printemps et à l'automne et enracinées dans une tourbe avec un pH de 4,5) sont les plus utiles pour la multiplication végétative. multiplication de cette plante (99 % de boutures bien enracinées).

Micropropagation

Les résultats de ces travaux indiquent que l'aspérule peut être multipliée efficacement dans des cultures in vitro. La micro-reproduction de cette espèce n'a pas été entreprise jusqu'à présent. Les publications publiées jusqu'à présent ne concernent que *Galium tinctorium* et *Galium schultesii* (Wilson et Balague 2007, Klavina et al. 2004).

Dans le cadre des recherches menées dans le cadre de cette étude, il a été constaté que la substance désinfectante la plus efficace est l'hypochlorite de sodium ($\chi^2(1) = 4,74$ $p = 0,0295$), tandis que la chloramine T endommage dans une large mesure les explants (graphique 26). Des résultats similaires ont été obtenus par Klavina et al. (2004) pour les pointes de pousses de *Galium tinctorium* désinfectées avec la préparation commerciale ACE.

Le plus grand nombre de pousses correctement développées ont été obtenues à partir d'expans apicaux prélevés en septembre ($\chi^2(3) = 20,27$ $p = 0,0001$) (graphique 27).

Il a été constaté que le développement des explants dépendait de manière significative de la composition du milieu. Le meilleur développement des explants a été observé sur le milieu MS sans ajout de régulateurs de croissance et enrichi avec l'ajout de 0,1 mg·dm⁻³ BA (Figure 28), tandis que le plus grand nombre de pousses latérales sur les explants a été observé sur le milieu avec le ajout de 1 mg·dm⁻³ kinétine et un peu moins sur milieu sans ajout de régulateurs de croissance. La kinétine à des concentrations plus élevées, ainsi que la BA à toutes les concentrations utilisées, n'ont pas favorisé le développement de pousses latérales.

Les pousses comportant le plus grand nombre de nœuds ont été obtenues sur un support sans régulateurs de croissance. Des concentrations croissantes des deux cytokinines ont entraîné la formation de pousses comportant de moins en moins de nœuds. BA a inhibé l'élongation des pousses dans une plus grande mesure que la kinétine. Les pousses les plus longues ont été obtenues sur un milieu sans régulateur de croissance et contenant 1 mg·dm⁻³ de kinétine.

Le déroulement des processus de morphogenèse dépend non seulement du type et de la concentration des cytokinines et des auxines dans le milieu, mais également des conditions physiques de la culture, notamment de la température et de la lumière (Rout 2000). Dans les expériences réalisées dans ce travail, des pousses plus longues ont été obtenues à une intensité d'irradiation de lumière fluorescente de 7,5 $\mu\text{E} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ que 33,0 $\mu\text{E} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$. Les plantes obtenues sur un milieu sans ajout de régulateurs de croissance dans des conditions de plus faible intensité lumineuse étaient enracinées à 95 %. À une intensité lumineuse plus élevée, seulement 50 % des plantes ont pris racine (photos 1A et B). Cela peut être dû au fait que l'aspérule odorante, en tant que plante du sol forestier des forêts de feuillus, est adaptée pour pousser dans des conditions de faible intensité lumineuse.

Fruits après trois ans de stockage

1. fruits entiers 2.

fruits dont 1/3 du tégument a été enlevé autour de la racine embryonnaire 3. fruits dont le tégument a été complètement enlevé (embryons isolés)

Fruits annuels

4. fruits entiers 5.

fruits dont 1/3 du tégument a été enlevé autour de la racine embryonnaire 6. fruits dont le tégument a été complètement enlevé (embryons isolés)

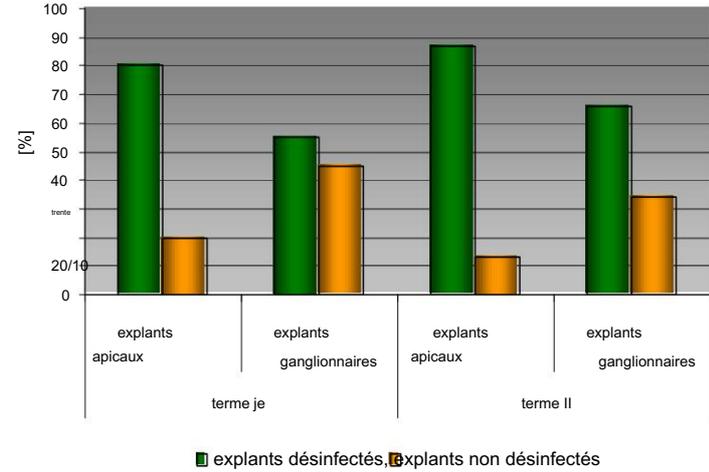
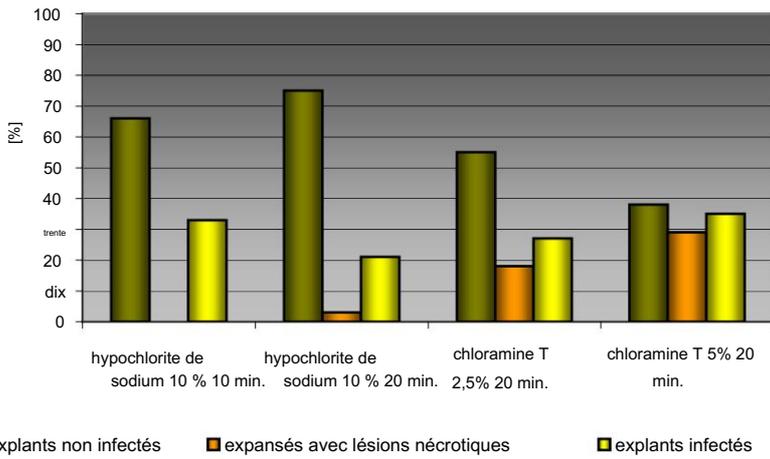
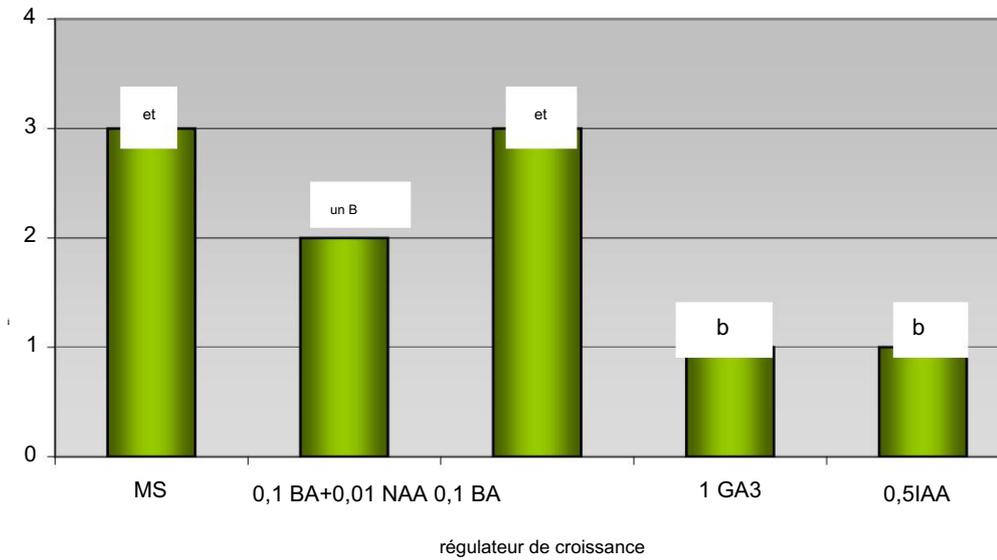


Fig. 26. Influence de la méthode de désinfection sur le nombre d'explants ganglionnaires viables et désinfectés [%]

Cours 27. L'influence du type d'explant et de la date de sa collecte sur le nombre d'explants désinfectés [%]



Les mêmes lettres indiquent des valeurs qui ne diffèrent pas significativement au niveau de $\alpha = 0,05$ selon le test de Tukey

Fig. 28. L'influence du type de milieu sur la croissance des explants [pcs.]



Une photo 1. Explants poussant sur milieu MS sans régulateurs de croissance au niveau d'irradiation A. 33,0 $\mu\text{E. s}^{-1}\text{m}^{-2}$, B. 7,5 $\mu\text{E. s}^{-1}\text{m}^{-2}$

4. Évaluation de l'impact de certains facteurs environnementaux et de culture sur le rendement et la composition matière première chimique

L'influence de l'ombrage sur le développement des plantes, le rendement et la qualité des matières premières

Les résultats des tests sur le terrain sur l'influence de l'intensité lumineuse sur le développement des plantes ont montré que le poids de l'herbe et la teneur en composés biologiquement actifs dépendent de manière significative de l'intensité lumineuse. La croissance la plus dynamique des plantes, et donc le poids des herbes nettement plus élevé, a été obtenue lorsque les plantes étaient le plus ombragées (graphiques 29 et 30).

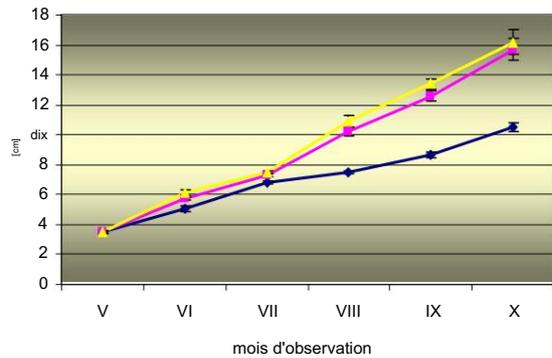


Fig. 29. Croissance de la hauteur des pousses [cm] 1. plantes poussant en plein soleil, 2. plantes poussant sous une seule ombre 3. plantes poussant sous une double ombre

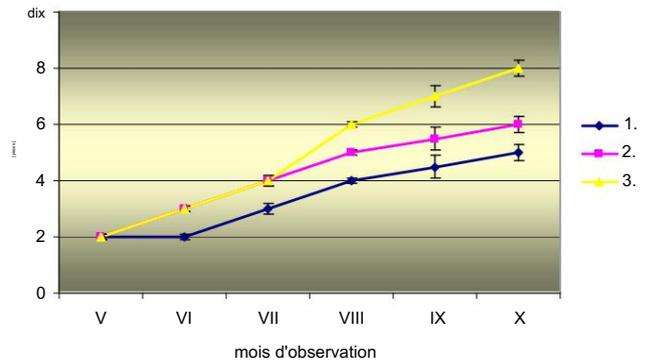
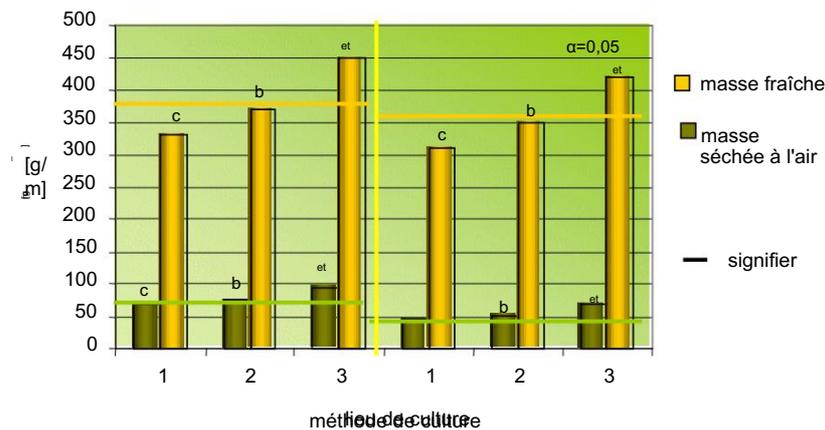


Fig. 30. Nombre de verticilles de feuilles [pcs] 1. plantes poussant en plein soleil, 2. plantes poussant sous une seule ombre 3. plantes poussant sous une double ombre

Les plantes poussant en pleine lumière pendant toute la période de végétation étaient plus petites et le poids de matière première obtenue était environ 30 % inférieur à celui des plantes poussant à l'ombre (graphique 31).

La teneur en coumarines, acides polyphénoliques et glycosides iridoïdes était toujours significativement plus élevée dans les herbes des plantes poussant sous double ombre. Il a également été constaté que la matière première collectée lors de la phase de floraison des plantes était caractérisée par une teneur plus élevée en coumarines, quel que soit le degré d'ombrage des plantes. Dans le cas des acides polyphénoliques, ils étaient plus nombreux dans l'herbe récoltée après la floraison des plantes (tableau 4).



1. plantes poussant en plein soleil, 2. plantes poussant sous une seule ombre 3. plantes poussant sous une double ombre * les moyennes marquées de la même lettre ne différaient pas significativement au niveau de signification $\alpha = 0,05$ selon le test de Tukey

Graphique 31. Rendement en herbes [g m⁻²]

Tableau 4. Teneur en composés biologiquement actifs dans l'herbe [% MS]

LIEU DE CROISSANCE	COUMARINES		ACIDES POLYPHÉNOL		GLYCOSIDES IRIDOÏDE	
	PHASE DE DÉVELOPPEMENT		végétatif		végétatif	
	général	général	général	général	général	général
1. des plantes poussant en pleine lumière	0,21c	0,1 c	0,71c	0,89 milliards	0,36 c	0,33 c
2. plantes poussant sous une seule ombre 3. plantes	0,36 ab	0,27 b	0,83 milliards	0,92 milliards	0,4 milliards	0,42 b
poussant sous une double ombre Moyenne pour la	0,45 une	0,39 une	1,24 un	1,29 un	0,57 une	0,51 une
phase de développement	0,34*	0,25	0,92	1,03*	0,44*	0,42

* les moyennes marquées de la même lettre ne différaient pas significativement au niveau de signification $\alpha = 0,05$ selon le test de Tukey

L'influence du pH du substrat sur le développement des plantes, le rendement et la qualité des matières premières

En examinant l'influence du pH du substrat sur le développement des plantes et la qualité de la matière première, il a été constaté que la réaction du sol affecte les caractéristiques morphologiques et développementales de l'aspérule odorante ainsi que la teneur en composés biologiquement actifs de l'herbe. Ainsi, les pousses les plus longues ont été développées par des plantes poussant dans un substrat avec un pH de 5,5 (32 cm) (graphique 32), tandis qu'un poids d'herbe significativement plus élevé a été obtenu avec des plantes poussant dans un substrat avec un pH de 4,5 (780 g m⁻²) (Graphique 33). La teneur totale la plus élevée en coumarines et glycosides iridoïdes a été trouvée dans les herbes des plantes poussant dans le sol avec un pH de 5,5, et en acides polyphénoliques avec un pH de 6,5 (tableau 6).

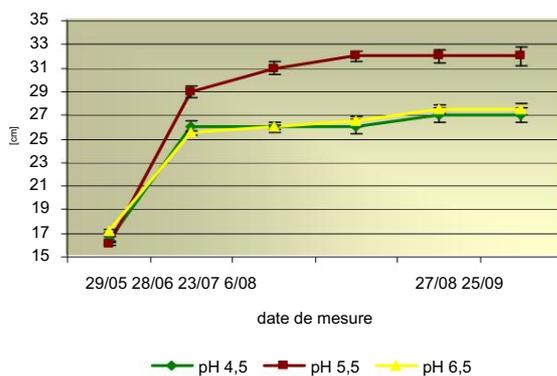


Fig. 32. Croissance de la hauteur des plantes en fonction du pH du sol [cm]

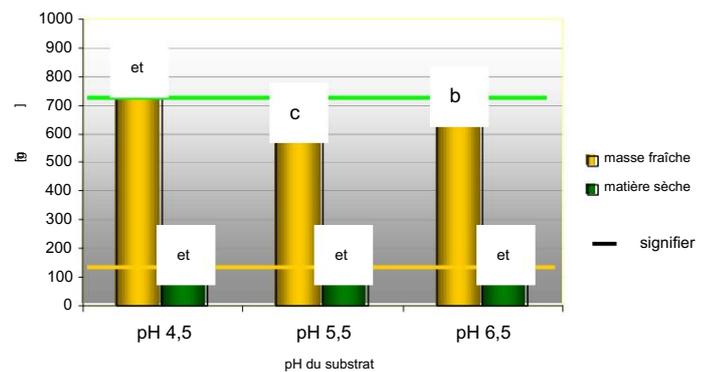


Fig. 33. Poids des herbes fraîches et sèches en fonction du pH du sol [g m⁻²]

* les moyennes marquées de la même lettre ne diffèrent pas significativement au niveau de signification de $\alpha = 0,05\%$ selon le test de Tuckey

Tableau 5. Teneur en composés biologiquement actifs dans l'herbe sèche [% DM]

pH du sol	coumarines	acides polyphénoliques	glycosides iridoïdes 0,80
pH 4,5	b* 0,93 b 1,10 a 1,32 a 0,54 c 1,00 0,53 1,06	0,53 1,06	0,80
pH 5,5	même lettre ne différaient pas significativement au niveau de signification $\alpha=0,05$		
pH 6,5		0,71 a	
moyenne		0,62	

L'influence du mode d'implantation d'une plantation sur le rendement et la qualité de la matière première

Dans le cadre d'expériences rigoureuses sur le terrain, des tentatives ont été faites pour déterminer l'influence de la date de plantation de l'aspérule odorante et de la densité des plantes sur leur développement et la qualité des herbes. Des plantes de 3 populations caractérisées par une croissance intensive et une teneur élevée en composés biologiquement actifs ont été testées. Les plantes plantées au printemps se caractérisent par une croissance plus intense qu'en automne (Figure 34-37). Un poids d'herbe plus élevé a été obtenu lorsque la plantation était établie au printemps et lorsque les plantes étaient coupées pendant leur période de floraison (graphiques 38 et 39). Cependant, la densité des plantes dans la parcelle n'a eu aucun effet sur le rendement des herbes.

Les herbes obtenues à partir de plantes plantées au printemps avaient une teneur plus élevée en composés coumariniques et en glycosides iridoïdes. Cependant, la date d'implantation de la plantation n'a pas eu d'impact significatif sur la teneur en acides polyphénoliques de la matière première (Tableaux 6 et 7).

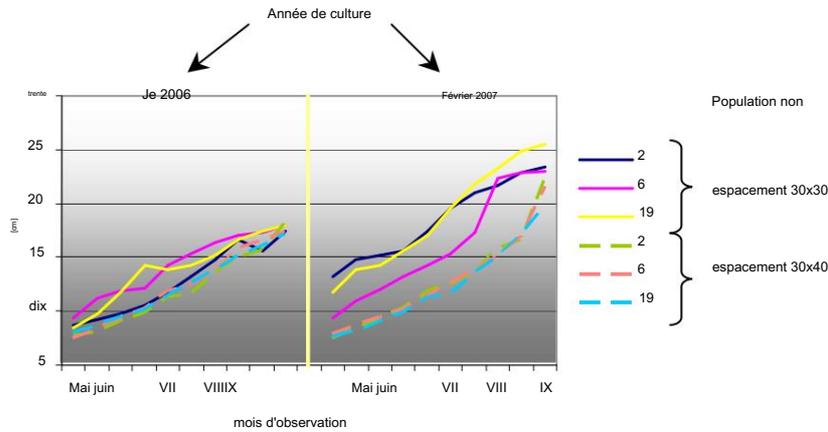


Fig. 34. Augmentation de la longueur des pousses des plantes plantées en mai [cm]

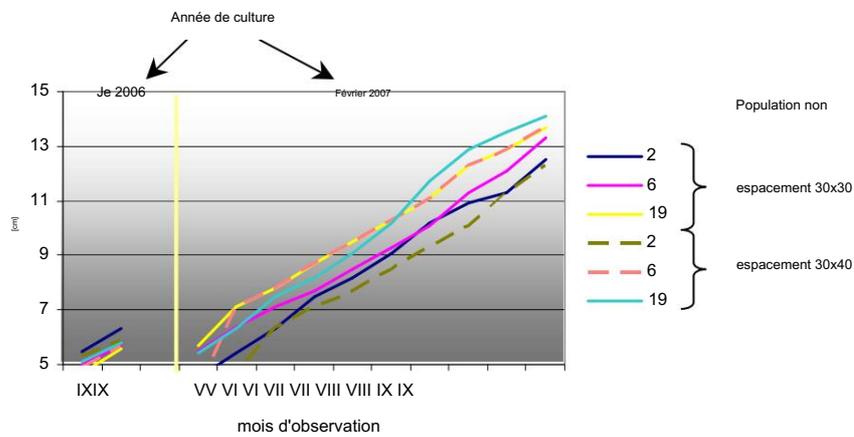


Fig. 35. Augmentation de la longueur des pousses des plantes plantées en septembre [cm]

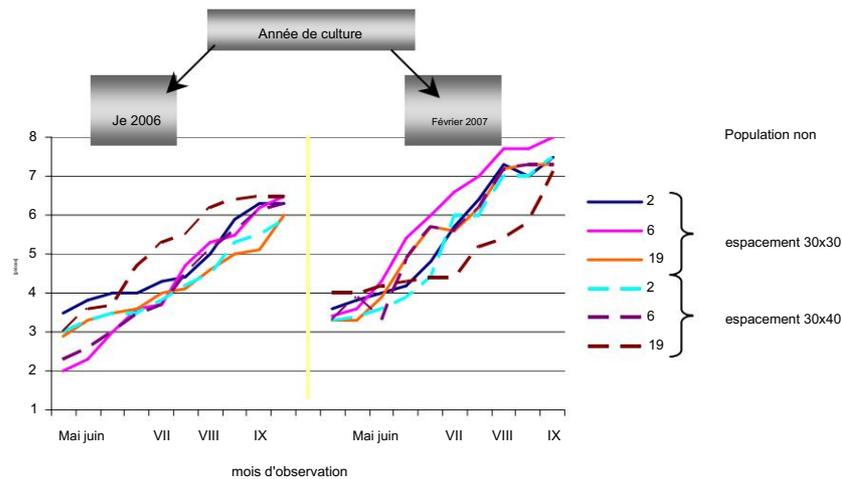


Fig. 36. Nombre de verticilles sur les pousses des plantes plantées en mai [pcs.]

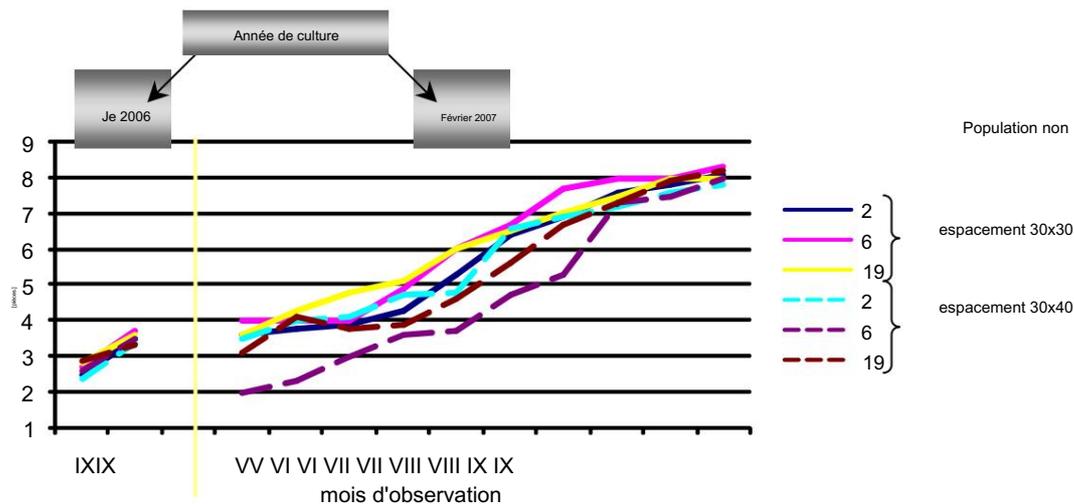
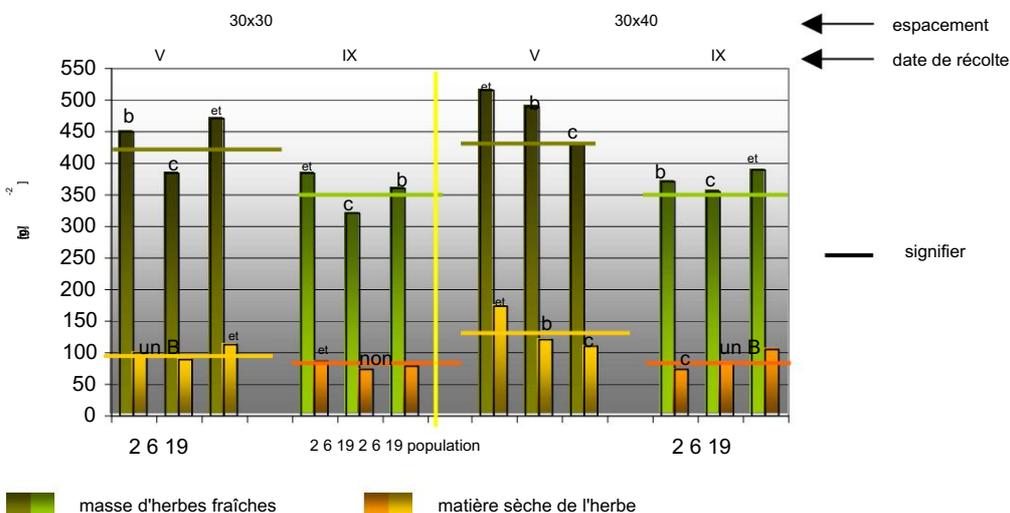
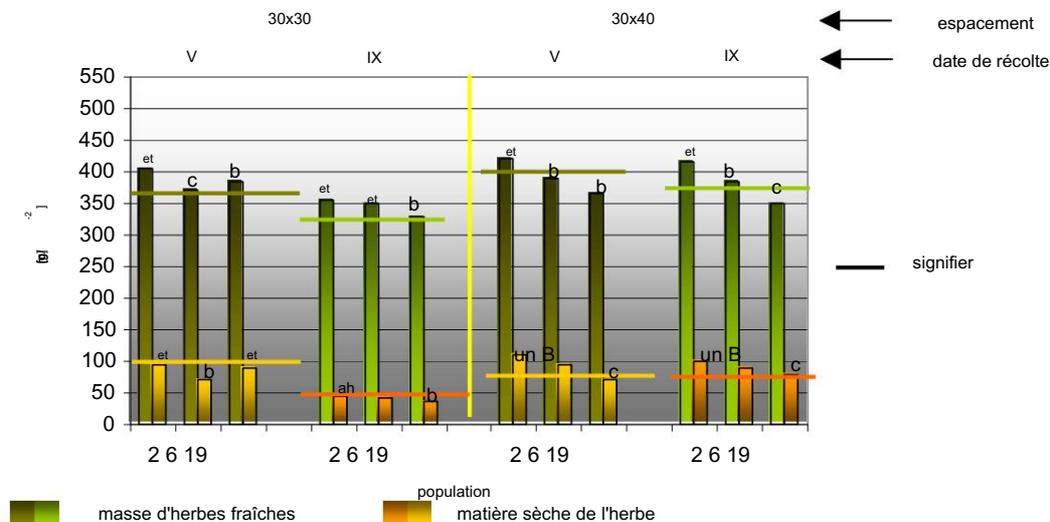


Fig. 37. Nombre de verticilles sur la pousse des plantes plantées en septembre [pcs.]



Les mêmes lettres indiquent des valeurs qui ne diffèrent pas significativement au niveau de $\alpha = 0,05$ selon le test de Tukey

Fig. 38. Masse d'herbes fraîches et séchées à l'air (date de plantation au printemps) [g m⁻²]



Les mêmes lettres indiquent des valeurs qui ne diffèrent pas significativement au niveau de $\alpha = 0,05$ selon le test de Tukey

Fig. 39. Masse d'herbes fraîches et séchées à l'air (date de plantation d'automne) [g m⁻²]

Tableau 6. Teneur en composés biologiquement actifs dans l'aspérule des bois (date de plantation au printemps) [% MS]

GROUPE DES RELATIONS	COUMARINES				ACIDES POLYPHÉNOL				GLYCOSIDES IRIDOïdes			
	30x30		30x40		30x30		30x40		30x30		30x40	
POPULATION	g.	Dans.	g.	Dans.	g.	Dans.	g.	Dans.	g.	Dans.	g.	Dans.
2	0,36	0,29	0,36	0,27	1,55	1,1	1,53	1,05	0,78	0,45	0,75	0,45
6	0,23	0,19	0,24	0,18	1,03	0,8	1,07	0,8	0,66	0,37	0,64	0,39
19	0,33	0,25	0,31	0,25	1,4	1,2	1,41	1,18	0,67	0,4	0,66	0,41
moyenne pour l'espacement	0,27		0,26		1,18		1,17		0,55		0,55	
moyenne pour la phase de développement	g : 0,3*		en : 0,24		g:1,33*		dans : 1,02		g : 0,69*		en : 0,41	
	PV				PV				PV			
Une population	0,0000				0,0001				0,0083			
B : phase	0,0000				0,0000				0,0001			
C : espacement	0,0656				0,8307				0,6180			

g – herbe récoltée en phase générative w –
herbe récoltée en phase végétative

Le tableau montre les résultats moyens de deux années de recherche * p<0,05

Tableau 7. Teneur en composés biologiquement actifs de l'aspérule des bois (date de plantation d'automne) [% MS]

GROUPE DES RELATIONS	COUMARINES				ACIDES POLYPHÉNOL				GLYCOSIDES IRIDOïdes			
	30x30		30x40		30x30		30x40		30x30		30x40	
POPULATION	g.	Dans.	g.	Dans.	g.	Dans.	g.	Dans.	g.	Dans.	g.	Dans.
2	0,35	0,21	0,31	0,2	1,51	1,1	1,56	1,03	0,65	0,4	0,63	0,41
5	0,2	0,11	0,25	0,14	1,01	0,7	1,1	1,01	0,6	0,31	0,59	0,33
19	0,29	0,18	0,27	0,16	1,38	1,5	1,43	1,2	0,55	0,32	0,55	0,29
moyenne pour l'espacement	0,22		0,22		1,2		1,18		0,47		0,46	
moyenne pour la phase de développement	g : 0,27*		en : 0,17		g:1,33*		dans :1,09		g:0,59*		en : 0,34	
	PV				PV				PV			
Une population	0,0629				0,0001				0,0280			
B : phase	0,0008				0,0001				0,0001			
C : espacement	0,9981				0,2637				0,8907			

g – herbe récoltée en phase générative w –
herbe récoltée en phase végétative

Le tableau montre les résultats moyens de deux années de recherche, * p<0,05

5. Évaluation de l'impact des conditions d'extraction sur la composition chimique des extraits obtenus

L'efficacité de l'extraction et la teneur en certains composés biologiquement actifs des extraits d'herbes d'aspérule dépendaient considérablement du type d'extraction et du solvant utilisé.

L'efficacité de l'extraction réalisée en bain à ultrasons (39 %) et dans l'appareil Soxhlet (42,5 %) était supérieure à celle de l'extraction sous reflux (29 %). Les extractions utilisant l'eau comme extractant se sont révélées plus efficaces (41,4 %) que celles utilisant l'alcool comme extractant (31,8 %). Ces résultats confirment les travaux antérieurs de Martino et al. (2006). Les extraits alcooliques avaient une teneur plus élevée en coumarines, tandis que les extraits aqueux avaient une teneur plus élevée en acides polyphénoliques.

Il a également été constaté que la qualité des extraits obtenus dépend de manière significative du stade de développement des plantes dans lesquelles la matière première a été collectée (Tableaux 8 et 9).

Tableau 8. Teneur en coumarines dans les extraits [%]

MOYEN EXTRACTIF	TYPE D'EXTRACTION			signifier
	SOUS LE RADIATEUR CONSIGNÉ	DANS LES BAINS ULTRASONIQUE	À LA CAMÉRA SOXHLETT	
Herbe récoltée en phase générative				
ALCOOL	0,12	0,21	0,26	0,19
EAU	0,08	0,16	0,19	0,14
signifier	0,10	0,18	0,22	
Herbe récoltée en phase végétative				
ALCOOL	0,07	0,14	0,19	0,13
EAU	0,05	0,06	0,17	0,09
signifier	0,06	0,10	0,18	

milieu d'extraction moyenne 0,16* alcool eau

*p<0,01

0,11

type de milieu d'extraction sous refroidisseur

0,08 en bain 0,1 en appareil Soxhlet

0,2

NIR α =0,01 0,036

Tableau 9. Teneur en acides polyphénoliques dans les extraits, exprimée en acide caféique [%]

MOYEN EXTRACTIF	TYPE D'EXTRACTION			signifier
	SOUS LE RADIATEUR CONSIGNÉ	DANS LES BAINS ULTRASONIQUE	À LA CAMÉRA SOXHLETT	
Herbe récoltée en phase générative				
ALCOOL	0,76	0,93	0,97	0,88
EAU	1,44	1,92	2,01	1,79
signifier	1,10	1,42	1,49	
Herbe récoltée en phase végétative				
ALCOOL	0,47	0,99	1,04	0,83
EAU	1,21	1,91	1,98	1,7
signifier	0,84	1,45	1,51	

milieu d'extraction alcool moyen 0,85

eau
*p<0,01

1,73*

un type d'extraction

sous une glacière

dans un bain

en appareil Soxhlet 1,5

NIR α =0,01 0,036

moyenne

0,97

1,43

6. Évaluation de l'activité antioxydante des extraits

Les extraits obtenus à partir d'herbes provenant de sites naturels (caractérisés par une teneur plus élevée en acides polyphénoliques) avaient une activité antioxydante plus élevée que ceux obtenus à partir de cultures (Figures 40 et 41). L'activité antioxydante est généralement liée à la teneur en polyphénols, ce qui est confirmé par des études antérieures de Velioglu et al. (1998), Makarska et Michalak (2005), Jamroza et al. (2006) et Drużyńska et Jeżak (2007).

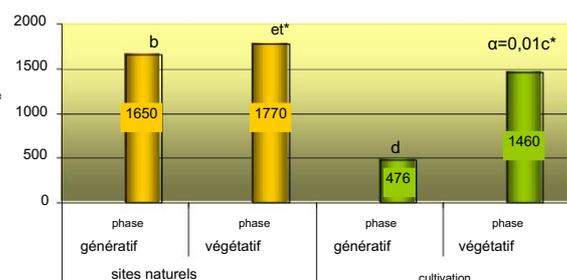


Fig. 40. Activité antioxydante des extraits déterminée par la méthode FRAP

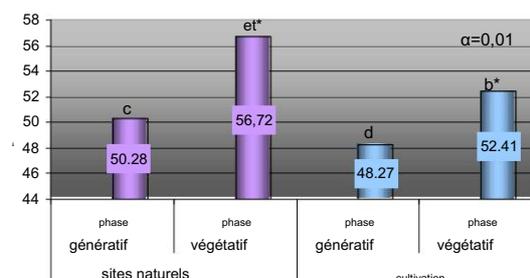


Fig. 41. Effet du piégeage du radical DPPH

CONCLUSIONS

1. Les populations d'aspérules étudiées se répartissaient en quatre types de communautés végétales :
Carpinion betuli, Alno-Ulmion, Tilio-Carpinetum, Querco-roboris Pinetum.
2. L'analyse de 20 populations a montré qu'elles ne sont pas différenciées en termes de contenu
l'ADN nucléaire, qui variait entre 1,34 et 1,43 pg/2C.
3. Une récolte inappropriée de l'aspérule odorante en milieu naturel, consistant à couper les pousses feuillées au sol,
entraîne un affaiblissement important des plantes, voire leur mort.
4. L'aspérule peut être multipliée efficacement dans des cultures in vitro : • l'hypochlorite
de sodium est très efficace pour désinfecter les explants, • le milieu optimal pour la régénération des pousses
est le milieu MS sans régulateurs de croissance, • des pousses plus longues et un meilleur enracinement des
explants peuvent être obtenus à
irradiation $7,5 \mu\text{E}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$.
5. En culture, la date a un impact significatif sur le développement de l'aspérule odorante et la qualité de la plante herbacée.
établissement de plantations, pH du sol et ombrage des plantes.
6. Les plantes des populations étudiées différaient légèrement en termes de morphologie et de développement, et ces
différences étaient plus prononcées chez les plantes transférées en culture.
7. Les populations d'aspérules évaluées différaient en termes de composition chimique. Les plantes de la région Varmie-
Mazurie se caractérisent par une teneur en coumarines plus élevée que celles de la province. Province de Lublin.
8. La teneur en composés biologiquement actifs de la plante dépend de la phase de développement de la plante :
 - la teneur la plus élevée en coumarines a été trouvée dans les herbes récoltées pendant la période
de floraison des
 - plantes, • la teneur la plus élevée en acides phénoliques et en composés iridoïdes a été trouvée
dans les herbes récoltées pendant la phase végétative, après la floraison des plantes.
9. Les herbes provenant de plantes cultivées se caractérisaient par une teneur plus élevée en coumarines et une teneur plus
faible en acides phénoliques et en composés iridoïdes que les herbes provenant de sites naturels.
10. L'extraction à l'aide d'un bain à ultrasons et d'un appareil Soxhlet se caractérisait par une efficacité technologique plus
élevée que l'extraction à l'aide d'un condenseur à reflux.
11. Les extraits alcooliques avaient une teneur plus élevée en composés coumariniques, tandis que les extraits aqueux
avaient une teneur plus élevée en acides polyphénoliques.
12. Les extraits d'herbes collectées sur les sites avaient le pouvoir antioxydant le plus élevé.
naturel dans la phase végétative du développement des plantes.

BIBLIOGRAPHIE Baser

- K., Ozek T., Kremer N., Deliorman D., Ergun F. 2004. Composition des huiles essentielles de *Galium aparine* L. et *Galium odoratum* (L.) Portée. de la Turquie. *J. Essent. Rés.pétrole.* 16(4) : 305-307.
- Benzie IFF, Strain JJ 1999. Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay : mesure directe de l'activité antioxydante totale des fluides biologiques et version modifiée pour la mesure simultanée du pouvoir antioxydant total et de la concentration en acide ascorbique. *Méthodes en enzymologie* 299 : 15-27.
- Braun-Blanquet J. 1964. *Pflanzensoziologie*. Springer, Vienne, New York.
- Chen JH, Ho CT 1997. Activités antioxydantes de l'acide caféique et de son acide hydroxycinnamique associé composés. *Agricole. Nourriture. Chimique.* 45 : 2374-2378.
- Drużyńska B., Jeżak A. 2007. Propriétés antioxydantes des polyphénols contenus dans l'enveloppe des graines de fèves. *nourriture. Science. Technologie. Qualité* 5(54) : 113-121.
- Pharmacopée polonaise VI. 2002. Éd. PTF, Varsovie.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. 1965. Besoins nutritionnels des cultures en suspension de cultures de cellules de soja. *Exp. Cellule. Rés.* 50 : 151-158.
- Hlava B., Stary F., Pospisil F. 1984. *Plantes cosmétiques*. Éd. PWRiL, Varsovie Jamróz J., Mazurek A., Kaźmierczuk M., Kargul K. 2006. Activité antioxydante des extraits obtenus à partir de variétés de houblon aromatiques. *Acta Agroph.* 7(4) : 895-899.
- Jendzejczak E. 1998. Application de la méthode d'analyse groupée dans les études comparatives de l'influence de facteurs sur diverses caractéristiques des plantes. *Prété. Science. Rôle* 4 : 67-75.
- Klavina D., Gailite A., Jakobson G., Necajeva J., Gavrilova G. 2004. Technologie de culture tissulaire pour la conservation des espèces végétales menacées de Lettonie. *Acta Univ. Latv., Biologie* 676 : 183-188.
- Mahlajuk WP 1991. *Lekarstwonnyje rastenja en médecine narodnoj. Privolžckoje knižnoye idéalité* : 121-123.
- Makarska E., Michalak M. 2005. Activité antioxydante des acides phénoliques dans l'orge de printemps. *Annales UMCS, Sec. E.* 60 : 263-269.
- Martino E., Ramaiola I., Urbano M., Bracco F., Collina S. 2006. Extraction assistée par micro-ondes de la coumarine et de composés apparentés de *Melilotus officinalis* (L.) Pallas comme alternative au Soxhlet et à l'extraction assistée par ultrasons. *J. Chrom.* 1125 : 147-151.
- Matuszkiewicz W. 2001. *Guide de marquage des communautés végétales en Pologne*. Éd. PWN, Varsovie.
- Matuszkiewicz JM 2002. *Associations forestières en Pologne*. Éd. PWN, Varsovie.
- Murashige T., Skoog E. 1962. Un milieu révisé pour une croissance rapide et des biomasses avec *Tabacco* culture de tissus. *Physiol végétal.* 15 : 473-497.
- Osińska E., Roslon W. 2004. Recherches préliminaires sur la culture de l'aspérule (*Asperula odorata* L.). *Fleuret Univ. Agricole. Stétine.* 239(95) : 285-288.
- Oświęcimska M., Sendra J., Gawłowska J., Kmiec K., Strzałka M., Janeczko Z. 1984. *Woodruff Asperula odorata* L. dans le sud de la Pologne, partie I. *Studia Naturae* 25 : 11-36.
- Ożarowski A., Jaroniewski W. 1987. *Plantes médicinales et leur utilisation pratique*. Éd. IWZZ, Varsovie : 247-248.
- Pawłowski B. 1977. *Composition et structure des communautés végétales et méthodes de leur étude*. Éd. PWN, Varsovie.
- Skalińska M., Czapik R., Piotrowicz M. 1959. Nombre de chromosomes des angiospermes. *Acta Soc. Bot. Moitié.* 20 : 505-529.
- Rout GR 2000. Manipulation et propagation in vitro de plantes médicinales. *Biotechnologies. Av.* 18h91-120.
- Sneath PHA, Sokal RR 1973. *Taxonomie numérique. Les principes et la pratique de la classification numérique*. Freeman et compagnie, San Francisco : 19-31.
- Strzelecka H., Kowalski J. (éd.) 2000. *Encyclopédie de l'herboristerie et de la phytothérapie*. Éd. PWN, Varsovie.
- Sulma T., Tokarz H., Wierchowska K. 1967. Variabilité morphologique de l'aspérule *Asperula odorata* provenant de diverses communautés végétales en culture maraîchère. *Acta Biol. et Méd. Soc. Scientifique. Gedanensis.* 11 : 321-340.

- Sulma T., Wierzchowska-Renke K. 1969. À partir de recherches sur la teneur en coumarine de l'aspérule des bois (*Asperula odorata* L.) transférée à la culture maraîchère de plusieurs communautés de la forêt de hêtres de Poméranie (Melico-Fagetum) *Acta Biol. et Med. Soc. Scientifique. Gedan.* 14 : 415-422.
- Szafer W., Kulczyński S., Pawłowski B. 1988. *Plantes polonaises.* Éd. PWN, Varsovie : 613-618. Śliwińska E. 1993. Cytométrie en flux - une nouvelle méthode d'analyse du génome. *Sélection végétale et Semences* 2 : 10-15.
- Thiem B., Śliwińska E. 2003. Analyse cytométrique en flux de la teneur en ADN nucléaire dans les cultures in vitro de chicouté (*Rubus chamaemorus* L.). *Plant Sci.* : 164 : 129-134.
- Tokarz H., Sulma T., Bujewicz M. 1969. Le nombre de stomates dans les feuilles de l'aspérule *Asperula odorata* dans les communautés forestières écologiquement différentes de son occurrence et dans les cultures maraîchères. *Acta Biol. et Med. Soc. Scientifique. Gedan.* 14 : 443-467.
- Wierzchowska-Renke K., Stecka L. 1976. Détermination de la teneur en coumarines chez le bison d'Europe. *Armoiries des Nomaé.* 4:8-11.
- Wilson G., Balague C. 2007. Biosynthèse de l'antraquinone par des cellules de *Galium mollugo* L., croissance en chémostat en limitant le saccharose ou le phosphate. *J. Exper. Bot.* 36 : 485-493.
- Velioglu YS, Mazza G., Gao L., Oomah BD 1998. Activité antioxydante et composés phénoliques totaux dans certains fruits, légumes et produits céréaliers. *J. Agric. Chimie alimentaire.* 46 : 4113-4117.
- Zaręba R. 1988. *Phytosociologie et typologie forestière.* Éd. SGGW-AR, Varsovie : 67-69.
- Zarzycki K., Trzcińska-Tacik H., Róžańsko W., Szelał W., Wołek J., Korzeniak U. 2002. Nombre d'indicateurs écologiques des plantes vasculaires en Pologne. Institut de Botanique, Académie Polonaise des Sciences, Cracovie.